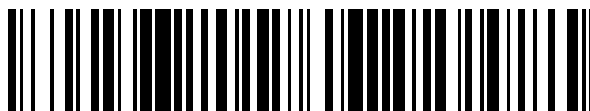


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 645**

51 Int. Cl.:

C12N 9/28 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

D06M 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2009 E 11187405 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2447361**

54 Título: **Variantes de alfa-amilasa de Geobacillus stearothermophilus (AMYS) con propiedades mejoradas**

30 Prioridad:

06.06.2008 US 59423 P

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

27.01.2015

73 Titular/es:

**DANISCO US INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304, US**

72 Inventor/es:

**CUEVAS, WILLIAM A.;
ESTELL, DAVID A.;
HADI, SUR A HUSSAIN;
LEE, SANG-KYU;
RAMER, SANDRA W.;
SHAW, ANDREW;
TOPPOZADA, AMR R. y
WEYLER, WALTER**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 527 645 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de alfa-amilasa de *Geobacillus stearothermophilus* (AMYS) con propiedades mejoradas

CAMPO TÉCNICO

5 **[0001]** Se describen variantes de una α -amilasa original que muestra una alteración en al menos una de las siguientes propiedades en relación con dicha α -amilasa original: actividad específica, especificidad de sustrato, unión de sustrato, escisión de sustrato, estabilidad térmica, actividad dependiente de pH, estabilidad dependiente de pH, estabilidad a la oxidación, dependencia de Ca^{2+} , pl y rendimiento de lavado. Las variantes son adecuadas para la conversión de almidón, la producción de etanol, el lavado de ropa, el lavado de vajillas, la limpieza de superficies duras, el desaprestado de textiles y/o la producción de edulcorante.

10 ANTECEDENTES

15 **[0002]** Las alfa (α)-amilasas (α -1,4-glucan-4-glucanohidrolasas, E.C. 3.2.1.1) constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del almidón y otros oligo y polisacáridos 1,4-glucosídicos lineales y ramificados. Las α -amilasas se pueden utilizar comercialmente en las etapas iniciales del procesamiento de almidón (licuefacción); en la molienda de maíz húmedo; en la producción de alcohol; como agentes de limpieza en matrices detergentes; en la industria textil para el desaprestado del almidón; en aplicaciones de horneado; en la industria de las bebidas; en campos petrolíferos en los procesos de perforación; en el destintado de papel reciclado y en piensos para animales.

[0003] WO02/092797 describe variantes (mutantes) de alfa-amilasas originales tipo Termamyl, cuya variante tiene actividad de alfa-amilasa y presenta propiedades alteradas en relación con el alfa-amilasa original.

20 **[0004]** Aunque se han utilizado α -amilasas actualmente disponibles con cierto éxito en estas aplicaciones, siguen siendo necesarias α -amilasas con actividad específica aumentada, especificidad de sustrato adaptada, estabilidad térmica, de pH y a la oxidación mejorada, y dependencia de Ca^{2+} reducida.

SUMARIO

25 **[0005]** En un aspecto, se describen las nuevas variantes (mutantes) α -amilolíticas de una α -amilasa SPEZYME® Xtra o de una α -amilasa tipo AmyS, en concreto, las variantes que presentan propiedades alteradas que son ventajosas con respecto al procesamiento industrial del almidón (licuefacción, sacarificación y limpieza del almidón y similares).

30 **[0006]** Dichas alteraciones en las propiedades se pueden conseguir introduciendo mutaciones en una α -amilasa parental que afectan, por ejemplo, a la actividad específica, a la especificidad de sustrato, a la unión de sustrato, al modelo de escisión de sustrato, a la estabilidad térmica, al perfil de actividad/pH, al perfil de estabilidad/pH, a la estabilidad hacia la oxidación, a la dependencia de Ca^{2+} y a otras propiedades de interés. Por ejemplo, la alteración puede dar como resultado una variante que, en comparación con la α -amilasa original tipo Spezyme Xtra, tiene una dependencia de Ca^{2+} reducida y/o un perfil de actividad/pH y/o termoestabilidad alterados.

35 **[0007]** En algunos aspectos, las variantes se basan en la α -amilasa de *Geobacillus stearothermophilus* original, o tienen un grado específico de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a esta α -amilasa, por ejemplo: 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o incluso 99 %. En otros aspectos, las variantes se basan en la α -amilasa original relacionada, por ejemplo, las que tienen al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o incluso 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la α -amilasa de *Geobacillus stearothermophilus*.

45 **[0008]** En algunos aspectos, se proporciona una variante de polipéptido que tiene actividad de α -amilasa y al menos una característica alterada que mejora el rendimiento de la enzima, comprendiendo la variante de polipéptido una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a un polipéptido de α -amilasa parental seleccionado de entre AmyS (SEQ ID N° 1) o una variante truncada de AmyS (SEQ ID N° 2), y que tiene al menos una de las siguientes mutaciones en un residuo de aminoácidos correspondiente al del polipéptido de α -amilasa parental como se determina alineando las variantes de polipéptidos con el polipéptido parental, donde la mutación cambia el residuo de aminoácidos a partir del de los polipéptidos parentales:

50 a) una sustitución que introduce un residuo de aminoácidos cargado positivamente en una o varias posiciones seleccionado del grupo consistente en D19, N28, E29, Q86, Q89, Q97, N224, N271, N281, D306, D318, Q319, Q358, D393, Q443, y D458;

55 b) una sustitución que introduce uno o varios de los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo consistente en 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,

ES 2 527 645 T3

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, y 474V;

5 c) una sustitución que introduce uno o varios de los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo consistente en 61, 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, y 476T

10 d) una sustitución que introduce uno o varios de los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo consistente en 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, 181I, 181P, 181R, 181S, 181V, 187A, 187C, 187K, 187L, 187N, 187P, 187Q, 187R, 187S, 242H, 242N, 278H, 278K, 278N, 278R, 281M, 302D, 304M, 304Y, 321H, 321Q, 321R, 333Q, 432Q, 437Y, 446A, 474Q, y 474S,

15 e) una sustitución que introduce uno o varios de los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo consistente en 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, 268I, 268J, 268K, 268L, 268M, 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, y 471Y; y

20 f) una sustitución que introduce uno o varios de los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo consistente en I181A, I181P, I181C, I181E, I181Y, S242A, S242E, G132A, N193Y, y E188P.

25 **[0009]** En algunos aspectos, la variante incluye una mutación que introduce un residuo de aminoácidos cargado positivamente en una o varias posiciones seleccionado del grupo consistente en D19, N28, E29, Q86, Q89, Q97, N224, N271, N281, D306, D318, Q319, Q358, D393, Q443, y D458, y la variante de polipéptido presenta un rendimiento de limpieza mejorado. En aspectos concretos, la limpieza mejorada está bajo condiciones de lavado de América del Norte y se determina utilizando un ensayo de micromuestra. En aspectos concretos, el residuo de aminoácido cargado positivamente es arginina.

30 **[0010]** En algunos aspectos, la variante incluye una sustitución que introduce uno o varios de los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo consistente en 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, y 474V, y la variante ha mejorado la termoestabilidad en comparación con el polipéptido parental.

[0011] En algunos aspectos, la variante incluye una sustitución que introduce uno o varios de los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo consistente en 61, 6N, 6Q, 6T, 6V, 14T, 16F, 25A, 25C, 25G, 25Q, 27M, 36Q, 36S, 39G, 39V, 501, 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, y 476T, y la variante ha mejorado la termoestabilidad en comparación con el polipéptido parental.

[0012] En algunos aspectos, la variante incluye una sustitución que introduce uno o varios de los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo consistente en 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, y 474S, y la variante presenta actividad o expresión aumentada en comparación con el polipéptido parental.

[0013] En algunos aspectos, la variante incluye una sustitución que introduce uno o varios de los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo consistente en 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, 201N, 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, y 471Y, y la variante presenta actividad o expresión aumentada en comparación con el polipéptido parental.

[0014] En algunos aspectos, la variante incluye una sustitución que introduce uno o varios de los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo consistente en I181A, I181P, I181C, I181E, I181Y, S242A, S242E, G132A, N193Y, y E188P, y la variante presenta reducción aumentada de la viscosidad en un ensayo de licuefacción de almidón en comparación con el polipéptido parental.

[0015] En algunos aspectos, se describe una variante de polipéptido α -amilasa que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido α -amilasa parental y que tiene una combinación de tres o más mutaciones en posiciones seleccionadas del grupo consistente en 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, y 476, donde el polipéptido tiene actividad de α -amilasa y donde cada una de las al menos tres o más mutaciones introduce un residuo de aminoácidos que difiere del presente en el polipéptido parental. En aspectos concretos, el número de mutaciones es 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más.

[0016] En algunos aspectos, cuando la mutación no está ya en la posición 242, la mutación está presente en combinación con las sustituciones S242A, S242E, S242Q, S242F, S242H, o S242N. En aspectos concretos, la sustitución es S242Q. En algunos aspectos, cuando la mutación no está ya en la posición 179 o 180, la mutación está presente en combinación con una delección en las posiciones 179 y 180. En algunos aspectos, cuando la mutación no está ya en la posición 349 o 428, la mutación está presente en combinación con una sustitución de una cisteína en uno a varios de estos aminoácidos.

- 5 **[0017]** En algunos aspectos, cuando la mutación no está ya en una de las siguientes posiciones, la mutación está presente en combinación con una sustitución en la posición 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, o R483.
- 10 **[0018]** En algunos aspectos, cuando la mutación no está ya en una de las siguientes posiciones, la mutación está presente en combinación con una sustitución en la posición M8, M9, M15, M96, V128, A111, H133, W138, T149, M197, N188, M200, M206, A209, A210, M284, M307, M311, M316, H405, T412, M438, N193F, y V416G.
- [0019]** En algunos aspectos, el polipéptido parental tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o incluso al menos 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto al polipéptido de SEQ ID N° 1.
- [0020]** En algunos aspectos, el polipéptido parental tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o incluso al menos 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto al polipéptido de SEQ ID N° 2.
- 15 **[0021]** En algunos aspectos, el polipéptido parental tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o incluso al menos 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a un polipéptido seleccionado del grupo consistente en SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 15, y SEQ ID N° 16. En algunos aspectos, el polipéptido parental incluye un truncamiento de los residuos de aminoácidos del extremo C-terminal. En aspectos concretos, el truncamiento es de los 29 residuos de aminoácidos del extremo C-terminal.
- 20 **[0022]** En algunos aspectos, la variante de polipéptido no incluye una mutación en ninguna de las posiciones 106 o 199, o ni en ambas.
- [0023]** En algunos aspectos, se puede añadir o eliminar una o varias mutaciones de una lista de mutaciones sin alejarse de la descripción. En relación con esto, cualquier mutación o mutaciones que aparezcan en el contexto de una lista de mutaciones se pueden combinar como un subconjunto de mutaciones.
- 25 **[0024]** En otro aspecto, se describe una composición que comprende una o varias de las variantes de α -amilasas anteriormente mencionadas. En aspectos concretos, la composición es una composición de limpieza, tal como un detergente para lavar la ropa, un detergente para lavar la vajilla, una composición de limpieza de superficies duras, o similares. La composición puede incluir un detergente.
- 30 **[0025]** En otro aspecto, se describe un método para hidrolizar un sustrato de almidón soluble utilizando una variante de α -amilasa. En algunos aspectos, la variante incluye una sustitución que introduce uno o varios de los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo consistente en I181A, I181P, I181C, I181E, I181Y, S242A, S242E, S242Q, G132A, N193Y, y B188P.
- 35 **[0026]** En algunos aspectos, la variante de α -amilasa se utiliza en combinación con una enzima hidrolizante de ácido fítico, en la que la relación de actividad de α -amilasa (en unidades de α -amilasa) con respecto a la actividad de ácido fítico (en unidades de fitasa), es decir, AAU:FTU, está comprendida entre aproximadamente 1:15 y aproximadamente 15:1, y preferiblemente entre 1:10 y aproximadamente 10:1. En aspectos particulares, la relación de AAU:FTU está comprendida entre 1:4 y 3:1, o incluso 1:1.
- 40 **[0027]** En un aspecto adicional, se describe un método para la licuefacción de almidón en una suspensión, que implica un sustrato que incluye materia vegetal tal como almidón granulado procedente de un proceso de molienda ya sea en seco o en húmedo, comprendiendo el método una etapa de licuefacción principal y/o secundaria, que implica añadir a la suspensión en la etapa de licuefacción primaria y/o secundaria, en cualquier orden, una combinación de al menos una enzima hidrolizante de ácido fítico y al menos una variante de α -amilasa, ya sea simultáneamente o por separado. El método puede comprender además la sacarificación del almidón licuificado para obtener azúcares fermentables; y la recuperación de los azúcares fermentables. En algunos aspectos el método comprende además fermentar los azúcares fermentables bajo condiciones de fermentación adecuadas para obtener productos finales, tales como alcohol. En algunos aspectos, la composición de la enzima contiene al menos una variante de α -amilasa y una fitasa. En algunos aspectos, la composición de la enzima está en forma mezclada.
- 45 **[0028]** En un aspecto adicional, se describe un método para fermentar un sustrato de almidón, comprendiendo el método la adición en cualquier orden de una combinación de una variante de α -amilasa y una fitasa en una dosis única o fraccionada. En otro aspecto, el sustrato de almidón tratado se fermenta en etanol.
- 50 **[0029]** En un aspecto adicional, se describe un proceso de conversión de almidón y/o un proceso de fermentación de etanol que no requieren la adición de ácido o álcali para ajustar el pH. Un aspecto se refiere a una etapa de licuefacción sin ajuste de pH, en la que el pH de la licuefacción está en el intervalo de pH 4.5 a 5.4 y no se añaden sustancias químicas de neutralización de ácidos en la etapa del proceso de licuefacción. En otro aspecto, el pH de la licuefacción está en el intervalo de pH 4.8 a 5.8 y no se añaden sustancias químicas de neutralización de ácidos en la etapa del proceso de licuefacción.
- 55

[0030] En otro aspecto, se describe un método para obtener un sustrato fermentable, que implica poner en contacto una suspensión de grano molido que contiene almidón granulado con una enzima hidrolizante de ácido fítico a una temperatura de 0 °C -30 °C menos que la temperatura de gelatinización del almidón, poner en contacto la suspensión con una variante de α -amilasa, aumentar la temperatura por encima de la temperatura de gelatinización para que el almidón granulado permita la gelatinización del almidón, e hidrolizar el almidón gelatinizado poniéndolo en contacto con la α -amilasa durante un tiempo suficiente para hidrolizar el almidón, y obtener un sustrato fermentable. La enzima hidrolizante de ácido fítico puede ser una fitasa bacteriana o fúngica. La fitasa fúngica puede ser una fitasa *Aspergillus* o una fitasa *Buttiauxella*. En algunos aspectos, la fitasa bacteriana proviene de *Escherichia coli*.

[0031] En otro aspecto, se describe el un proceso para producir un azúcar fermentable, que comprende (a) mezclar el material que contiene almidón molido con agua y vinaza (*thin stillage*), donde la vinaza está en el intervalo de 10 % a 70 % volumen/volumen y obtener una suspensión que comprende almidón y tener un contenido de residuos secos (ds, del inglés *dry solids*) de 20 % a 50 % peso/peso, (b) tratar la suspensión con una fitasa antes de licuificar el almidón o de forma simultánea, (c) licuificar el almidón, (d) añadir una variante de α -amilasa al almidón durante la etapa (b) y/o de forma simultánea con la etapa de licuefacción, y (e) sacarificar el almidón licuificado para obtener azúcares fermentables, donde el pH no se ajusta durante ninguna de las etapas (a), (b), (c), (d) o (e). En algunos aspectos, se recupera el azúcar fermentable y se purifica o se isomeriza. En otros aspectos, la fitasa se añade antes de la etapa de licuefacción. En algunos aspectos, la α -amilasa se añade con la fitasa. En aún más aspectos adicionales, se añade una segunda dosis de α -amilasa durante la etapa de licuefacción.

[0032] En un aspecto adicional, se describe un proceso de producción de alcohol a partir del material que contiene almidón, que comprende licuificar y sacarificar el almidón licuificado como se ha descrito anteriormente para obtener azúcares fermentables y fermentar de forma adicional los azúcares fermentables bajo condiciones de fermentación adecuadas utilizando un microorganismo de fermentación para obtener alcohol. En algunos aspectos, las etapas de sacarificación y fermentación son simultáneas. En algunos aspectos, el alcohol es etanol.

[0033] En otro aspecto, se describen constructos de ADN, que incluyen vectores de expresión, que codifican variantes de α -amilasas, junto con métodos para expresar y utilizar las variantes de α -amilasas, solas o en combinación con otras enzimas α -amilolíticas, por ejemplo, en varios procesos industriales, tales como licuefacción y limpieza de almidón.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0034]

La Figura 1 muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de varias α -amilasas relacionadas con AmyS.

La Figura 2 muestra el plásmido pHPLT-AmyS.

La Figura 3 muestra el porcentaje de actividad residual de variantes de genoteca S242 después de tensión por calor a 95 °C durante 30 minutos. Faltan las posiciones de las variantes P, S, W e Y y se sustituyen por AmyS natural (SPEZYME® Xtra, designada "Z"). Las líneas indican 2x y 3x por encima de la desviación estándar del porcentaje de actividad residual de la enzima natural. S242A y S242Q muestran claramente mayores actividades residuales que la enzima natural.

Las Figuras de la 4A a la 4I muestran alineamientos por parejas de las secuencias de aminoácidos que se muestran en la Figura 1.

La Figura 5 muestra las curvas de fusión térmicas y los puntos fusión de la enzima natural y de las variantes de amilasas sin calcio añadido.

La Figura 6 muestra las curvas de fusión térmicas y los puntos fusión de la enzima natural y de las variantes de amilasas con 2 mM de calcio.

La Figura 7 muestra el perfil de actividad de SPEZYME® Xtra y dos variantes en relación con Liquozyme SC para tres puntos de tiempo.

La Figura 8 muestra el perfil de actividad de cuatro variantes en relación con la variante S242Q para tres puntos de tiempo.

La Figura 9 muestra la reducción de la viscosidad de la harina de maíz debido a la acción de las α -amilasas LIQUOZYME® SC o SPEZYME® Xtra en una dosis de 30 μ g.

- La Figura 10 muestra la reducción de la viscosidad de la harina de maíz debido a la acción de las α -amilasas LIQUOZYME® SC o SPEZYME® Xtra, o una de las dos variantes (S242A y S242Q) en una dosis de 30 μ g.
- 5 La Figura 11 muestra la reducción de la viscosidad de la harina de maíz debido a la acción de las α -amilasas LIQUOZYME® SC o SPEZYME® Xtra, o una o de las dos variantes (S242A y S242Q) en una dosis de 20 μ g.
- La Figura 12 muestra la progresión del equivalente de dextrosa (DE, por sus siglas en inglés) del maíz molido entero tratado con LIQUOZYME® SC, SPEZYME® Xtra o una o de las dos variantes (S242A y S242Q) a lo largo del tiempo (0, 30, 60, y 90 minutos).
- 10 La Figura 13 muestra la viscosidad después del *jet-cooking* (aplicación de vapor a presión) del maíz molido entero tratado con LIQUOZYME® SC, SPEZYME® Xtra o una o de las dos variantes (S242A y S242Q) a lo largo del tiempo (0, 30, 60, y 90 minutos).
- La Figura 14 muestra la progresión de DE del maíz molido entero tratado con fitasa y una amilasa (SPEZYME® Xtra o variante S242Q) a lo largo del tiempo (0, 30, 60, y 90 minutos). MAXALIQ® es una mezcla fitasa/amilasa disponible en Genencor, a Danisco Division. Hace referencia al Ejemplo 8.
- 15 La Figura 15 muestra la viscosidad después del *jet-cooking* del maíz molido entero tratado con fitasa y amilasa (SPEZYME® Xtra o variante S242Q) a lo largo del tiempo (0, 30, 60, y 90 minutos).
- La Figura 16 muestra la progresión de DE del maíz molido entero tratado con la variante de S242Q y fitasa. Hace referencia al Ejemplo 9.
- 20 La Figura 17 muestra la viscosidad después del *jet-cooking* del maíz molido entero tratado con la variante de S242Q y fitasa. Hace referencia al Ejemplo 9.
- La Figura 18 muestra el efecto del tratamiento con fitasa del maíz molido entero en el aumento en la termoestabilidad y en la baja estabilidad de pH de la variante S242Q y hace referencia al Ejemplo 9.
- 25 La Figura 19 muestra el efecto de la adición de fitasa durante la licuefacción principal del maíz molido entero en la reducción de la viscosidad después del *jet-cooking* y hace referencia al Ejemplo 9.
- La Figura 20 muestra una comparación del contenido de sulfato y ácido fítico en granos secos de destilería con solubles (DDGS por sus siglas en inglés): 1) a partir de un proceso convencional, y 2) a partir del proceso sin ajuste de pH. Hace referencia al Ejemplo 10.
- 30 La Figura 21 es un gráfico que muestra el índice de progresión de DE y el porcentaje de reducción de ácido fítico como IP6.
- La Figura 22 es un gráfico que muestra el efecto de la variante de α -amilasa S242Q en la progresión de DE bajo condiciones de procesamiento convencionales. Hace referencia al Ejemplo 8.
- 35 La Figura 23 es un gráfico que representa el rendimiento de S242Q y sus variantes en el ensayo de micromuestra de almidón de arroz como una función de carga bajo las condiciones de lavado de América del Norte. Las condiciones eran TIDE® 2x a 20 °C. Hace referencia al Ejemplo 16.
- La Figura 24 es un gráfico que representa el rendimiento de otra α -amilasa (es decir, amilasa truncada TS-23 de *Bacillus sp.*) con las mutaciones de carga en el ensayo de micromuestra de almidón de arroz bajo las condiciones de lavado de Europa Occidental. Las condiciones eran PERSIL® a 40 °C. Hace referencia al Ejemplo 16.
- 40 La Figura 25 es un gráfico que representa el rendimiento de S242Q y sus variantes en el ensayo de almidón con BODIPY como una función de carga. Hace referencia al Ejemplo 16.
- La Figura 26A es un gráfico que representa la hidrólisis de almidón con BODIPY relativa como una función de expresión en tubo de agitación relativa (es decir, hidrólisis de almidón con BODIPY relativa frente a expresión de tubo de agitación relativa). La Figura 26B es un gráfico que representa la hidrólisis de micromuestra de almidón relativa como una función de expresión en tubo de agitación relativa (es decir, hidrólisis de micromuestra de almidón relativa frente a expresión en tubo de agitación relativa). Hace referencia al Ejemplo 19.
- 45 La Figura 27A es un gráfico que representa la expresión en tubo de agitación relativa como una función de carga. La Figura 27B es un gráfico que representa la hidrólisis de almidón con BODIPY relativa como una función de carga. Hace referencia al Ejemplo 19.
- 50

La Figura 28A es un gráfico que representa la expresión en tubo de agitación relativa como una función de carga. La Figura 28B es un gráfico que representa la actividad de limpieza de micromuestra relativa como una función de carga. Hace referencia al Ejemplo 19.

5 La Figura 29 es un gráfico que representa la viscosidad final después de licuificar el almidón de maíz utilizando la primera estructura AmyS con 30 % de residuos secos, pH 5.8 y dosis de enzima de 30 mg. En la variante +6 la viscosidad final es muy elevada y no se puede medir (sobrecarga de instrumento). Hace referencia al Ejemplo 16.

10 La Figura 30 es un gráfico que representa la estabilidad térmica de la primera escala de carga de AmyS (*first AmyS charge ladder*) como una función de cambio de carga relativa a la enzima natural. Experimento llevado a cabo utilizando un ensayo de estabilidad térmica con amilasa estándar. Hace referencia al Ejemplo 17.

15 La Figura 31A es un gráfico que representa la actividad de limpieza del almidón de arroz de la primera escala de carga de AmyS como una función de pH. El pH 3.0-4.25 es 200 mM de formiato de sodio + 0,01 % de Tween-80. El pH 4.25-5.5 es 200 mM de acetato de sodio + 0,01 % de Tween-80. Los datos se ajustan a las curvas de titulación, cada una con un único valor de pKa. Hace referencia al Ejemplo 21.

La Figura 31B es un gráfico que representa el efecto de las mutaciones de carga en pKa aparente para catálisis de AmyS (primera escala de carga). Hace referencia al Ejemplo 21.

20 La Figura 32A muestra la reducción de la viscosidad de la harina de maíz de las variantes de AmyS en comparación con SPEZYME® Xtra.

La Figura 32B muestra la reducción de la viscosidad de la harina de maíz de AmyS N193Y.

La Figura 32C muestra el efecto de la adición de fitasa en la reducción de la viscosidad de AmyS N193Y.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

25 **[0035]** Las siguientes secuencias de aminoácidos y nucleótidos se mencionan en el presente documento.

SEQ ID N° 1 (AmyS natural de longitud total)

```

AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANEAA NNLSSLGITA LWLPPAYKGT SRSDVGYGVY
DLYDLGFEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE
VNPSDRNQEI SGTYQIQAWT KFDFFPGRGNT YSSEFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG
IGKAWDWEVD TENGNYDYLM YADLMDHPE VVTELKNWVK WYVNTTNIDG FRLDAVKHIK
FSFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NKLHNYITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK
SGGAFDMRTL MTNTLMKDQP TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WVDPWFKPLA YAFILTRQEG
YPCVFYGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG WTREGVTEKP
GSGLAALITD GPGGSKWMYV GKQHAGKVFY DLTGNRSDTV TINS DGWGEF KVN GGSVSVW
VPRKTTVSTI ARPITTRPWI GEFVRWTEPR LVAWP
    
```

35 SEQ ID N° 2 (AmyS natural truncada; SPEZYME® Xtra)

```

AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANEAA NNLSSLGITA LWLPPAYKGT SRSDVGYGVY
DLYDLGFEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE
VNPSDRNQEI SGTYQIQAWT KFDFFPGRGNT YSSEFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG

IGKAWDWEVD TENGNYDYLM YADLMDHPE VVTELKNWVK WYVNTTNIDG FRLDAVKHIK
FSFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NKLHNYITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK
40 SGGAFDMRTL MTNTLMKDQP TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WVDPWFKPLA YAFILTRQEG
YPCVFYGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG WTREGVTEKP
GSGLAALITD GPGGSKWMYV GKQHAGKVFY DLTGNRSDTV TINS DGWGEF KVN GGSVSVW
VPRKTT
    
```


SEQ ID N° 3 (AmyS S242A de longitud total)

5
 AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT SRSDVGYGVY
 DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE
 VNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFFPGRGNT YSSFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG
 IGKAWDWEVD TENGNYDYLMYADLMDHPE VVTELKNWGWYVNTTNIDG FRLDAVKHIK
 FAFPPDWLSY VRSQTGKPLFTVGEYWSYDI NKLHNYITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK
 SGGAFDMRTL MTNTLMKDQPTLAVTFVDNH DTEPGQALQS WVDPWFKPLA YAFILTRQEG
 YPCVfyGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG WTREGVTEKP
 GSGLAALITD GPGGSKWMYV GKQHAGKVfy DLTGNRSDTV TINS DGWGEF KVNGGSVSVW
 VPRKTTVSTI ARPITTRPWT GEFVRWTEPR LVAWP

10 SEQ ID N° 4 (AmyS S242Q de longitud total)

15
 AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT SRSDVGYGVY
 DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE
 VNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFFPGRGNT YSSFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG
 IGKAWDWEVD TENGNYDYLMYADLMDHPE VVTELKNWGWYVNTTNIDG FRLDAVKHIK
 FQFFPDWLSY VRSQTGKPLFTVGEYWSYDI NKLHNYITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK
 SGGAFDMRTL MTNTLMKDQPTLAVTFVDNH DTEPGQALQS WVDPWFKPLA YAFILTRQEG
 YPCVfyGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG WTREGVTEKP
 GSGLAALITD GPGGSKWMYV GKQHAGKVfy DLTGNRSDTV TINS DGWGEF KVNGGSVSVW
 VPRKTTVSTI ARPITTRPWT GEFVRWTEPR LVAWP

SEQ ID N° 5 (AmyS S242E de longitud total)

AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT SRSDVGYGVY
 DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE
 VNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFFPGRGNT YSSFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG
 IGKAWDWEVD TENGNYDYLMYADLMDHPE VVTELKNWGWYVNTTNIDG FRLDAVKHIK
 FEFPPDWLSY VRSQTGKPLFTVGEYWSYDI NKLHNYITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK
 SGGAFDMRTL MTNTLMKDQPTLAVTFVDNH DTEPGQALQS WVDPWFKPLA YAFILTRQEG
 YPCVfyGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG WTREGVTEKP
 GSGLAALITD GPGGSKWMYV GKQHAGKVfy DLTGNRSDTV TINS DGWGEF KVNGGSVSVW
 VPRKTTVSTI ARPITTRPWT GEFVRWTEPR LVAWP

SEQ ID N° 6 (Yamane 707)

nHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLNSDASNLKSKGITAVWIPPAWKASQNDVGYGAYDLYDLGEFN
 QKGTVRTKYGTRSQLOAAVTSLKNNGIQVYGDVVMNHKGGADATEMVRAVEVNPNNRQEVTEGYTIEAW
 TRFDFFPGRGNTHSSFKWRWYHFDGVDWDSRRLNRIYKFRGHGKAWDWEVD TENGNYDYLMYADIDMDH
 PEVVNELRNWGVWYNTLGLDGFRIIDAVKHIIKYSF TRDWINHVRSATGKNMFAVAEFWKNDLGA IENYLQ
 KTNWNHsvfdvplhynlynasksggnydmrnifngtVVQRHP SHAVTFVDNHDSQPEEALESFVEEWFKP
 LAYALILTREQGYPsvfyGDYYGIPTHGVPAMRSKIDP ILEARQYAYGKQNDYLDHNNI IGWTREGNTA
 HPNSGLATIMSDGAGGSKWMEVGRNKAGQVWSDITGNRTGTVT INADGWGNF SVNGGSVSIWVNK

35

SEQ ID N° 7 (AmyL natural, LAT)

ANLNGTLMQYFEWYMPNDGQHWKRLQND SAYLAEHGITAVWIPPAYKGT SQADVGYGAYDLYDLGFEFHQK
 GTVRTKYGKTELQSAIKSLHSRD INVYGDVVINHKGADATEDVTAVEVDPADRNRVISGEHLIKAWTH
 FHFPGRGSTYSDFKWHWHYHFDGTDWDESRKLNRIYKFQKAWDWEVSNENGN DYLYMYADIDYDHPDVAA
 EIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSFLRDWVNVHREKTGKEMFTVAEYWQNDLGALENYLNKTNFN
 HSFVDVPLHYQFHAASSTQGGGYDMRKLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTQPGQSLESTVQTFKPLAYAF
 5 ILTRESGYPQVIFYGDMYGTGDSQREIPALKHKIEPILKARKQYAYGAQHDFDHHDIVGWTREGDSSVA
 NSGLAALITDGPGGAKRMYVGRQNAGETWHDITGNRSEPVVINSEGWGEFHVNGGSVSIYVQR

SEQ ID N° 8 (AmyL natural; Termamyl)

ANLNGTLMQYFEWYMPNDGQHWRRRLQND SAYLAEHGITAVWIPPAYKGT SQADVGYGAYDLYDLGFEFHQK
 GTVRTKYGKTELQSAIKSLHSRD INVYGDVVINHKGADATEDVTAVEVDPADRNRVISGEHLIKAWTH
 10 FHFPGRGSTYSDFKWHWHYHFDGTDWDESRKLNRIYKFQKAWDWEVSNENGN DYLYMYADIDYDHPDVAA
 EIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSFLRDWVNVHREKTGKEMFTVAEYWQNDLGALENYLNKTNFN
 HSFVDVPLHYQFHAASSTQGGGYDMRKLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTQPGQSLESTVQTFKPLAYAF
 ILTRESGYPQVIFYGDMYGTGDSQREIPALKHKIEPILKARKQYAYGAQHDFDHHDIVGWTREGDSSVA
 NSGLAALITDGPGGAKRMYVGRQNAGETWHDITGNRSEPVVINSEGWGEFHVNGGSVSIYVQR

SEQ ID N° 9 (amilasa de *B. amyloliquefaciens*)

VNGTLMQYFEWYTPNDGQHWKRLQND AEHLSDIGITAVWIPPAYKGLSQSDNGYGPYDLYDLGFEFQQKGT
 VRTKYGKTELQDAIGSLHSRNVQVYGDVVLNHNKAGADATEDVTAVEVNPANRNQETSEEYQIKAWTDFR
 FPGRGNTYSDFKWHWHYHFDGADWDESRKISRIFKFRGEGKAWDWEVSSENGN DYLYMYADVDYDHPDVVA
 ETKKWGIWYANELSLDGFRIIDAAKHIFSLRDWVQAVRQATGKEMFTVAEYWQNNAGKLENYLNKTSFN
 QSVFDVPLHFNLQAASSQGGGYDMRRLDGTVVSRHPEKAVTFVENHDTQPGQSLESTVQTFKPLAYAF
 20 ILTRESGYPQVIFYGDMYGTGTSPEIPSLKDNIEPILKARKEYAYGPQHDYIDHPDVI GWTREGDSSAA
 KSGLAALITDGPGGSKRMYAGLKNAGETWYDITGNRSDTVKIGSDGWGEFHVNDGSVSIYVQR

SEQ ID N° 10 (STAINZYME™)

HHNGTNGTMM QYFEWYLPND GNHWNRLRSD ASNLKDKGIS AVWIPPAAWK ASQNDVGYGA
 YDLYDLGFEFN QKGTIRTKYG TRNQLQA AVN ALKSNGIQVY GDVVMNHKGG ADATEMVRVAV
 25 EVNPNNRNQE VSGEYTI EAW TKFD FPCRGN THSNFKWRWY HFDGVDWDQS RKLNNRIYKF
 RGDGKGW DWE VDTENGN DY LMYADIDMDH PEVVNELRNW GVWYNTLGL DGFRIIDAVKH
 IKYSFTRDWI NHVRSATGKN MFAVAEFWKN DLGAIENYLN KTNWNHVSVD VPLHYNLNA
 SASGGNYDMR QIFNGTVVQR HPMHAVTFVD NHDSQP EAL ESFVEEWFKP LAYALTLTRE
 QGYPSVIFYGD YGIPTHGVP AMRSKIDPIL EARQKYAYGR QNDYLDHNI IGWTREGNTA
 HPNSGLATIM SDGAGGNKWM FVGRNKAGQV WTDITGNRAG TVTINADGWG NFSVNGGSVS
 30 IWWNK

SEQ ID N° 11 (NATALASE™)

HHNGTNGTMMQYFEWHL PNDGNHWNRLRDDASNLRRNGITAIWIPPAAWKGT SQNDVGYGAYDLYDLGFEFN
 QKGTVRTKYGTRS QLESIAIHALKNNGVQVYGDVVMNHKGGADATENVLAVEVNPNNRNQEISGDYTI EAW
 35 TKFD FPCRNTYSDFKWRWYHFDGVDWDQSRQFQNRRIYKFRGDGKAWDWEVDS ENGN DYLYMYADVDMDH
 PEVVNELRRWGEWYNTLNL DGFRIIDAVKH IKYSFTRDWLTHVRNATGKEMFAVAEFWKNDLGALENYLN
 KTNWNHVSVDVPLHYNLN NASNSGGNYDMAKLLNGTVVQKHPHAVTFVDNHDSQP GSESLEFVQEWFKP
 LAYALILTREQGYPSVIFYGDY YGIPTHSVPAMKAKIDPIL EARQNFAYGTQHDFDHHNI IGWTREGNTT
 HPNSGLATIMSDGPGGKWMYVGQNKAGQVWHDITGNKPGTVTINADGWANF SVNGGSVSIWVKR

SEQ ID N° 12 (KAO KSM 1378)

HHNGTNGTMMQYFEWHLPNDSGNHWNRLRDDAANLKS KGITAVWIPPAAWKGT SQNDVGYGAYDLYDLGFEFN
 QKGTVRTKYGTRS QLGAVTSLKNNGIQVYGDVVMNHKGGADGTEMVNAVEVNRSNRNQEISGEYTI EAW
 TKFDFPGRGNTHSNFKWRWYHFDGTDWDQSRQLQNKIYKFRGTGKAWDWEVDIENGNYDYL MYADIDMDH
 5 PEVINELRNWGWYINTLNL DGFRI DAVKH I KYSYTRD WLT HVRNTTGKPMFAVAEFWKNDLAAIENYLN
 KTSWNH SVFDVPLHYNLYNASNSGGYFDMRNILNGSVVQKHP I HAVTFVDNHDSQPGEALESFVQSWFKP
 LAYALIL TREQGYPSV F YGDY YGIP THGVPSMKS KIDP LLQARQTYAYGTQH DYFDH HDI IGW TREGDSS
 HPNSGLATIMSDGPGGNKWMYVGKHKAGQVWRDITGNRSGTVTINADGWGNFTVNGGAVSVVVKQ

SEQ ID N° 13 (KAO KSM K38)

DGLNGTMMQYFEWHLNDGQHWNRLHDDAAALSDAGITAIWIPPAYKGN SQADVGYGAYDLYDLGFEFNQK
 GTVRTKYGTKAQLERAIGSLKSN DINVYGDVVMNHKMGADFT EAVQAVQVNP TNRWQDISGAYTIDAWTG
 FDFSGRN NAYSDFKWRWFHFN GVDWDQRYQENHIFRFANTNWNWRVDEENGN DYLLGSNIDFSHP EVQD
 ELKDWG SWFTDELDLDGYRLDAIKHIPFWYTS DWVRHQ RNEADQDLFVVG EYWKDDVGALEFYLD E MNWE
 MSLFDVPLN YNFYRASQQGGSYDMRNILRGS LVEAHPMAVTFVDNHDTQPGESLESWVADWFKPLAYAT
 10 ILTREGGYPNVFYGDY YGIPNDNISAKKDMIDELLDARQNYAYGTQH DYFDHWDVVGW TREGSSSRPNSG
 LATIMSNPGGSKWMYVGRQNAQTWTDLTGNNGASVTINGDGWGEFF TNGGVS SVYV NQ

SEQ ID N° 14 (KAO KSM K36)

DGLNGTMMQYFEWHLNDGQHWNRLHDDAEALS NAGITAIWIPPAYKGN SQADVGYGAYDLYDLGFEFNQK
 GTVRTKYGTKAQLERAIGSLKSN DINVYGDVVMNHKLGADFT EAVQAVQVNP SNRWDISGVYTI DAWTG
 20 FDFPGRN NAYSDFKWRWFHFN GVDWDQRYQENHLFRFANTNWNWRVDEENGN DYLLGSNIDFSHP EVQE
 ELKDWG SWFTDELDLDGYRLDAIKHIPFWYTS DWVRHQ RSEADQDLFVVG EYWKDDVGALEFYLD E MNWE
 MSLFDVPLN YNFYRASKQGGSYDMRNILRGS LVEAHP I HAVTFVDNHDTQPGESLESWVADWFKPLAYAT
 ILTREGGYPNVFYGDY YGIPNDNISAKKDMIDELLDARQNYAYGTQH DYFDHWDIVGW TREGTSSSRPNSG
 LATIMSNPGGSKWMYVQQHAGQTWTDLTGNHAASVTINGDGWGEFF TNGGVS SVYV NQ

25 SEQ ID N° 15 (LIQUIZYME® SC)

AAPFN GTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSS LGIT ALWLPPAYKGT SRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQ
 KGTVRTKYGTKAQYLQAIQA AHAAGM QVYADVVDH KGGADGTEWVDAVEVNP SDRNQEISGTYQIQAWT
 KFDFPGRGN TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFRGKAWDWEVDTEFGNYDYL MYADLMDHPEVV
 TELKNWGWYVNTT NIDGFR L DAVKH I KFSFPDWLSYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNG
 30 TMSLFDAPLHNK FYTAS KSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDT EPGQALQSWVDPWFKPLAYA
 FILTRQEGYPCV FYGDY YGIPQYNIPSLKSKIDP LLIARRDYAYGTQH DYLDHSDIIGW TREGGTEKPGS
 GLAALITDGP GSKWMYVGKQHAGKV FYDLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGVS SVVWVPRKTTS

SEQ ID N° 16 (SPEZYME® Etil)

AAPFN GTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSS LGIT ALWLPPAYKGT SRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQ
 35 KGTVRTKYGTKAQYLQAIQA AHAAGM QVYADVVDH KGGADGTEWVDAVEVNP SDRNQEISGTYQIQAWT
 KFDFPGRGN TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYK I GAWDWEVDTENGNYDYL MYADLMDHPEVV
 TELKNWGWYVNTT NIDGFR L DAVKH I KFSFPDWLSYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNG
 TMSLFDAPLHNK FYTAS KSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDT EPGQALQSWVDPWFKPLAYA
 FILTRQEGYPCV FYGDY YGIPQYNIPSLKSKIDP LLIARRDYAYGTQH DYLDHSDIIGW TREGVTEKPGS
 GLAALITDGP GSKWMYVGKQHAGKV FYDLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGVS SVVWVPRKT T

ES 2 527 645 T3

SEQ ID N° 17 (cebador (*primer*, en inglés) S242 F)

5'-[Phos]GTCAAGCATATTAAGTTCNNSTTTTTTCTGATTGGTTG-3'

SEQ ID N° 18 (cebador (*primer*) S242 R)

5'-[PhOS]CAACCAATCAGGAAAAAASNNGAACTTAATATGCTTGAC-3'

5 SEQ ID N° 19 (fitasa BP17)

```
NDTPASGYQV EKVVILSRHG VRAPTKMTQT MRDVPNTWP EWPVKLGYIT
PRGEHLISLM GGFYRQKFQQ QGILSQGSCP TPNSIYVWAD VDQRTLKTGE
AFLAGLAPQC GLTIHHQQL EKADPLFHPV KAGTCSMDKT QVQQAVEKEA
QTPIDNLNQH YIPFLALMNT TLNFSTSAWC QKHSADKSCD LGLSMP SKLS
IKDNGNKVAL DGAIGLSSTL AEIFLLEYAQ GMPQAAWGNI HSEQEWASLL
10 KLHNVQFDLM ARTPYIARHN GTPLLQAIN ALNPNATESK LPDISPDNKI
LFIAGHDTNI ANIAGMLNMR WTLPGQPDNT PPGGALVFER LADKSGKQYV
SVMVYQYLE QLRSQTPLSL NQPAGSVQLK IPGCNDQTAE GYCP LSTFTR
VVSQSVEPGC QLQ
```

SEQ ID N° 20 (secuencia de codificación para el péptido de señal LAT)

15 atgaaacaac aaaaacggct ttacgcccga ttgctgacgc tgttatttgc gctcatcttc
ttgctgcctc attctgcagc ttcagca

SEQ ID N° 21 (péptido de señal LAT)

MKQQKRLYAR LLTLLFALIF LLPHSAASA

SEQ ID N° 22 (AmyS S242Q truncada)

```
AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANEANLSSLGITA LWLPPAYKGT SRSDVGYGVY
DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE
VNPSDRNQEI SGTYQIQAWT KFDFFPGRGNT YSSFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG
IGKAWDWEVD TENGNVDYLM YADLDMDHPE VVTELKNWGWYVNTTNIDG FRLDAVKHIK
FQFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NKLHNYITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK
SGGAFDMRTL MTNTLMKDQP TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WVDPFWKPLA YAFILTRQEG
YPCVFYGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG WTREGVTEKP
GSGLAALITD GPGGSKWMYV GKQHAGKVFY DLTGNRSDTV TINS DGWGEF KVNGGSVSVW
VPRKTT
```

SEQ ID N° 23 (secuencia de codificación para AmyS madura)

gccgcaccgt ttaacgggtac catgatgcag tattttgaat ggtacttgcc ggatgatggc
 acgttatgga ccaaagtggc caatgaagcc aacaacttat ccagccttgg catcaccgct
 ctttggtgctgc cgcccgttta caaaggaaca agccgcagcg acgtagggta cggagtatac
 gacttgatg acctcggcga attcaatcaa aaagggaccg tccgcacaaa atatggaaca
 aaagctcaat atcttcaagc cattcaagcc gccacgccc ctggaatgca agtgtacgccc
 gatgtcgtgt tcgaccataa aggcggcgct gacggcacgg aatgggtgga cgccgtcgaa
 gtcaatccgt ccgaccgcaa ccaagaaatc tcgggcacct atcaaatcca agcatggacg
 aaatttgatt ttcccgggcg gggcaacacc tactccagct ttaagtggcg ctgggtaccat
 tttgacggcg ttgactggga cgaaagccga aaattaagcc gcatttaca atcccgcggc
 atcggcaaag cgtgggattg ggaagtagac acggaaacg gaaactatga ctacttaatg
 tatgccgacc ttgatatgga tcatcccgaa gtcgtgaccg agctgaaaaa ctgggggaaa
 tggatgtca acacaacgaa cattgatggg ttccggcttg atgccgtcaa gcatattaag
 ttcagttttt ttctgattg gttgtcgtat gtgcgttctc gaactggcaa gccgctatct
 accgtcgggg aatattggag ctatgacatc aacaagttgc acaattacat tacgaaaaa
 aacggaacga tgtctttggt tgatgccccg ttacacaaca aattttatac cgcttccaaa
 tcagggggcg cttttgatat ggcacggtta atgaccaata ctctcatgaa agatcaaccg
 acattggccg tcaccttcgt tgataatcat gacaccgaac ccggccaagc gctgcagtca
 tgggtcgacc catggttcaa accgttggtc tacgccttta ttctaactcg gcaggaagga
 taccctgctg tcttttatgg tgactattat ggcattccac aatataacat tccttcgctg
 aaaagcaaaa tcgatccgct cctcatcgcg cgcagggatt atgcttacgg aacgcaacat
 gattatcttg atcaactccga catcatcggg tggacaaggg aaggggtcac tgaaaaacca
 ggatccgggc tggccgcaact gatcaccgat gggccgggag gaagcaaatg gatgtacggt
 ggcaaacac acgctggaaa agtgttctat gaccttaccg gcaaccggag tgacaccgtc
 accatcaaca gtgatggatg gggggaattc aaagtcaatg gcggttcggt ttcggtttgg
 gttcctagaa aaacgaccgt ttctaccatc gctcggccga tcacaaccg accgtggact
 ggtgaattcg tccgttgac cgaaccacgg ttggtggcat ggct

SEQ ID N° 24 (Satori F)

5'-CTCATCTTCTTGCTGCCTCATTCTGCAGCTTC-3'

25 SEQ ID N° 25 (Satori R)

5'-TTATCCTTTACCTTGTCTCCAAGC-3'

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Introducción

30 **[0036]** La composición y los métodos presentes se refieren a variantes de una α -amilasa original que muestra una alteración en al menos una de las siguientes propiedades en relación con dicha α -amilasa original: actividad específica, especificidad de sustrato, unión de sustrato, escisión de sustrato, estabilidad térmica, actividad dependiente de pH, estabilidad dependiente de pH, estabilidad a la oxidación, dependencia de Ca^{2+} , pI y rendimiento de lavado. Las variantes son adecuadas para la conversión de almidón, la producción de etanol, el lavado de ropa, el lavado de vajilla, la limpieza de superficies duras y otros usos industriales.

35 **[0037]** Aunque se describen numerosas mutaciones, éstas tienen en común la capacidad de mejorar el rendimiento de α -amilasas parentales que comparten características estructurales en cuanto a identidad de secuencia de aminoácidos y estructura de tres dimensiones. Se ha observado que varias de estas mutaciones se pueden combinar con otras mutaciones, lo cual las hace especialmente valiosas en el diseño de variantes de α -amilasas con propiedades preseleccionadas. También se describen las posiciones que no son susceptibles de mutación, en general, o no son susceptibles de mutación y combinación con otras mutaciones. La identificación de estas posiciones también es importante en el diseño de variantes de α -amilasas con propiedades preseleccionadas.

40

[0038] Aunque los estudios realizados en apoyo de las presentes composiciones y métodos se llevaron a cabo principalmente utilizando una α -amilasa parental concreta de *Geobacillus stearothermophilus*, las α -amilasas estructuralmente relacionadas son propensas a beneficiarse de mutaciones equivalentes. Por consiguiente, la presente descripción proporciona un conjunto de directrices para modificar cualquiera de un gran número de α -amilasas para producir cambios beneficiosos en las características de rendimiento y para identificar nuevas α -amilasas propensas a tener características de rendimiento deseables basándose en la presencia de ciertos residuos de aminoácidos en posiciones específicas.

[0039] Estos y otros aspectos y modos de realización de las composiciones y métodos se describen con más detalle a continuación.

10 II. Definiciones y nomenclatura

[0040] Antes de describir las presentes composiciones y métodos con más detalle, a continuación se exponen terminología, nomenclatura y principios generales diversos.

A. Definiciones

[0041] Los siguientes términos y expresiones se definen para una mayor claridad. A los términos y a las expresiones que no se definen se les debe dar el significado habitual que tienen en la técnica. Se hace referencia a referencias de biología molecular estándar, tales como Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL* (2ª 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*, 2ª ED., John Wiley e hijos, Nueva York (1994); y Hale y Markham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, NY (1991).

[0042] Como se utiliza en el presente documento, el término "almidón" se refiere a cualquier material que comprende los carbohidratos polisacáridos complejos de plantas, que comprende amilosa y amilopectina con la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_x$, en la que X puede ser cualquier número. Ejemplos de fuentes de almidón incluyen, pero sin carácter limitativo, granos, pastos, tubérculos y raíces, y más específicamente trigo, cebada, maíz, centeno, arroz, sorgo, salvado, yuca, mijo, patata, boniato y tapioca.

[0043] Como se utiliza en el presente documento, el término "alfa (α)-amilasa" se refiere a enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces α -1,4-glicosídicos, por ejemplo, clase E.C. 3.2.1.1. Estas enzimas también se han descrito como aquellas que efectúan la exo o endohidrólisis de enlaces 1,4- α -D-glicosídicos en polisacáridos que contienen unidades de D-glucosa enlazadas α -1,4. Otro término utilizado para describir estas enzimas es "glucogenasas". Ejemplo de enzimas incluyen α -1,4-glucano-4-glucanohidrasa-glucanohidrolasa.

[0044] Como se utiliza en el presente documento, el término "recombinante", cuando se utiliza con referencia a una célula, ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o una proteína heteróloga o por la alteración de un ácido nucleico nativo o una proteína nativa, o que la célula se deriva de una célula modificada de esta manera. Por tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se expresan anormalmente de otro modo, se expresan por disminución o no se expresan en absoluto.

[0045] Como se utilizan en el presente documento, los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan indistintamente para referirse a una cadena contigua de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Se utiliza el código de una letra o de tres letras convencional para residuos de aminoácidos.

[0046] Como se utiliza en el presente documento, el término "secuencia de señal" se refiere a una secuencia de residuos de aminoácidos en la parte N-terminal de un polipéptido, que facilita la secreción de un polipéptido extracelular fuera de la célula. La forma madura de la proteína extracelular carece de la secuencia de señal, la cual se escinde durante el proceso de secreción.

[0047] Como se utiliza en el presente documento, un "gen" se refiere a un segmento de ADN que participa en la producción de un polipéptido e incluye regiones precedentes y posteriores a las regiones codificantes, así como secuencias intervinientes (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones). El nombre de un gen se escribe normalmente en cursiva, mientras que el nombre de una proteína correspondiente generalmente no se escribe en cursiva y la primera letra se escribe en mayúscula.

[0048] Como se utiliza en el presente documento, los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan indistintamente para referirse a una cadena contigua de nucleósidos unidos por enlaces fosfodiéster o similares, y engloba ADN, ARN, ya sea monocatenario, bicatenario, o parcialmente bicatenario, así como ADN o ARN modificado químicamente o derivados sintéticos de los mismos. A menos que se especifique lo contrario, las secuencias de ácidos nucleicos están presentes en una dirección de 5' a 3'. El experto en la materia entenderá que debido a que el código genético es degenerado, más de un codón puede codificar un aminoácido concreto.

[0049] Como se utiliza en el presente documento, un "vector" se refiere a una secuencia de polinucleótidos diseñada para introducir ácidos nucleicos en uno o varios tipos de células. Los vectores incluyen vectores de clonación, vectores de expresión, vectores lanzadera, plásmidos, partículas de fago, cassettes y similares.

5 **[0050]** Como se utiliza en el presente documento, un "vector de expresión" se refiere a un constructo de ADN que comprende una secuencia de ADN que está operativamente unida a una secuencia de control adecuada capaz de efectuar la expresión del ADN en un huésped adecuado. Tales secuencias de control pueden incluir un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia de operador opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión al ribosoma adecuados en el ARNm, potenciadores y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traslado.

10 **[0051]** Como se utiliza en el presente documento, un "promotor" es una secuencia reguladora que participa en la unión de ARN polimerasa para iniciar la transcripción de un gen. El promotor puede ser un promotor inducible o un promotor constitutivo. Un ejemplo de promotor es el del gen *cbh1* de *Trichoderma reesei*, que es un promotor inducible.

15 **[0052]** Como se utiliza en el presente documento, el término "bajo control de transcripción" indica que la transcripción de un polinucleótido específico, normalmente una secuencia de ADN, depende de si está operativamente unido a un promotor específico y/o a otro(s) elemento(s), que regulan su transcripción.

[0053] Como se utiliza en el presente documento, el término "bajo control de traslado" indica que la traslado de un polinucleótido específico, normalmente una secuencia de ARNm, depende de si está operativamente unido a un(os) elemento(s) específico(s), que regulan su traslado.

20 **[0054]** Como se utiliza en el presente documento, el término "derivado" engloba los términos "originado de", "obtenido de", "obtenible de" y "aislado de" y se utiliza para indicar que un polipéptido, un polinucleótido, un vector de expresión, una célula huésped, o similar, específico es una variante modificada de un polipéptido, un polinucleótido, un vector de expresión, una célula huésped, o similar, parental.

25 **[0055]** Como se utiliza en el presente documento, "operativamente unido" significa que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Por ejemplo, una secuencia regulatoria puede estar "operativamente unida" a una secuencia codificante de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue bajo condiciones compatibles con la secuencia regulatoria.

30 **[0056]** El término "marcador selectivo/seleccionable" se refiere a un gen capaz de ser expresado en una célula huésped que permite la facilidad de selección de aquellas células huésped que utilizan un componente de medios o una condición de crecimiento. Ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, pero sin carácter limitativo, genes que confieren resistencia antibiótica/antimicrobiana (por ejemplo, higromicina, bleomicina o cloranfenicol) y/o genes que confieren una ventaja metabólica o nutricional.

35 **[0057]** Como se utiliza en el presente documento, un polinucleótido o un polipéptido tiene un cierto "por ciento/porcentaje de identidad de secuencia" (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %) con otra secuencia cuando el porcentaje especificado de bases o residuos de aminoácidos es el mismo que sigue al alineamiento de las secuencias. El alineamiento y el porcentaje de homología o identidad se pueden determinar utilizando cualquier programa de *software* adecuado conocido en la técnica, por ejemplo los descritos en *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (Ausubel *et al.* (eds) (1987) suplemento 30, sección 7.7.18). Los programas preferidos incluyen los programas Vector NTI Advance™ 9.0 (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA), GCG Pileup, FASTA (Pearson *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU. 85:2444-2448), y BLAST (BLAST Manual, Altschul *et al.*, Natl Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, Md., y Altschul *et al.* (1997) NAR 25:3389-3402). Otro programa de alineamiento preferido es ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, PA) utilizando preferiblemente parámetros por defecto. Otro programa de *software* para el análisis de secuencias que es útil es el programa de búsqueda de datos TFASTA, disponible en el paquete de *software* para el análisis de secuencias versión 6.0 (Sequence Analysis Software Package Version 6.0, Genetic Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, WI).

45 **[0058]** Como se utiliza en el presente documento, una "cepa huésped" o una "célula huésped" se refiere a un organismo adecuado para introducir un vector de expresión o constructo de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido en cuestión. Las cepas huésped son preferiblemente células bacterianas o fúngicas pero también pueden ser células vegetales (por ejemplo, protoplastos), células de insectos o células de mamíferos.

55 **[0059]** Como se utiliza en el presente documento, el término "cultivar" se refiere a hacer crecer una población de células microbianas bajo condiciones adecuadas en un medio líquido o sólido. Cultivar incluye la bioconversión fermentativa de un sustrato de almidón que contiene almidón granulado en un producto final (normalmente en un recipiente o reactor).

[0060] Como se utiliza en el presente documento, el término "fermentación" se refiere a la rotura enzimática y sustancialmente anaeróbica de sustancias orgánicas por microorganismos para producir compuestos orgánicos

más simples. Aunque la fermentación se produce generalmente bajo condiciones anaeróbicas, no se pretende que el término se limite únicamente a condiciones estrictamente anaeróbicas, puesto que la fermentación también se produce en presencia de oxígeno.

5 **[0061]** Como se utiliza en el presente documento, el término "poner en contacto", con referencia a una enzima y a su sustrato, se refiere a la disposición de la enzima en proximidad suficientemente cercana al sustrato para permitir que la enzima convierta el sustrato en un producto final (es decir, actuar en el sustrato). La puesta en contacto se puede producir mediante la mezcla de las soluciones o suspensiones de las enzimas y los sustratos.

10 **[0062]** Como se utiliza en el presente documento, el término "conversión enzimática" se refiere en general a la modificación de un sustrato por la acción de una enzima, por ejemplo, la modificación de un sustrato de almidón por la acción de una amilasa, una glucoamilasa u otra enzima.

[0063] Como se utiliza en el presente documento, el término "sacarificación" se refiere a la conversión enzimática de almidón a glucosa.

[0064] Como se utiliza en el presente documento, el término "gelatinización" se refiere a la solubilización de almidón (por ejemplo, almidón crudo o cristalino) mediante cocción para formar una suspensión viscosa.

15 **[0065]** Como se utiliza en el presente documento, el término "licuefacción" se refiere a la etapa en la conversión del almidón en la que se hidroliza el almidón gelatinizado a dextrinas solubles de menor peso molecular.

20 **[0066]** Como se utiliza en el presente documento, el término "grado de polimerización (DP, por sus siglas en inglés)" se refiere al número (n) de unidades de anhidroglucopiranosas en un sacárido dado. Ejemplos de sacáridos de DP1 son los monosacáridos, tales como la glucosa y la fructosa. Ejemplos de sacáridos de DP2 son los disacáridos, tales como la maltosa y la sacarosa. Un sacárido de DP>3 tiene un grado de polimerización superior a 3.

[0067] Como se utilizan en el presente documento, los términos "producto final" o "producto final deseado" se refieren a una molécula que se deriva enzimáticamente de un sustrato, como el almidón.

25 **[0068]** Como se utilizan en el presente documento, el término "contenido de residuos secos (ds, por sus siglas en inglés)" se refiere a los sólidos totales de una suspensión expresados en términos de % en una base de peso seco (% wt/wt).

[0069] Como se utiliza en el presente documento, el término "suspensión" se refiere a una mezcla acuosa que contiene sólidos insolubles.

30 **[0070]** Como se utiliza en el presente documento, el término "almidón residual" se refiere al almidón restante (soluble o insoluble) en una composición de almidón después de la fermentación.

[0071] Como se utiliza en el presente documento, una "etapa de reciclado" se refiere al reciclado de componentes en forma de masa, que pueden incluir almidón residual, enzimas y/o microorganismos que afecten o participen en la fermentación de composiciones de almidón adicionales.

35 **[0072]** Como se utiliza en el presente documento, el término "masa" se refiere a una mezcla de moléculas de carbono fermentables (por ejemplo, carbohidratos) en agua, que puede utilizarse para producir un producto fermentado, tal como un alcohol. Los términos "cerveza" y "masa" se pueden utilizar indistintamente.

[0073] Como se utiliza en el presente documento, el término "vinaza" se refiere a una mezcla de sólidos no fermentados y agua, que es el residuo después de eliminar el alcohol de una masa fermentada.

40 **[0074]** Como se utilizan en el presente documento, los términos "granos secos de destilería (DDG, por sus siglas en inglés)" y "granos secos de destilería con solubles (DDGS, por sus siglas en inglés)" se refieren a un subproducto útil de fermentación de grano.

45 **[0075]** Como se utiliza en el presente documento, un "microorganismo etanológico" se refiere a un microorganismo capaz de convertir un azúcar u oligosacárido en etanol. Los microorganismos etanológicos son generalmente etanológicos debido a su capacidad para expresar una o varias enzimas que convierten azúcar en etanol de forma individual o conjunta.

50 **[0076]** Como se utiliza en el presente documento, el término "productor de etanol" o "microorganismo productor de etanol" se refiere a cualquier organismo o célula capaz de producir etanol a partir de una hexosa o pentosa. Generalmente, las células productoras de etanol contienen un alcohol deshidrogenasa y una piruvato descarboxilasa. Los ejemplos de microorganismos productores de etanol incluyen microorganismos fúngicos tales como la levadura. Una levadura preferida incluye cepas de *Sacchromyces*, en concreto, *S. cerevisiae*.

[0077] Como se utiliza en el presente documento, el término "heterólogo", con referencia a un polinucleótido o polipéptido, se refiere a un polinucleótido o polipéptido que no se produce de forma natural en una célula huésped. La proteína puede ser un polipéptido industrial comercialmente importante, tal como una enzima. Se

pretende que el término englobe polinucleótidos y polipéptidos que son (o se codifican por) genes que se producen de forma natural, genes mutados y/o genes sintéticos.

[0078] Como se utiliza en el presente documento, el término "endógeno", con referencia a un polinucleótido o polipéptido, se refiere a un polinucleótido o polipéptido que se produce de forma natural en la célula huésped.

5 **[0079]** Como se utilizan en el presente documento, los términos "recuperado", "aislado" y "separado" se refieren a un compuesto, una proteína, una célula, un ácido nucleico, o un aminoácido que se elimina de al menos un componente con el que está asociado de forma natural.

10 **[0080]** Como se utilizan en el presente documento, los términos "transformado", "establemente transformado" y "transgénico" utilizados con referencia a una célula, significan que la célula incluye una secuencia de ácidos nucleicos no nativa (por ejemplo, heteróloga) integrada en su genoma o transportada como un plásmido episomal que se mantiene a lo largo de múltiples generaciones.

[0081] Como se utiliza en el presente documento, el término "expresión" se refiere al proceso por el que se produce un polipéptido basándose en la secuencia nucleotídica de un gen. El proceso incluye tanto la transcripción como la traslación.

15 **[0082]** Como se utiliza en el presente documento, el término "introducido", en el contexto de insertar una secuencia de ácidos nucleicos en una célula, se refiere a la "transfección", "transformación" o "transducción" e incluye referencia a la incorporación de una secuencia de ácidos nucleicos en una célula eucariota o procarionta en la que la secuencia de ácidos nucleicos puede incorporarse al genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial), convertirse en un replicón autónomo o expresarse transitoriamente (por ejemplo, ARNm transfectado).

20 **[0083]** Como se utiliza en el presente documento, el término "actividad específica" se refiere al número de moles de sustrato que pueden convertirse en producto por una enzima o por una preparación de enzima por unidad de tiempo bajo condiciones específicas. La actividad específica se expresa generalmente como unidades (U)/mg de proteína.

25 **[0084]** Como se utiliza en el presente documento, el término "rendimiento" se refiere a la cantidad de producto final producido utilizando un método específico y reactivos específicos (que incluyen enzimas). La cantidad de producto final se puede expresar en términos de masa, volumen, concentración o similares, y puede incluir una referencia a la cantidad de material de partida (por ejemplo, sustrato), tiempo u otras condiciones.

30 **[0085]** Como se utiliza en el presente documento, el término "índice de rendimiento (PI, por sus siglas en inglés)" se refiere al índice de rendimiento de una variante de enzima con respecto a una enzima original o de referencia. En este contexto, se utilizan varios términos y expresiones adicionales para caracterizar el rendimiento de las variantes: las "mutaciones aceleradoras" tienen un PI > 1; las mutaciones neutras tienen un PI > 0,5; las mutaciones no deletéreas tienen un PI > 0,05; las mutaciones deletéreas tienen un PI = 0,05; las mutaciones combinables tienen un PI = 0,5 para al menos una propiedad y > 0,05 para todas las propiedades.

35 **[0086]** Como se utiliza en el presente documento, "mutaciones combinables" son mutaciones que se pueden combinar para suministrar proteínas con índices de rendimiento (PI) preseleccionados para una o más propiedades deseadas (véase más arriba).

[0087] Como se utiliza en el presente documento, "ATCC" se refiere a la Colección americana de cultivos tipo (American Type Culture Collection) ubicada en Manassas, VA, EE.UU.

40 **[0088]** Como se utiliza en el presente documento, "NRRL" se refiere a la Colección de cultivos del servicio de investigación agrícola (Agricultural Research Service Culture Collection), Centro nacional para la investigación de la utilización agrícola (previamente conocido como "USDA Northern Regional Research Laboratory"), en Peoria, IL, EE.UU.

45 **[0089]** En general, los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Los artículos en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Los encabezamientos se proporcionan para facilitar la lectura y no deberían interpretarse como materia descrita limitante con respecto a una parte de la memoria.

B. Nomenclatura

50 **[0090]** Se utilizan los códigos convencionales de una letra y de tres letras para los residuos de aminoácidos a menos que se especifique lo contrario. Las variantes de polipéptidos se describen utilizando la siguiente nomenclatura: aminoácido(s) original(es): posición(es): aminoácido(s) sustituido(s).

[0091] Según esta nomenclatura, por ejemplo, la sustitución de serina por una alanina en la posición 242 se muestra como:

Ser142A1a o S242A

[0092] Una deleción de alanina en la posición 30 se muestra como:

Ala30* o A30* o AA30

[0093] Y una inserción de un residuo de aminoácido adicional, tal como la lisina, se muestra como:

5 Ala30AlaLys o A30AK

[0094] Una deleción de un segmento consecutivo de residuos de aminoácidos, tal como los residuos de aminoácidos 30-33, se indica como (30-33)* o Δ(A30- N33).

[0095] Cuando un polipéptido contiene una “deleción” en comparación con otros polipéptidos (o un polipéptido original) y se realiza una inserción en esta posición esto se indica como:

10 *36Asp o *36D, donde el ejemplo representa la inserción de un ácido aspártico en la posición 36.

[0096] Las mutaciones múltiples están separadas por signos de suma. Por ejemplo: las mutaciones en las posiciones 30 y 34, sustituyendo la alanina y el ácido glutámico por asparagina y serina, respectivamente, se representan como:

Ala30Asp+Glu34Ser o A30N+E34S

15 **[0097]** Cuando uno o más residuos de aminoácidos alternativos se pueden insertar en una posición dada esto se indica como

A30N,E o A30N o A30E

20 **[0098]** Además, cuando se identifica una posición adecuada para la modificación sin que se haya sugerido ninguna modificación específica, se entenderá que cualquier residuo de aminoácido se puede sustituir por el residuo de aminoácido presente en la posición. Por ejemplo, cuando se menciona una modificación de una alanina en la posición 30, pero no se especifica, se entenderá que la alanina se puede deleccionar o sustituir por cualquier otro aminoácido, es decir, cualquiera de:

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

[0099] Además, “A30X” significa cualquiera de las siguientes sustituciones:

25 A30R, A30N, A30D, A30C, A30Q, A30E, A30G, A30H, A30I, A30L, A30K, A30M, A30F, A30P, A30S, A30T, A30W, A30Y, o A30 V; que también se puede presentar como: A30R,N,D,C,Q,E,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V.

[0100] Si la enzima original utilizada para la numeración ya tiene el residuo de aminoácido en cuestión sugerido para la sustitución en esa posición, se utiliza la siguiente nomenclatura:

30 "X30N" o "X30N,V" en el caso en el que, por ejemplo, uno o N o V está presente en la enzima natural.

[0101] Por lo tanto, esto significa que otras enzimas originales correspondientes se sustituyen por un “Asn” o “Val” en la posición 30.

C. Características de los residuos de aminoácidos

35 **[0102]** La siguiente información general sobre las características de los residuos de aminoácidos se proporciona a modo de referencia:

[0103] Aminoácidos cargados:

Asp, Glu, Arg, Lys, His

[0104] Aminoácidos cargados negativamente (con el residuo más negativo en primer lugar):

Asp, Glu

40 **[0105]** Aminoácidos cargados positivamente (con el residuo más positivo en primer lugar):

Arg, Lys, His

[0106] Aminoácidos neutros:

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

[0107] Residuos de aminoácidos hidrófobos (con el residuo más hidrófobo listado en último lugar):

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

[0108] Aminoácidos hidrófilos (con el residuo más hidrófilo listado en último lugar):

Thr, Ser, Cys, Gln, Asn

5 **III. α -amilasas para utilizarse en las presentes composiciones y métodos**

[0109] Los siguientes párrafos describen α -amilasas "del tipo Spezyme® Xtra " o "del tipo AmyS " que se pueden modificar y utilizar según se describe en el presente documento.

A. Homología entre α -amilasas

10 [0110] Los experimentos llevados a cabo en apoyo de las presentes composiciones y métodos se han llevado a cabo utilizando α -amilasas *Geobacillus* (antes *Bacillus*) *stearothermophilus* (es decir, AmyS,), ejemplificadas por la SEQ ID N° 2. Una variante de esta amilasa está comercialmente disponible como SPEZYME® Xtra (Danisco US Inc, Genencor Division, Palo Alto, CA, EE.UU.).

15 [0111] Un número de α -amilasas producido por *Bacillus* spp. son muy homólogas (idénticas) en el nivel de aminoácido con respecto a AmyS, y se espera que las muchas mutaciones descritas en el presente documento produzcan efectos similares cuando se realicen con estas amilasas, colectivamente denominadas α -amilasas "del tipo Spezyme® Xtra " o α -amilasas "del tipo AmyS". En la Tabla A se resume la identidad de un número de α -amilasas *Bacillus* conocidas:

Tabla A. Porcentaje de identidad

	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

20 [0112] Se ha observado que la α -amilasa *B. Licheniformis* (LAT) que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID N° 7 es aproximadamente 81 % homóloga a la α -amilasa *B. Amyloliquefaciens* que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID N° 9, y aproximadamente 65 % homóloga a la α -amilasa *Geobacillus* (antes *Bacillus*) *stearothermophilus* (BSG; AmyS) que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID N° 1. α -amilasas homólogas adicionales incluyen SP690 y SP722 descritas en WO 95/26397 y la α -amilasa #707 derivada de *Bacillus* sp., que se muestra en la SEQ ID N° 6 y descrita por Tsukamoto *et al.* (1988) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 151:25-31. La α -amilasa KSM AP1378 (SEQ ID N° 12) se describe en WO 97/00324 (de KAO Corporation).

30 [0113] Aún más α -amilasas homólogas adicionales incluyen la α -amilasa producida por la cepa *B. Licheniformis* descrita en EP 0 252 666. (ATCC 27811), y las α -amilasas identificadas en WO 91/00353 y WO 94/18314. Otras α -amilasas comerciales del tipo SPEZYME® Xtra están comprendidas en los productos vendidos bajo los siguientes nombres comerciales: SPEZYME® AA y Ultraphlow (disponible de Danisco US Inc, Genencor Division), y KEISTASE™ (disponible de Daiwa) y LIQUEZYME® SC (SEQ ID N° 15) disponible de Novozymes, DK). Otras α -amilasas relacionadas incluyen Termamyl® (SEQ ID N° 8; Novozymes), STAINZYME™ (SEQ ID N° 10; Novozymes), NATALASE™ (SEQ ID N° 11; Novozymes), KAO KSM K38 (SEQ ID N° 13), KAO KSM K36 (SEQ ID N° 14), otras α -amilasas mencionadas en la Tabla, y otras α -amilasas descritas en el presente documento.

40 [0114] Debido a la homología sustancial observada entre estas α -amilasas, se considera que pertenecen a la misma clase de α -amilasas y se engloban en las presentes composiciones y métodos. Aunque la α -amilasa *G. Stearothermophilus* (SEQ ID N° 2) se utiliza como punto de partida, también se espera que las posiciones correspondientes en estas y otras α -amilasas, por ejemplo, las α -amilasas SP722, BLA, BAN, AA560, SP690, KSM AP1378, #707 y otras α -amilasas *Bacillus*, se beneficien de las modificaciones a describir.

[0115] Por consiguiente, se pretende que los términos α -amilasa del tipo SPEZYME® Xtra o α -amilasa del tipo AmyS incluyan una α -amilasa que tenga la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID N°s: 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11,

12, 15, y 16. En algunos aspectos, las α -amilasas del tipo Spezyme® Xtra o las α -amilasas del tipo AmyS también incluyen α -amilasas que muestran una identidad sustancial a nivel de aminoácidos con respecto a la SEQ ID N° 2, por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o incluso al menos 99 % de homología (identidad). En aspectos adicionales, las α -amilasas del tipo Spezyme® Xtra o las α -amilasas del tipo AmyS también incluyen α -amilasas que muestran una identidad sustancial a nivel de aminoácidos con respecto a una o más de las SEQ ID N°s: 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, y 16, por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o incluso al menos 99 % de homología (identidad).

[0116] La homología de α -amilasas conocidas o sospechadas con respecto a una α -amilasa de referencia se puede determinar mediante programas informáticos conocidos en la técnica. Generalmente, un alineamiento estructural entre SPEZYME® Xtra (SEQ ID N° 2) y, por ejemplo, otra α -amilasa se puede utilizar para identificar posiciones equivalentes/correspondientes en otras α -amilasas del tipo SPEZYME® Xtra, que se pueden mutar como se describe en el presente documento para producir efectos similares. Un programa a modo de ejemplo es GAP, que se proporciona en el paquete de programas GCG (descrito previamente). En concreto, el Gap GCG v8 se puede utilizar con la matriz de puntuación por defecto para la identidad y los siguientes parámetros por defecto: penalización de creación GAP de 5,0 y penalización de extensión GAP de 0,3, respectivamente para la comparación de secuencias de ácidos nucleicos, y penalización de creación GAP de 3,0 y penalización de extensión GAP de 0,1, respectivamente para la comparación de secuencias de proteínas. GAP utiliza el método de Needleman y Wunsch, (1970), *J.Mol. Biol.* 48:443-453, para realizar alineamientos y para calcular la identidad. En la técnica se conocen otros programas y métodos.

[0117] Otro método para obtener alineamientos estructurales es utilizar el programa Pile Up del paquete GCG utilizando valores por defecto de penalizaciones gap, es decir, una penalización de creación gap de 3,0 y una penalización de extensión gap de 0,1. Otros métodos de alineamiento estructural incluyen el análisis de grupo hidrófobo (Gaboriaud *et al.*, (1987), FEBS LETTERS 224, pp. 149-155) y el roscado inverso (Huber, T; Torda, AE, PROTEIN SCIENCE vol. 7, n°. 1 pp. 142-149 (1998).

[0118] Las α -amilasas del tipo SPEZYME® Xtra o las α -amilasas del tipo AmyS incluyen además polipéptidos codificados por una secuencia de ADN que hibrida con una secuencia de ADN que codifica una o varias de las α -amilasas previamente mencionadas, como se ejemplifica en las SEQ ID N°s: 9 (BAN), 5 (BSG; AmyS), 3 (SP722), 1 (SP690), 7 (LAT), y 11 (AA560) de WO 06/002643 y polinucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N°s: 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 y 16. Un ácido nucleico es hibridable con otra secuencia de ácidos nucleicos cuando una forma monocatenaria del ácido nucleico puede aparearse con el otro ácido nucleico bajo condiciones de temperatura apropiadas y solución de fuerza iónica. Las condiciones de hibridación y de la lavado son muy conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook (1989), véase más arriba, en concreto los capítulos 9 y 11). Una sonda de oligonucleótido utilizada en la caracterización de una α -amilasa conocida o sospechada del tipo SPEZYME® Xtra descrita previamente se puede preparar adecuadamente basándose en la secuencia completa o parcial de nucleótidos o aminoácidos de la α -amilasa en cuestión.

[0119] Las condiciones adecuadas para analizar la hibridación implican preremover en 5X SSC y prehibridar durante 1 hora a 40 °C en una solución de formamida al 20 %, una solución de 5X Denhardt, 50 mM de fosfato de sodio, pH 6.8 y 50 mg de ADN de timo de ternera sonificado desnaturalizado, seguido de la hibridación en la misma solución complementada con 100 mM de ATP durante 18 horas a 40 °C, seguido de lavar el filtro tres veces en 2X SSC, 0,2 % de SDS a 40 °C durante 30 minutos (bajo rigor), preferiblemente a 50 °C (rigor medio), más preferiblemente a 65 °C (rigor alto), aún más preferiblemente a 75 °C (rigor muy alto). Se pueden encontrar más detalles sobre el método de hibridación en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor, 1989. En algunos modos de realización, las condiciones de rigor corresponden a una Tm de 65 °C y 0,1xSSC, 0,1 % de SDS.

B. α -amilasas parentales

[0120] Cualquiera de las α -amilasas del tipo SPEZYME® Xtra/AmyS previamente mencionadas puede servir como una α -amilasa parental para ser modificada y utilizada como se describe en el presente documento. La α -amilasa parental/original también se puede denominar una "estructura principal" o "plantilla", y se pueden derivar variantes de amilasas de la misma. En algunos aspectos, la α -amilasa original se deriva de *G. stearothermophilus*. En un aspecto concreto, la α -amilasa original tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2. En otros aspectos, la α -amilasa parental tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°s: 1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, y 16, o muestra una identidad sustancial a nivel de aminoácidos con respecto a las SEQ ID N°s: 1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, y/o 16, por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o incluso al menos 99 % de homología (identidad).

[0121] Una α -amilasa parental también puede ser una α -amilasa híbrida, es decir, una α -amilasa que comprende una combinación de secuencias de aminoácidos parciales derivadas de al menos dos α -amilasas, tales como las descritas previamente. Además, la α -amilasa híbrida puede incluir una porción de una α -amilasa del tipo SPEZYME® Xtra/AmyS y una porción de una o varias otras α -amilasas de origen microbiano (bacteriano o fúngico) y/o mamífero.

[0122] De esta manera, la α -amilasa híbrida original puede comprender una combinación de secuencias de aminoácidos parciales que derivan de al menos dos α -amilasas del tipo SPEZYME® Xtra, o de al menos una α -amilasa del tipo SPEZYME® Xtra y al menos una α -amilasa bacteriana que no es del tipo SPEZYME® Xtra, o de al menos una del tipo SPEZYME® Xtra y al menos una α -amilasa fúngica, etcétera. Por ejemplo, la α -amilasa original puede comprender una parte C-terminal de una α -amilasa derivada de una cepa de *B. licheniformis*, y una parte N-terminal de una α -amilasa derivada de una cepa de *G. stearothermophilus*.

IV. Propiedades alteradas de variantes de α -amilasa

[0123] La siguiente sección describe la relación entre mutaciones, que están presentes en las variantes de polipéptidos descritas en el presente documento, y alteraciones deseables en las propiedades (relacionadas con las de una α -amilasa original del tipo SPEZYME® Xtra), que resultan de las mismas.

[0124] En un primer aspecto una variante de una α -amilasa original de *G. stearothermophilus* descrita, que comprende una alteración en una o varias posiciones (utilizando la SEQ ID N° 1 o la SEQ ID N° 2 para la numeración de aminoácidos) seleccionadas del 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.

en el que

(a) la alteración o las alteraciones son independientemente

- (i) una inserción de una corriente de aminoácido del aminoácido que ocupa la posición,
- (ii) una delección del aminoácido que ocupa la posición, o
- (iii) una sustitución del aminoácido que ocupa la posición por un aminoácido diferente,

(b) la variante tiene actividad de α -amilasa y (c) cada posición corresponde a una posición de la secuencia de aminoácidos de la α -amilasa de *G. stearothermophilus* original que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N° 1 o 2.

[0125] Específicamente contempladas en el presente documento están S242A, S242Q, S242N y S242E, que se pueden combinar con mutaciones en R179, G180, I181, G182, y/o K183, asociadas con la unión calcio-sodio, y/o una mutación en P245 en la mitad de una hélice- α .

[0126] Se pueden encontrar posiciones correspondientes en otras α -amilasas originales del tipo SPEZYME® Xtra mediante alineamiento como se describe previamente y se muestra en el alineamiento de la Figura 4.

Estabilidad

[0127] En el contexto de las variantes descritas en el presente documento, las mutaciones (que incluyen sustituciones de aminoácidos y delección) de importancia con respecto a lograr una estabilidad alterada, en concreto una estabilidad mejorada (es decir, mayor o menor), a temperaturas especialmente altas (es decir, 70 °C -120 °C) y/o pH extremo (es decir, pH bajo o elevado, es decir, pH 4-6 o pH 8-11, respectivamente), en concreto en concentraciones sin (es decir, no unidas, por lo tanto en solución) calcio por debajo de 60 ppm, incluyen cualquiera de las mutaciones listadas en la sección "Propiedades alteradas". La estabilidad se puede determinar como se describe en la sección "Métodos" que aparece más adelante en el texto.

[0128] Ejemplos de mutaciones en α -amilasas SPEZYME® Xtra y α -amilasas relacionadas que aumentan la estabilidad incluyen:

(a) una sustitución que introduce uno o varios de los residuos 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, 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, y 474V, o

(b) una sustitución que introduce uno o varios de los residuos de aminoácidos: 61, 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, y 476T

Estabilidad de Ca²⁺

[0129] Estabilidad de Ca²⁺ alterada significa que se ha mejorado la estabilidad de la enzima bajo disminución de Ca²⁺, es decir, estabilidad mayor o menor. En el contexto de las variantes descritas en el presente documento, las mutaciones (incluyendo las sustituciones y las deleciones de aminoácidos) de importancia con respecto a lograr una estabilidad de Ca²⁺ alterada, en concreto una estabilidad de Ca²⁺ mejorada, es decir, una estabilidad mayor o menor, con un pH especialmente alto (es decir, pH 8-10.5) incluyen cualquiera de las mutaciones listadas en la sección "Propiedades alteradas".

Actividad específica y o expresión aumentada

[0130] En un aspecto adicional, las mutaciones importantes (incluyendo las sustituciones y deleciones de aminoácidos) con respecto a obtener variantes que presentan actividad específica alterada, en concreto actividad específica aumentada o disminuida, especialmente a temperaturas entre 10 °C y 60 °C, preferiblemente entre 20 °C y 50 °C, especialmente entre 30 °C y 40 °C, incluyen cualquiera de las mutaciones listadas en la sección "Propiedades alteradas". La actividad específica se puede determinar como se describe en la sección "Métodos" que aparece más adelante en el texto. En algunos casos, las mutaciones aumentan la expresión en lugar de o además de aumentar la actividad específica. Ejemplos de mutaciones son como siguen:

(a) una sustitución que introduce uno o varios de los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo consistente en 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, y 474S, o

(b) una sustitución que introduce uno o varios de los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo consistente en 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, 201 A, 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, y 471Y.

Estabilidad a la oxidación

[0131] Las variantes descritas pueden tener estabilidad a la oxidación alterada, en concreto estabilidad a la oxidación mayor, en comparación con la α -amilasa original. Una estabilidad a la oxidación mayor es ventajosa en, por ejemplo, composiciones detergentes y una estabilidad a la oxidación menor puede ser ventajosa en una composición para la licuefacción del almidón. La estabilidad a la oxidación se puede determinar como se describe en la sección "Métodos" que aparece más adelante en el texto.

Perfil de pH alterado

[0132] Las posiciones y las mutaciones importantes con respecto a obtener variantes con un perfil de pH alterado, en concreto una actividad mejorada con un pH especialmente alto (es decir, pH 8-10.5) o un pH bajo (es decir, pH 4-6) incluyen mutaciones de residuos de aminoácidos situados cerca de los residuos del sitio activo. En algunos casos, la actividad mejorada se observa, por ejemplo, con un pH < 6, con un pH < 5, o con un pH > 9.

- 5 **[0133]** Las mutaciones/sustituciones específicas preferidas son las listadas previamente en la sección "Propiedades alteradas" para las posiciones en cuestión. Se describen ensayos adecuados en la sección "Métodos" que aparece más adelante en el texto.

Rendimiento de lavado

- 10 **[0134]** Las posiciones y las mutaciones importantes con respecto a obtener variantes con rendimiento de lavado mejorado con pH especialmente alto (es decir, pH 8.5-11) incluyen las mutaciones/sustituciones específicas listadas previamente en la sección "Propiedades alteradas" para las posiciones en cuestión. El rendimiento de lavado se puede analizar como se describe en la sección "Métodos" que aparece más adelante en el texto.

Licuefacción del almidón

- 15 **[0135]** Algunas mutaciones tienen el efecto de reducir la viscosidad de una composición de almidón en comparación con la observada utilizando una α -amilasa "natural", tal como SPEZYME® Xtra. Ejemplos de mutaciones incluyen una sustitución que introduce uno o varios de los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo consistente en I181A, I181P, I181C, I181E, I181Y, S242A, S242E, S242Q, G132A, N193Y, y E188P.

Otras mutaciones en las variantes

- 20 **[0136]** En algunos aspectos, las presentes variaciones incluyen una o varias modificaciones además de las descritas previamente. Por ejemplo, puede ser ventajoso que uno o varios residuos de prolina se sustituyan por un residuo distinto de prolina. Ejemplos de residuos distintos de prolina incluyen alanina, glicina, serina, treonina, valina y leucina. De manera similar, puede ser ventajoso sustituir uno o varios residuos de cisteína por un residuo distinto de cisteína. Ejemplos de residuos distintos de cisteína incluyen serina, alanina, treonina, glicina, valina y leucina.

- 25 **[0137]** Además, puede ser ventajoso introducir mutaciones en una o varias de las siguientes posiciones (utilizando la SEQ ID N° 7 para la numeración): M15, V128, A111, H133, W138, T149, M197, N188, A209, A210, H405, T412, en concreto las siguientes mutaciones individuales, dobles, triples o múltiples:

- M15X, en concreto M15T,L;
 V128X, en concreto V128E;
 30 H133X, en concreto H133Y;
 N188X, en concreto N188S,T,P;
 M197X, en concreto M197T,L;
 A209X, en concreto A209V;
 M197T/W138F; M197T/138Y; M15T/H133Y/N188S;
 35 M15N128E/H133Y/N188S; E119C/S130C; D124C/R127C; H133Y/T1491;
 G475R, H133Y/S187D; H133Y/A209V.

- 40 **[0138]** En el caso de la α -amilasa original que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N° 7, los residuos de aminoácidos pertinentes que se pueden eliminar o sustituir con vistas a mejorar la estabilidad a la oxidación incluyen el único residuo de cisteína (C363) y los residuos de metionina situados en las posiciones M8, M9, M96, M200, M206, M284, M307, M311, M316 y M438 en la SEQ ID N° 2.

- 45 **[0139]** Con respecto a incrementar la estabilidad térmica de un variante de α -amilasa relacionada con su α -amilasa original, parece ser particularmente deseable eliminar al menos uno, y preferiblemente dos o incluso tres, de los siguientes residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N° 2 que son F178, R179, G180, I181, G182 y K183. Deleciones de este tipo en parejas particularmente valiosas son R179*+G180*; y I181*+G182* (SEQ ID N° 16 o 15, respectivamente) (o equivalentes de estas deleciones en parejas en otra α -amilasa que cumple los requisitos de una α -amilasa original en el contexto de la presente descripción).

[0140] Otras mutaciones de interés incluyen N193F y V416G, como se ejemplifica en la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID N° 2.

50 V. Métodos para preparar variantes de α -amilasa

[0141] En la técnica se conocen varios métodos para introducir mutaciones en los genes. Tras una breve exposición de la clonación de secuencias de ADN que codifican α -amilasas, se expondrán métodos para generar mutaciones en sitios específicos dentro de la secuencia que codifica α -amilasas.

A. Clonación y expresión de ácidos nucleicos que codifican una α -amilasa

[0142] La secuencia de ADN que codifica una α -amilasa original se puede aislar a partir de cualquier célula o microorganismo que produzca la α -amilasa en cuestión, utilizando diferentes métodos muy conocidos en la técnica. En primer lugar, se debería construir un ADN genómico y/o una genoteca de ADNc utilizando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la α -amilasa objeto de estudio. Entonces, si se conoce la secuencia de aminoácidos de la α -amilasa, se pueden sintetizar sondas oligonucleótidas homólogas y marcadas y utilizarlas para identificar clones que codifiquen α -amilasas a partir de una genoteca genómica preparada a partir del organismo en cuestión. De forma alternativa, una sonda de oligonucleótidos marcada que contiene secuencias homólogas a un gen de α -amilasa conocido se podría utilizar como sonda para identificar clones que codifiquen α -amilasas, utilizando unas condiciones de hibridación y de lavado de menor rigor.

[0143] Otro método para identificar clones que codifican la α -amilasa implicaría insertar fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformar bacterias de α -amilasa negativa con la genoteca de ADN genómico resultante, y después colocar en placas las bacterias transformadas sobre agar que contenga un sustrato para la α -amilasa, permitiendo de ese modo a los clones expresar la α -amilasa que se va a identificar.

[0144] De forma alternativa, la secuencia de ADN que codifica la enzima se puede preparar sintéticamente mediante métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de fosfoamidita descrito por S.L. Beaucage y M.H. Caruthers (1981) o el método descrito por Matthes *et al.* (1984). En el método de fosfoamidita se sintetizan oligonucleótidos, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se aparean, se ligan y se clonan en vectores apropiados.

[0145] Finalmente, la secuencia de ADN puede ser de origen mezclado genómico y sintético, de origen mezclado sintético y de ADNc o de origen mezclado genómico y de ADNc, preparado mediante la ligadura de fragmentos de origen sintético genómico o de ADNc (según convenga, los fragmentos correspondientes a diferentes partes de la secuencia completa de ADN), conforme a técnicas estándar. La secuencia de ADN también se puede preparar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) utilizando cebadores específicos, por ejemplo según se describe en la patente estadounidense nº 4.683.202.

B. Mutagénesis dirigida

[0146] Una vez que se ha aislado una secuencia de ADN que codifica α -amilasas y se han identificado sitios deseables para la mutación, se pueden introducir mutaciones utilizando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados; se insertan nucleótidos mutantes durante la síntesis de oligonucleótidos. En un método específico, se crea un espacio de ADN monocatenario, el cual conecta la secuencia que codifica la α -amilasa, en un vector que lleva el gen de la α -amilasa. Entonces se aparea el nucleótido sintético, el cual soporta la mutación deseada, con una parte homóloga del ADN monocatenario. El espacio restante se llena después con ADN polimerasa I (fragmento Klenow) y la construcción se liga utilizando ligasa T4.

[0147] Otro método para introducir mutaciones en secuencias de ADN que codifican α -amilasas implica la generación en 3 fases de un fragmento de PCR que contenga la mutación deseada introducida utilizando una hebra de ADN sintetizada químicamente como uno de los cebadores en las reacciones de PCR. A partir del fragmento generado mediante PCR, se puede aislar un fragmento de ADN que lleve la mutación mediante escisión con endonucleasas de restricción y reinsertarlo en un plásmido de expresión.

[0148] Los métodos alternativos para proporcionar variantes incluyen transposiciones genéticas, por ejemplo, como se describe en WO 95/22625 (de Affymax Technologies N.V.) o en WO 96/00343 (de Novo Nordisk A/S), u otras técnicas correspondientes que dan como resultado una enzima híbrida que comprende la(s) mutación(es), por ejemplo, la(s) sustitución(es) y/o la(s) eliminación(es) en cuestión.

C. Expresión de variantes de α -amilasa

[0149] Una secuencia de ADN que codifica una variante producida mediante los métodos descritos previamente, o mediante métodos alternativos, se puede expresar utilizando un vector de expresión, que incluye normalmente secuencias de control que codifican un promotor, un operador, un sitio de unión de ribosomas, una señal de inicio de traslado, y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores.

[0150] El vector de expresión recombinante que lleva la secuencia de ADN que codifica una variante de α -amilasa puede ser cualquier vector que pueda someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá a menudo de la célula huésped en la cual se ha de introducir. De este modo, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un bacteriófago o un elemento extracromosómico, minicromosoma o un cromosoma artificial. De forma alternativa, el vector puede ser uno que, al introducirlo en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el/los cromosoma(s) en el/los que se ha integrado.

[0151] La secuencia de ADN debería estar conectada operativamente a una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y que pueda derivarse de genes que codifican proteínas ya sean homólogas o heterólogas a la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN que codifica una variante de α -amilasa, especialmente en un huésped bacteriano, son el promotor del operón *lac* de *E. coli*, los promotores *dagA* del gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor*, los promotores del gen de α -amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, los promotores del gen de amilasa maltogénica de *G. stearothermophilus* (*amyM*), los promotores de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* (*amyQ*), los promotores de los genes *xylA* y *xylB* de *B. subtilis* etc. Para la transcripción en un huésped fúngico, son ejemplos de promotores útiles aquellos derivados del gen que codifica la amilasa TAKA de *A. oryzae*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la α -amilasa neutra de *A. niger*, la α -amilasa estable en ácido de *A. niger*, la glucoamilasa de *A. niger*, la lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteasa alcalina de *A. oryzae*, la triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae* o la acetamidasa de *A. nidulans*.

[0152] El vector de expresión también puede comprender un terminador de transcripción adecuado y, en eucariotas, secuencias de poliadenilación operativamente conectadas a la secuencia de ADN que codifica una variante de α -amilasa. Las secuencias de terminación y poliadenilación pueden derivarse de manera adecuada de las mismas fuentes que el promotor.

[0153] El vector también puede comprender una secuencia de ADN que permita al vector replicarse en la célula huésped en cuestión. Son ejemplos de secuencias de este tipo los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19; pACYC177; pUB110; pE194, pAMB1 y pIJ702.

[0154] El vector también puede comprender un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped, tal como los genes *dal* de *B. subtilis* o de *B. licheniformis*, o uno que confiere resistencia antibiótica como resistencia a la ampicilina, a la kanamicina, al cloranfenicol o a la tetraciclina. Además, el vector puede comprender marcadores de selección de *Aspergillus* tales como *amdS*, *argB*, *niaD* y *sC*, un marcador que da origen a resistencia a la higromicina, o la selección se puede realizar mediante cotransformación, por ejemplo, como se describe en WO 91/17243.

[0155] Aunque la expresión intracelular puede ser ventajosa en algunos aspectos, por ejemplo, al utilizar ciertas bacterias como células huéspedes, generalmente se prefiere que la expresión sea extracelular. En general, las α -amilasas de *Bacillus* mencionadas en el presente documento comprenden una preregión que permite la secreción de la proteasa expresada en el medio de cultivo. Si se desea, se puede sustituir esta preregión por una preregión diferente o secuencia señal, llevada a cabo convenientemente mediante la sustitución de las secuencias de ADN que codifican las respectivas preregiones.

[0156] Los procedimientos utilizados para ligar el constructo de ADN que codifica una variante de α -amilasa, el promotor, terminador y otros elementos, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son muy conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, Sambrook *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor, 1989).

[0157] La célula que comprende un constructo de ADN o un vector de expresión se utiliza ventajosamente como célula huésped en la producción recombinante de una variante de α -amilasa. La célula se puede transformar con el constructo de ADN que codifica la variante, integrando convenientemente el constructo de ADN (en una o varias copias) en el cromosoma huésped. Esta integración se considera generalmente como una ventaja puesto que es más probable que la secuencia de ADN se mantenga establemente en la célula. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped se puede realizar según métodos convencionales, por ejemplo, mediante recombinación homóloga o heteróloga. De forma alternativa, la célula se puede transformar con un vector de expresión como se describe previamente en relación con los diferentes tipos de células huésped.

[0158] La célula puede ser una célula de un organismo superior tal como un mamífero o un insecto, pero preferiblemente es una célula microbiana, por ejemplo, una célula bacteriana o fúngica (incluyendo la levadura).

[0159] Son ejemplos de bacterias adecuadas las bacterias Gram positivas tales 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*, o *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas tales como *E. coli*. La transformación de las bacterias se puede efectuar, por ejemplo, mediante transformación de los protoplastos o utilizando células competentes de una manera conocida *per se*.

[0160] El organismo de levadura se puede seleccionar favorablemente de una especie de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. El hongo filamentoso puede pertenecer ventajosamente a una especie de *Aspergillus*, por ejemplo, *A. oryzae* o *A. niger*. Las células fúngicas se pueden transformar mediante un proceso que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguida de la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. En EP 238 023 se describe un procedimiento adecuado para transformar células huésped de *Aspergillus*.

[0161] Un aspecto de las presentes composiciones y métodos se refiere a producir una variante de α -amilasa cultivando una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción de la variante de amilasa y la recuperación de la variante de amilasa a partir de las células y/o el medio de cultivo. El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para cultivar la célula huésped en cuestión y obtener la expresión de la variante de α -amilasa. Los medios adecuados se encuentran disponibles a partir de proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas (por ejemplo, como se describe en catálogos de la ATCC).

[0162] La variante de α -amilasa segregada a partir de las células huésped se puede recuperar convenientemente a partir del medio de cultivo mediante procedimientos muy conocidos, que incluyen la separación de las células del medio mediante centrifugación o filtración, y la precipitación de componentes proteínicos del medio mediante una sal tal como sulfato de amonio, seguida de la utilización de procedimientos cromatográficos tales como la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de afinidad, o similares.

VI. Aplicaciones industriales

[0163] Las presentes variantes de α -amilasa poseen propiedades valiosas que permiten diferentes aplicaciones industriales. Por ejemplo, las variantes se pueden utilizar para el procesamiento/conversión de almidón, por ejemplo, para la licuefacción del almidón (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 3.912.590, la solicitud de patente EP nºs 252 730 y 63 909, WO 99/19467, y WO 96/28567).

[0164] Las variantes pueden ser útiles además en la producción de edulcorantes y etanol (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 5.231.017), tales como, etanol para combustible, para bebidas o industrial, a partir de almidón o de granos enteros. Las variantes pueden ser útiles además en la fabricación o elaboración de cerveza. Las variantes pueden estar en forma de composiciones, que pueden incluir además, por ejemplo, una glucoamilasa, una pululanasa y otra α -amilasa, además de tampones adecuados, agentes estabilizadores, conservantes y similares.

[0165] Las variantes de amilasa también son útiles para el lavado de ropa, para el lavado de vajilla y para la limpieza de superficies duras, como componentes de composiciones detergentes. Las variantes también pueden ser útiles para el desaprestado de textiles, tejidos y prendas (véase, por ejemplo, WO 95/21247, la patente estadounidense Nº 4.643.736, EP 119.920), y en la producción de pulpa y de papel.

[0166] Estos y otros usos de las presentes composiciones y métodos se describen con más detalle más adelante en el texto.

A. Aplicaciones de procesamiento de grano y de conversión de almidón

[0167] Las aplicaciones de procesamiento de grano y de conversión de almidón se dividen en dos categorías, a saber (1) conversión de almidón general, que abarca la conversión de almidón en, por ejemplo, maltodextrinas, jarabe de dextrosa y jarabe de alto contenido en fructosa, (2) producción de etanol, y (3) elaboración de cerveza. Aunque muchas etapas implicadas en estos procesos son similares, se describen por separado. En algunos casos, la variante de α -amilasa se utiliza en combinación con una fitasa (4). También se describen composiciones para llevar a cabo estas aplicaciones (5).

1. Conversión de almidón general

[0168] Los procesos de conversión de almidón convencionales, tales como los procesos de licuefacción y de sacarificación, se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense nº 3.912.590 y en las publicaciones de patentes EP nºs 252.730 y 63.909. Generalmente, el proceso de conversión de almidón degrada el almidón a componentes de carbohidratos de peso molecular más bajo. En el caso de convertir el almidón en un azúcar, el almidón se despolimeriza en un proceso que implica una etapa de pretratamiento y dos o tres etapas de procesos consecutivos, es decir, un proceso de licuefacción, un proceso de sacarificación y, dependiendo del producto final deseado, un proceso de isomerización opcional.

a. Pretratamiento de almidón nativo/crudo

[0169] El almidón nativo/crudo consiste en gránulos microscópicos, que son insolubles en agua a temperatura ambiente. Cuando se calienta una suspensión de almidón acuosa, los gránulos se hinchan y finalmente explotan, dispersando las moléculas de almidón en la solución. Durante este proceso de "gelatinización", se da un incremento espectacular en la viscosidad. Puesto que el nivel en los sólidos es de 30 % - 40 % en un proceso industrial típico, el almidón tiene que diluirse o "licuificarse" para poder manejarlo. Esta reducción en la viscosidad se obtiene convencionalmente mediante degradación enzimática.

b. Licuefacción

[0170] Durante la etapa de licuefacción, se degradan moléculas de almidón de cadena larga en moléculas lineales y ramificadas más cortas (maltodextrinas) mediante una α -amilasa. El proceso de licuefacción generalmente se lleva a cabo a aproximadamente 105 °C-110 °C durante aproximadamente de 5 a 10 minutos

seguido de 1-2 horas a 95 °C. El pH está normalmente entre aproximadamente 5.5 y 6.2. Con el fin de asegurar una estabilidad enzimática óptima bajo estas condiciones, normalmente se añade 1 mM de calcio (40 ppm de iones sin calcio). Después de este tratamiento, el almidón licuificado tendrá un "equivalente de dextrosa" (DE) de 10-15.

5 **c. Sacarificación**

[0171] Después del proceso de licuefacción, las maltodextrinas se convierten en dextrosa mediante la adición de una glucoamilasa (por ejemplo, OPTIDEX® L-400) y una enzima desramificante, tal como una isoamilasa (patente estadounidense nº 4.335.208) o una pululanasa. Antes de esta etapa, el pH se reduce a un valor por debajo de aproximadamente 4.5, mientras se mantiene la temperatura alta (por encima de 95 °C), para inactivar la α-amilasa licuefactante para reducir la formación de oligosacáridos cortos llamados "precursores de panosa" que la enzima desramificante no puede hidrolizar correctamente. La temperatura se baja a 60 °C y se añaden la glucoamilasa y la enzima desramificante. El proceso de sacarificación continúa durante 24-72 horas.

[0172] Normalmente, cuando se desnaturaliza la α-amilasa después de la etapa de licuefacción, aproximadamente 0,2 % - 0,5 % del producto de sacarificación es el trisacárido ramificado Glc α 1-6Glc α 1-4Glc (panosa), que no puede degradarse mediante una pululanasa. Si la amilasa activa de la etapa de licuefacción está presente durante la sacarificación (es decir, sin desnaturalizar), este nivel puede ser tan alto como 1 % - 2 %, que es altamente indeseable puesto que disminuye el rendimiento de la sacarificación significativamente.

d. Isomerización

[0173] Cuando el producto de azúcar final deseado es, por ejemplo, jarabe de alto contenido en fructosa, el jarabe de dextrosa se puede convertir en fructosa. Después del proceso de sacarificación, se aumenta el pH a un valor comprendido en el intervalo de aproximadamente 6-8, preferiblemente pH 7.5, y se elimina el calcio mediante intercambio iónico. El jarabe de dextrosa se convierte entonces en jarabe de alto contenido en fructosa utilizando, por ejemplo, una glucosa isomerasa inmovilizada (tal como GENSWEET® IGI-HF).

25 **2. Producción de etanol**

[0174] En la producción de alcohol (etanol) general a partir de granos enteros se puede separar en 4 etapas principales, es decir, (a) molienda, (b) licuefacción, (c) sacarificación, y (d) fermentación. Algunas de estas etapas son similares a las descritas previamente.

a. Molienda y producción de suspensión

[0175] Un sustrato que contiene almidón, tal como grano, maíz, milo, o similar, se muele para abrir la estructura y permitir procesamiento adicional. Los dos procesos utilizados se denominan generalmente molienda en húmedo o en seco. En la molienda en seco, se muele grano entero y se utiliza en la parte restante del proceso. La molienda en húmedo separa eficazmente el germen y la harina (gránulos de almidón y proteína) y se aplica, con unas cuantas excepciones, en lugares en donde existe una producción similar de jarabes.

[0176] El material que contiene almidón molido se combina con agua y se recicla la vinaza dando como resultado una suspensión acuosa. La suspensión comprenderá entre 15 % y 55 % de residuo seco en peso/peso (por ejemplo, entre 20 % y 50 %, entre 25 % y 50 %, entre 25 % y 45 %, entre 25 % y 40 %, entre 20 % y 35 % y entre 30 % y 36 % de residuo seco). La vinaza reciclada (conocida también como "backset") está normalmente en el intervalo de 10 % a 70 % en volumen/volumen (por ejemplo, de 10 % a 60 %, de 10 % a 50 %, de 10 % a 40 %, de 10 % a 30 %, de 10 % a 20 %, de 20 % a 60 %, de 20 % a 50 %, de 20 % a 40 % y también de 20 % a 30 %). De 25 % a 40 % de residuo seco es bastante común.

[0177] Una vez que el material que contiene almidón molido se combina con agua y *backset*, normalmente el pH no se ajusta en la suspensión. Además, el pH no se ajusta después de la adición de la fitasa (véase más adelante) y la α amilasa a la suspensión. El pH de la suspensión estará normalmente en el intervalo comprendido entre pH 4.5 y menos de 6.0 (por ejemplo, pH entre 4.5 y 5.8, pH entre 4.5 y 5.6, pH entre 4.8 y 5.8, pH entre 5.0 y 5.8, pH entre 5.0 y 5.4, pH entre 5.2 y 5.5 y pH entre 5.2 y 5.9). El pH de la suspensión puede estar entre pH 4.5 y 5.2 dependiendo de la cantidad de vinaza añadida a la suspensión y del tipo de material que comprende la vinaza fina. Por ejemplo, el pH de la vinaza puede estar entre pH 3.8 y pH 4.5. La Tabla B ilustra el cambio de pH que tiene lugar con la adición de cantidades crecientes de vinaza a una suspensión de maíz molido entero (32 % de residuo seco) después de agitarla durante 2 horas a 155 °F.

Tabla B. Cambio de pH que tiene lugar con la adición de cantidades crecientes de vinaza

% peso/peso de vinaza	pH final
0	5.52
20	5.29
40	5.16

50	5.09
60	5.05
80	4.98
100	4.94

[0178] Cabe mencionar que durante la producción de etanol se pueden añadir ácidos para disminuir el pH de la cerveza con el fin de reducir el riesgo de contaminación microbiana antes de la destilación.

5 [0179] En algunos casos, se añade fitasa a la suspensión. Las fitasas se describen con más detalle más adelante en el texto. En algunos casos, se añade una α -amilasa a la suspensión. En algunos casos, se añade una fitasa y una α -amilasa a la suspensión secuencialmente. En algunos casos, se añaden una fitasa y una α -amilasa simultáneamente. En algunos casos, la suspensión que comprende la fitasa y la α -amilasa se incuba (pretrata) durante un periodo comprendido entre 5 minutos y 8 horas (por ejemplo, entre 5 minutos y 6 horas, entre 5 minutos y 4 horas, entre 5 minutos y 2 horas y entre 15 minutos y 4 horas). En otros casos, la suspensión
10 se incuba a una temperatura comprendida entre 40 °C y 115 °C (por ejemplo, entre 45 °C y 80 °C, entre 50 °C y 70 °C, entre 50 °C y 75 °C, entre 60 °C y 110 °C, entre 60 °C y 95 °C, entre 70 °C y 110 °C, entre 70 °C y 85 °C y entre 77 °C y 86 °C).

15 [0180] En algunos casos, la suspensión se incuba a una temperatura comprendida entre 0 °C y 30 °C (por ejemplo, entre 0 °C y 25 °C, entre 0 °C y 20 °C, entre 0 °C y 15 °C, entre 0 °C y 10 °C y entre 0 °C y 5 °C) por debajo de la temperatura de gelatinización del almidón del material que contiene almidón. En algunos casos, la temperatura está por debajo de 68 °C, por debajo de 65 °C, por debajo de 62 °C, por debajo de 60 °C, o incluso por debajo de 55 °C. En algunos modos de realización, la temperatura está por encima de 45 °C, por encima de 50 °C, por encima de 55 °C, e incluso por encima de 60 °C. La incubación de la suspensión que comprende una fitasa y una α -amilasa a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización del almidón se puede denominar una licuefacción primaria (1^a).
20

[0181] Actualmente, se cree que las α -amilasas microbianas disponibles comercialmente utilizadas en el proceso de licuefacción no son suficientemente estables para producir un sustrato de almidón licuificado a partir de un proceso de molienda seco utilizando grano entero molido a una temperatura por encima de aproximadamente 80 °C con un pH menor que pH 5.6. Generalmente, la estabilidad de muchas α -amilasas disponibles comercialmente se reduce a un pH inferior a aproximadamente 4.0.
25

b. Licuefacción

[0182] En el proceso de licuefacción, los gránulos de almidón se solubilizan mediante hidrólisis a maltodextrinas en su mayor parte de un DP mayor de 4. La materia prima puede ser grano entero molido o una corriente lateral del procesamiento del almidón. El grano molido y licuificado se conoce también como masa. La hidrólisis se
30 puede llevar a cabo mediante el tratamiento con ácido o enzimáticamente mediante α -amilasa. La hidrólisis con ácido se utiliza de forma limitada.

[0183] La licuefacción enzimática normalmente se lleva a cabo en un proceso de suspensión en caliente de tres etapas. La suspensión se calienta a entre 60 °C y 95 °C (preferiblemente entre 77 °C y 86 °C, entre 80 °C y 85 °C y entre 83 °C y 85 °C) y se añade(n) la(s) enzima(s). Entonces la suspensión se cuece con vapor a presión (*jet cooking*) a entre 95 °C y 140 °C, preferiblemente entre 105 °C y 125 °C, se enfría a entre 60 °C y 95 °C y se
35 añade(n) más enzima(s) para obtener la hidrólisis final. El proceso de licuefacción se lleva a cabo con un pH comprendido entre 4.0 y 6.5, normalmente con un pH comprendido entre 5 y 6.

[0184] La suspensión se puede incubar con una α -amilasa y, opcionalmente, una fitasa (descrita en el presente documento) e incubarse durante 5 minutos a 2 horas, a una temperatura comprendida entre 60 °C y 75 °C. En una etapa de licuefacción adicional, el material que contiene almidón incubado o pretratado puede estar expuesto a un incremento de la temperatura tal como de 0 °C a 45 °C por encima de la temperatura de gelatinización del almidón del material que contiene almidón (por ejemplo, de 70 °C a 120 °C, de 70 °C a 110 °C, y de 70 °C a 90 °C) durante un periodo de tiempo de 2 minutos a 6 horas (por ejemplo, de 2 minutos a 4 horas, 90 minutos, 140 minutos y de 90 a 140 minutos) con un pH comprendido entre aproximadamente 4.0 y 5.5, más
40 preferiblemente entre 1 hora y 2 horas. Se puede aumentar la temperatura mediante un sistema *jet cooking* convencional de alta temperatura durante un periodo de tiempo corto, por ejemplo de 1 a 15 minutos. Entonces el almidón se puede hidrolizar de forma adicional a una temperatura comprendida entre 75 °C y 95 °C, (por ejemplo, entre 80 °C y 90 °C y entre 80 °C y 85 °C) durante un periodo de tiempo de 15 a 150 minutos (por ejemplo, de 30 a 120 minutos). El pH puede no ajustarse durante estas etapas de procesamiento y el pH de la masa licuificada está comprendido entre pH 4.0 y pH 5.8 (por ejemplo, pH entre 4.5 y 5.8, pH entre 4.8 y 5.4, y pH entre 5.0 y 5.2). En algunos modos de realización, se añadirá una segunda dosis de α -amilasa termoestable a la etapa de licuefacción secundaria, pero en otros modos de realización, no habrá una dosis adicional de α -amilasa.
50

[0185] Las etapas de incubación y licuefacción pueden estar seguidas por las etapas de sacarificación y fermentación.
55

c. Fermentación

[0186] Los azúcares fermentables obtenidos durante las etapas de proceso de licuefacción se pueden utilizar para producir alcohol, en concreto etanol, mediante fermentación microbiana. El organismo utilizado en las fermentaciones dependerá del producto final deseado.

5 [0187] Normalmente, si el etanol es el producto final deseado se utilizará la levadura como organismo de fermentación. En algunos modos de realización preferidos, el organismo que produce etanol es una levadura y específicamente *Saccharomyces* tal como cepas de *S. cerevisiae* (patente estadounidense 4.316.956). Diversas *S. cerevisiae* están comercialmente disponibles e incluyen, pero sin carácter limitativo, FALI (Fleischmann's Yeast), SUPERSTART (Alltech), FERMIOL (DSM Specialties), RED STAR (Lesaffre) y Angel alcohol yeast
10 (Angel Yeast Company, China). La cantidad de levadura inicial empleada en los métodos es una cantidad efectiva para producir un cantidad de etanol comercialmente significativa en una cantidad de tiempo adecuada, (por ejemplo, para producir al menos 10 % de etanol a partir de un sustrato que tiene entre 25 % y 40 % de residuo seco en menos de 72 horas). Las células de levadura se proporcionan generalmente en cantidades de 10^4 a 10^{12} , y preferiblemente de 10^7 a 10^{10} de levadura viable por ml de caldo de fermentación. La fermentación
15 incluirá además de un microorganismo de fermentación (por ejemplo, levadura), nutrientes, opcionalmente enzimas adicionales, que incluyen, pero sin carácter limitativo, fitasas. La utilización de levadura en la fermentación se conoce muy bien y se hace referencia a *THE ALCOHOL TEXTBOOK*, K. JACQUES ET AL., EDS. 1999, NOTTINGHAM UNIVERSITY PRESS, REINO UNIDO. La fermentación de la levadura se lleva a cabo normalmente durante de 24 a 96 horas, normalmente de 35 a 60 horas. La temperatura de la fermentación
20 está comprendida normalmente entre 26 °C y 34 °C, por ejemplo, aproximadamente 32 °C, y el pH está entre aproximadamente 3 y 6, preferiblemente alrededor de 4 y 5.

[0188] Utilizando microorganismos de fermentación apropiados, se pueden obtener otros productos finales, que incluyen, pero sin carácter limitativo, glicerol, 1,3-propanodiol, gluconato, 2-ceto-D-gluconato, 2,5-diceto-D-gluconato, ácido 2-ceto-L-gulónico, ácido succínico, ácido láctico, amino ácidos y derivados de los mismos. Por
25 ejemplo, cuando el ácido láctico es el producto final deseado, se puede utilizar una *Lactobacillus sp. (L. casei)*. Cuando el glicerol o el 1,3-propanodiol son los productos finales deseados, se puede utilizar *E. coli*. Cuando el 2-ceto-D-gluconato, el 2,5-diceto-D-gluconato, y el ácido 2-ceto-L-gulónico son los productos finales deseados, se puede utilizar *Pantoea citrea*.

d. Sacarificación y SSF

30 [0189] El material que contiene almidón licuificado se sacarifica en presencia de enzimas de sacarificación tales como glucoamilasas. El proceso de sacarificación puede durar de 12 horas a 120 horas (por ejemplo, de 12 a 90 horas, de 12 a 60 horas y de 12 a 48 horas). No obstante, es común llevar a cabo una etapa de presacarificación de aproximadamente 30 minutos a 2 horas (por ejemplo, de 30 a 90 minutos) en un intervalo de temperaturas comprendido entre 30 °C y 65 °C, normalmente por encima de 50 °C y a menudo alrededor de 60 °C, que es
35 seguida por una sacarificación completa durante la fermentación. A esta última etapa se le puede denominar sacarificación y fermentación simultánea (SSF, por sus siglas en inglés). La SSF es común en la producción de etanol, donde las enzimas de sacarificación y los organismos de fermentación (por ejemplo, levadura) se añaden conjuntamente y entonces se lleva a cabo a una temperatura de 30 °C a 40 °C y con un pH entre 4.2 y 4.8, preferiblemente pH 4.5.

40 [0190] Los azúcares fermentables (por ejemplo, dextrinas, monosacáridos, particularmente glucosa) se producen a partir de sacarificación enzimática. Estos azúcares fermentables se pueden purificar adicionalmente y/o convertir en productos de azúcar útiles. Además, los azúcares se pueden utilizar como materia prima de fermentación en un proceso de fermentación microbiana para producir productos finales, tales como alcohol (por ejemplo, etanol y butanol), ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido succínico y ácido láctico), alcoholes de azúcar
45 (por ejemplo, glicerol), compuestos intermedios de ácido ascórbico (por ejemplo, 2-ceto-D-gluconato, 2,5-diceto-D-gluconato y ácido 2-ceto-L-gulónico), aminoácidos (por ejemplo, lisina), proteínas (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de los mismos).

e. Destilación

50 [0191] Opcionalmente, después de la fermentación se puede recuperar alcohol (por ejemplo, etanol) mediante destilación. La producción de etanol es normalmente al menos 8 %, al menos 10 %, al menos 12 %, al menos 14 %, al menos 15 %, al menos 16 %, al menos 17 %, al menos 18 % (volumen/volumen), y en algunos casos, al menos 19 %, al menos 20 %, al menos 21 %, al menos 22 %, e incluso al menos 23 % (volumen/volumen). El etanol obtenido se puede utilizar como, por ejemplo, etanol para combustibles, etanol para bebidas, es decir, alcohol neutro potable; o etanol industrial.

f. Subproductos

55 [0192] El residuo del proceso de fermentación es el grano ya procesado, que normalmente se utiliza para piensos ya sea en forma líquida o seca. El grano ya procesado puede tomar la forma de los denominados

“coproductos de fermentación”, tales como granos secos de destilería (DDG) y granos secos de destilería con solubles (DDGS), que también se pueden utilizar en piensos.

3. Elaboración de cerveza

5 [0193] Las presentes variantes de α -amilasas pueden ser útiles en un proceso de elaboración de cerveza. Normalmente, las α -amilasas se añaden durante el proceso de macerado, donde se obtienen sus ventajas, en términos de estabilidad, actividad específica y similares, como en el caso de la conversión del almidón.

4. Utilización de variantes de α -amilasas en combinación con otras enzimas

10 [0194] En todos los aspectos de la licuefacción, la sacarificación, la SSF y el procesamiento de carbohidratos, generalmente, los presentes polipéptidos de variante de α -amilasa se pueden utilizar en combinación con una o más enzimas de adición, por ejemplo, una α -amilasa adicional, una glucoamilasa, una isoamilasa, una β -amilasa, una amilasa maltogénica, una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, una esterasa, una oxidasa, una pectinasa, una pectina liasa, una cutinasa, una lacasa y/o una fitasa. Muchas de estas enzimas se describen con más detalle con relación a aplicaciones de limpieza.

15 [0195] Las fitasas son enzimas capaces de descomponer el ácido fítico (fitato) que se encuentra en los granos y en las semillas oleaginosas. Se cree que el fitato, así como compuestos intermedios en su degradación, desestabilizan o afectan adversamente de otra manera a las α -amilasas, reduciendo así su eficiencia.

20 [0196] Las fitasas que se pueden utilizar en combinación con variantes de α -amilasas son capaces de hidrolizar ácido fítico bajo las condiciones definidas de las etapas de incubación y licuefacción. En algunos modos de realización, la fitasa es capaz de liberar al menos un fosfato inorgánico de un hexafosfato de inositol (ácido fítico). Las fitasas se pueden agrupar según su preferencia por una posición específica del grupo éster fosfato en la molécula de fitato en la que se inicia la hidrólisis (por ejemplo, como 3-fitasas (EC 3.1.3.8) o como 6-fitasas (EC 3.1.3.26)). Un ejemplo típico de fitasa es mio-inositol-hexakisfosfato-3-fosfohidrolasa.

25 [0197] Las fitasas se pueden obtener de microorganismos tales como organismos fúngicos y bacterianos. Algunos de estos microorganismos incluyen, por ejemplo, *Aspergillus* (por ejemplo, *A. niger*, *A. terreus*, *A. ficum* y *A. fumigatus*), *Myceliophthora* (*M. thermophila*), *Talaromyces* (*T. thermophilus*) *Trichoderma spp* (*T. reesei*). y *Thermomyces* (WO 99/49740). También las fitasas están disponibles de especies de *Penicillium*, por ejemplo, *P. hordei* (ATCC N° 22053), *P. piceum* (ATCC N° 10519), o *P. brevi-compactum* (ATCC N° 48944). Véase, por ejemplo, la patente estadounidense 6.475.762. Además, las fitasas están disponibles de *Bacillus* (por ejemplo, *B. subtilis*, *Pseudomonas*, *Peniophora*, *E. coli*, *Citrobacter*, *Enterbacter* y *Buttiauxella* (véase WO2006/043178).

30 [0198] Las fitasas comerciales están disponibles tales como NATUPHOS® (BASF), RONOZYME® P (Novozymes A/S), PHZYME® (Danisco A/S, Diversa) y FINASE® (AB Enzymes). El método para determinar la actividad de fitasa microbiana y la definición de una unidad de fitasa ha sido publicada por Engelen *et al.* (1994) J. AOAC Int. 77:760 - 764. La fitasa puede ser una fitasa natural, una variante o un fragmento de la misma.

35 [0199] Los ejemplos de fitasas se derivan de especies de la bacteria *Buttiauxiella*. La *Buttiauxiella spp.* incluye *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. ferragutiase*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae*, y *B. warmboldiae*. Cepas de la especie *Buttiauxella* están disponibles en DSMZ, el Centro nacional de recursos de material biológico alemán (Inhoffenstrabe 7B, 38124 Braunschweig, Alemania). La cepa P1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada con el número de muestreo NCIMB 41248 es un ejemplo de una cepa especialmente útil de la que se puede obtener una fitasa. La fitasa puede ser BP-natural, una variante de la misma (tal como BP-11) descrita en WO 06/043178, o una variante como se describe en la publicación patente estadounidense n° US20080220498, presentada el 6 de marzo de 2007 (véase, por ejemplo, la Tabla 1 y la SEQ ID N° 3).

45 [0200] La fitasa también puede ser la variante BP-17 de la fitasa de *Buttiauxiella*, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19, que se muestra a continuación, o una fitasa que tenga al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 88 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % e incluso al menos 99 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID N° 19.

50 NDTPASGYQV EKVVILSRHG VRAPTKMTQT MRDVPNTWP EWPVKLGYYT
 PRGEHLISLM GGFYRQKFQQ QGILSQGSCP TPNSIYVWAD VDQRTLKTGE
 AFLAGLAPQC GLTIHHQQNL EKADPLFHPV KAGTCSMDKT QVQQAVEKEA
 QTPIDNLNQH YIPFLALMNT TLNFSTSAWC QKHSADKSCD LGLSMP SKLS
 IKDNGNKVAL DGAIGLSSTL AEIFLLEYAQ GMPQAAGNI HSEQEWASLL
 KLHNQFDFLM ARTPYIARHN GTPLLQAISN ALNPNATESK LPDISPDNKI
 LFIAGHDTNI ANIAGMLNMR WTLPQPDNT PPGGALVFER LADKSGKQYV
 SVSMVYQTLQQLRSQTPLSL NQPAGSVQLK IPGCNDQTAE GYCPLSTFTR
 VVSQSVVEPGC QLQ (SEQ ID NO:19)

[0201] La cantidad (dosis) de fitasa utilizada en los procesos de incubación y/o licuefacción puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,001 a 50 FTU/g de residuo seco, (por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 25 FTU/g de residuo seco, de aproximadamente 0,01 a 15 FTU/g de residuo seco, de aproximadamente 0,01 a 10 FTU/g de residuo seco, de aproximadamente 0,05 a 15 FTU/g de residuo seco, y de aproximadamente 0,05 a 5,0 FTU/g.

5. Composiciones para el procesamiento del grano y la conversión del almidón

[0202] Un aspecto de las presentes composiciones y métodos es una composición que comprende una o varias de las variantes de α -amilasas para utilizarse en la conversión de almidón, que incluye la conversión de almidón general, la fermentación de alcohol, la elaboración de cerveza y similares. Tales composiciones pueden incluir tampones, sales, minerales, estabilizantes, conservantes, agentes antimicrobianos, tintes, fragancias y similares, seleccionados para proteger la(s) variante(s) de α -amilasa(s) de una degradación prematura (incluyendo la proteólisis), para prolongar el almacenamiento, mejorar la apariencia, asignar un código de color a la composición y similares.

[0203] Las composiciones pueden incluir además enzimas adicionales en relación con la conversión de almidón, que incluyen, por ejemplo, glucoamilasas y fitasas. Glucoamilasas concretas son G1 o G2 AMG de *Aspegillus niger*, que se describen en Boel *et al.* (1984) EMBO J. 3:1097-1102 o una variante de las mismas, como se describe en WO 00/04136 o en WO 01/04273), la AMG de *Talaromyces emersonii*, como se describe en WO 99/28448, o la glucoamilasa de *Trichoderma reesei*, como se describe en WO 06/060062.

B. Producción de pulpa y papel

[0204] Las presentes variantes de α -amilasas también se pueden utilizar en la producción de materiales lignocelulósicos, tales como pulpa, papel y cartón, a partir de papel y cartón usados reforzados con almidón, especialmente cuando el repulpeo ocurre con un pH por encima de 7, y cuando las amilasas facilitan la desintegración del material residual a través de la degradación del almidón de refuerzo. Las variantes de α -amilasas son especialmente útiles en un proceso para producir una pulpa para fabricar papel a partir de papel impreso recubierto con almidón. El proceso se puede llevar a cabo como se describe en WO 95/14807, y comprende las etapas de: (a) desintegrar el papel para producir una pulpa, (b) tratarla con una enzima que degrade el almidón antes, durante o después de la etapa (a), y (c) separar las partículas de tinta de la pulpa después de las etapas (a) y (b).

[0205] Las α -amilasas también pueden ser útiles cuando se utiliza el almidón enzimáticamente modificado en la fabricación del papel junto con cargas alcalinas tales como carbonato de calcio, caolín y arcillas. Con las presentes variantes de α -amilasas es posible modificar el almidón en presencia de la carga, permitiendo de esta manera un proceso integrado más simple.

C. Desaprestado de textiles, tejidos y prendas

[0206] Las presentes variantes de α -amilasas también pueden ser útiles en el desaprestado de textiles, tejidos o prendas. En la industria del procesamiento textil, las α -amilasas se utilizan tradicionalmente como auxiliares en el proceso de desaprestado para facilitar la eliminación del apresto que contiene almidón, que ha servido como un recubrimiento protector de los hilos de tramas durante el tejido. La eliminación completa del apresto después del tejido es importante para asegurar resultados óptimos en los procesos posteriores, en los que el tejido se descrua, se blanquea y se tiñe. Se prefiere la descomposición enzimática del almidón debido a que no implica ningún efecto dañino en el material de las fibras.

[0207] Con el fin de reducir el coste del procesamiento y aumentar el rendimiento de la molienda, algunas veces se combina el procesamiento del desaprestado con las etapas de descruado y blanqueo. En tales casos, se utilizan los auxiliares no enzimáticos tales como el álcali o los agentes de oxidación para descomponer el almidón, puesto que las α -amilasas tradicionales no son muy compatibles con niveles de pH altos ni con agentes de blanqueo. La descomposición no enzimática del apresto del almidón causa algunos daños en las fibras debido a las sustancias químicas más bien agresivas utilizadas. Por consiguiente, sería deseable utilizar las variantes de α -amilasas que ofrecen un rendimiento mejorado en soluciones alcalinas. Tales variantes se pueden utilizar solas o en combinación con una celulasa en el desaprestado de tejidos o textiles que contienen celulosa.

[0208] Los procesos de desaprestado y blanqueo son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, tales procesos se describen en WO 95/21247, en la patente estadounidense nº 4.643.736, en EP 119.920. Los productos actuales comercialmente disponibles para el desaprestado incluyen OPTISIZE® FLEX de Genencor.

D. Composiciones de limpieza y composiciones detergentes

[0209] Las presentes variantes de α -amilasas se pueden añadir y convertirse de esta manera en un componente de una composición detergente. La composición detergente se puede formular como un detergente para lavar la ropa a mano o a máquina, que incluye una composición aditiva de lavado de ropa adecuada para el pretratamiento de tejidos manchados y una composición suavizante de tejidos añadida en el aclarado. La composición detergente también se puede formular para operaciones de lavado de vajilla a mano o a máquina, o

para utilizarse en operaciones de limpieza de superficies duras domésticas generales. En general, las propiedades de la variante de α -amilasa deberían ser compatibles con el detergente seleccionado en términos de su pH y otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos.

5 **[0210]** La composición de detergente o el aditivo pueden comprender una o varias enzimas adicionales tales como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, otra enzima amilolítica (por ejemplo, otra α -amilasa), una glucoamilasa, una amilasa maltogénica, una CGTasa y/o una celulosa mananasa (tal como MANNASTAR™ de Danisco US Inc., Genencor Division), una pectinasa, una pectina liasa, una cutinasa y/o una lacasa, que se describen con más detalle a continuación:

10 **[0211]** *Proteasas*: Las proteasas adecuadas se pueden derivar de cualquier organismo e incluyen variantes químicamente modificadas o creadas. La proteasa puede ser una serina proteasa o una metaloproteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa de tipo tripsina. Ejemplos de proteasas alcalinas son las subtilisinas, especialmente las derivadas de *Bacillus*, por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descritas en WO 89/06279). Ejemplos de proteasas de tipo tripsina son la tripsina (por ejemplo, de origen bovino o porcino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en
15 WO 89/06270 y WO 94/25583.

[0212] Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en WO98/23732, WO99/20770, WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116, y WO 98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o varias de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 94, 206, 218, 222, 224, 235 y 274.

20 **[0213]** Las enzimas de proteasa comercialmente disponibles preferidas incluyen ALCALASE®, SAVINASE®, PRIMASE®, DURALASE®, ESPERASE®, y KANNASE® (de Novozymes A/S), MAXATASE®, MAXACAL, MAXAPEM®, PROPERASE®, PURAFECT®, PURAFECT OXP®, FN2®, FN3®, FN4® (Genencor International Inc.).

25 **[0214]** *Lipasas*: Las lipasas adecuadas incluyen las de origen fúngico o bacteriano e incluyen variantes químicamente modificadas o creadas. Ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo de *Thermomyces*), por ejemplo, de *H. lanuginosa* (*T. Lanuginosus*), como se describe en EP 258 068 y en EP 305 216 o de *H. insolens*, como se describe en WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP 218 272), *P. cepacia* (EP 331 376), *P. stutzeri* (GB 1.372.034), *P. fluorescens*, cepa SD 705 de *Pseudomonas* sp. (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo, de *B. subtilis* (Dartois *et al.* (1993), *Biochemica et Biophysica Acta*, 1131, 253-360), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422). Otros ejemplos son
30 variantes de lipasas tales como las descritas en WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202. Las enzimas de lipasa comercialmente disponibles preferidas incluyen LIPOLASE™ y LIPOLASE ULTRA™ (Novozymes A/S).

35 **[0215]** *Amilasas*: También se pueden añadir una o varias amilasas adicionales. Las amilasas adecuadas (α y/o β) incluyen las de origen fúngico o bacteriano e incluyen variantes químicamente modificadas o creadas. Las amilasas incluyen, por ejemplo, α -amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *B. licheniformis*, descrita con más detalle en GB 1.296.839. Ejemplos de α -amilasas útiles son las variantes descritas en WO 94/18314, WO 96/39528, WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873, y WO 97/43424,
40 especialmente las variantes con sustituciones en una o varias de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408, y 444. Las α -amilasas comercialmente disponibles son DURAMYL™, LIQUEZYME™ TERMAMY™, NATALASE™, FUNGAMYL™ y BANT™ (Novozymes A/S), RAPIDASE™ y PURASTAR™ (de Genencor).

45 **[0216]** *Celulasas*: Las celulasas adecuadas incluyen las de origen fúngico o bacteriano. Se incluyen los mutantes químicamente modificados o creados. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en la patente estadounidense nº 4.435.307, la patente estadounidense nº 5.648.263, la patente estadounidense nº 5.691.178, la patente estadounidense nº 5.776.757 y WO 89/09259. Las celulasas de *Trichoderma reesei* se describen en la
50 patente estadounidense nº 4.689.297, la patente estadounidense nº 5.814.501, la patente estadounidense nº 5.324.649, WO 92/06221 y WO 92/06165. Las celulasas de *Bacillus* se describen en la patente estadounidense nº 6.562.612. Las celulasas comercialmente disponibles incluyen CELLUZYME®, y CAREZYME® (Novozymes A/S), CLAZINASE®, y PURADAX HA® (Genencor International Inc.), y KAC-500(B)® (Kao Corporation).

55 **[0217]** *Peroxidasas/Oxidasas*: Las peroxidasas/oxidasas adecuadas incluyen las de origen vegetal, bacteriano o fúngico e incluyen las variantes químicamente modificadas o creadas. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus*, y variantes de las mismas tales como las descritas en WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257. Las peroxidasas comercialmente disponibles incluyen GUARDZYME® (Novozymes A/S).

[0218] La(s) enzima(s) detergente(s) se puede(n) incluir en una composición detergente añadiendo aditivos independientes que contienen una o varias enzimas, o añadiendo una composición aditiva combinada que comprenda todas estas enzimas. Un aditivo detergente se puede formular como un líquido, una suspensión, una barra, una pastilla, un polvo, un granulado, una pasta, etc. Ejemplos de formulaciones de aditivos detergentes son granulados no pulverulentos y suspensiones o líquidos estabilizados. Un detergente líquido puede ser acuoso, conteniendo normalmente hasta 70 % de agua y de 0 % a 30 % de disolvente orgánico, o no acuoso.

[0219] Los granulados no pulverulentos se pueden producir, por ejemplo, como se describe en las patentes estadounidenses n^{os} 4.106.991 y 4.661.452 y opcionalmente se pueden recubrir mediante métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de recubrimiento ceroso son los productos de óxido de (poli)etileno (polietilenglicol, PEG) con pesos molares medios de 1.000 a 20 000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; etoxilatos de alcoholes grasos en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en los que hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y monoglicéridos y diglicéridos y triglicéridos de ácidos grasos. En GB 1483591 se proporcionan ejemplos de materiales de recubrimiento que forman una película adecuados para aplicarse mediante técnicas de lecho fluido. Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, estabilizarse añadiendo un poliol, tal como propilenoglicol, un azúcar o un polialcohol, ácido láctico o ácido bórico, según los métodos establecidos. Las enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en EP 238.216.

[0220] La composición detergente normalmente comprende uno o varios surfactantes, que pueden ser no iónicos (incluyendo semipolares), aniónicos, catiónicos y/o zwitteriónicos. Los surfactantes están normalmente presentes en un nivel de 0,1 % a 60 % en peso. Ejemplos de composiciones detergentes incluyen de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 % de un surfactante aniónico, tal como alquilbencenosulfonato lineal, α -olefinsulfonato, sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso), etoxisulfato de alcohol, alcanosulfonato secundario, α -sulfo éster metílico de ácido graso, jabón o ácido alquilo o alquenilsuccínico, y/o de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 40 % de un surfactante no iónico, tal como etoxilato de alcohol, etoxilato de nonilfenol, alquilpoliglucósido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, polihidroxi alquil amida de ácido graso, o derivados N-acilo N-alquilo de glucosamina ("glucamidas").

[0221] La composición detergente puede incluir 0 % a 65 % de mejorador de detergentes o de agente complejante tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilendiaminotetraacético, ácido dietilentriaminopentaacético, ácido alquilo o alquenilsuccínico, silicatos solubles o silicatos estratificados (por ejemplo, SKS-6 de Hoechst). La composición detergente puede incluir uno o varios polímeros, tales como carboximetilcelulosa, poli(vinilpirrolidona), poli(etilenglicol), poli(vinil alcohol), poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos tales como poliacrilatos, copolímeros de ácido maléico/acrílico y copolímeros ácido lauril metacrilato/acrílico.

[0222] El detergente puede contener un sistema de blanqueo, que puede incluir una fuente de H₂O₂ tal como perborato o percarbonato, que se puede combinar con un activador de blanqueo formador de perácido tal como tetraacetiletildiamina o nonanoiloxibencenosulfonato. De forma alternativa, el sistema de blanqueo puede comprender peroxiácidos de, por ejemplo, tipo amida, imida o sulfona.

[0223] La(s) enzima(s) de la composición detergente se pueden estabilizar utilizando agentes estabilizadores convencionales, por ejemplo, un poliol tal como propilenoglicol o glicerol, un azúcar o un polialcohol, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenilborónico tal como ácido borónico 4-formilfenil, y la composición se puede formular como se describe en, por ejemplo, WO 92/19709 y WO 92/19708.

[0224] La composición detergente también puede contener otros ingredientes de composiciones detergentes convencionales, tales como suavizantes de tejidos, arcillas, potenciadores de espuma, supresores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes de suspensión de suciedad, agentes de redeposición anti suciedad, tintes, bactericidas, blanqueadores ópticos, hidrótrofos, inhibidores de decoloración o perfumes.

[0225] La variante de α -amilasa se debería presentar en una cantidad efectiva, que se puede determinar fácilmente utilizando los ensayos descritos en el presente documento. Como punto de partida, se contempla que se añada una (o varias) variante(s) de α -amilasa en una cantidad correspondiente a 0,01-100 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, y preferiblemente aproximadamente 0,1-1 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado. Un ejemplo de cantidad es aproximadamente 0,055 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado.

[0226] Ejemplos de composiciones detergentes para lavavajillas incluyen lo siguiente:

1) COMPOSICIÓN DE LAVAVAJILLAS AUTOMÁTICO EN POLVO

Surfactante no iónico	0,4-2,5 %
Metasilicato de sodio	0-20 %
Disilicato de sodio	3-20 %

ES 2 527 645 T3

Trifosfato de sodio	20-40 %
Carbonato de sodio	0-20 %
Perborato de sodio	2-9 %
Tetraacetililenodiamina (TAED)	1-4 %
Sulfato de sodio	5-33 %
Enzimas	0,0001-0,1 %

2) COMPOSICIÓN DE LAVAVAJILLAS AUTOMÁTICO EN POLVO

Surfactante no iónico (p. ej., etoxilato de alcohol)	1-2 %
Disilicato de sodio	2-30 %
Carbonato de sodio	10-50 %
Fosfonato de sodio	0-5 %
Dihidrato de citrato trisódico	9-30 %
Acetato de nitrilotrisodio (NTA)	0-20 %
Monohidrato de perborato sódico	5-10 %
Tetraacetililenodiamina (TAED)	1-2 %
Polímero de poliacrilato (p. ej., copolímero de ácido maléico/ácido acrílico)	6-25 %
Enzimas	0,0001-0,1 %
Perfume	0,1-0,5 %
Agua	5-10 %

3) COMPOSICIÓN DE LAVAVAJILLAS AUTOMÁTICO EN POLVO

Surfactante no iónico	0,5-2,0 %
Disilicato de sodio	25-40 %
Citrato de sodio	30-55 %
Carbonato de sodio	0-29 %
Bicarbonato de sodio	0-20 %
Monohidrato de perborato sódico	0-15 %
Tetraacetililenodiamina (TAED)	0-6 %
Copolímero de ácido maléico/ácido acrílico	0-5 %
Arcilla	1-3 %
Ácidos poliamínicos	0-20 %
Poliacrilato de sodio	0-8 %
Enzimas	0,0001-0,1 %

5

4) COMPOSICIÓN DE LAVAVAJILLAS AUTOMÁTICO EN POLVO

Surfactante no iónico	1-2 %
Zeolita MAP	15-42 %
Disilicato de sodio	30-34 %
Citrato de sodio	0-12 %
Carbonato de sodio	0-20 %
Monohidrato de perborato sódico	7-15 %
Tetraacetil etileno	0-3 %
Polímero diamina (TAED)	0-4 %
Copolímero de ácido maléico/ácido acrílico	0-5 %
Fosfonato orgánico	0-4 %
Arcilla	1-2 %
Enzimas	0,0001-0,1 %
Sulfato de sodio	Balance

5) COMPOSICIÓN DE LAVAVAJILLAS AUTOMÁTICO EN POLVO

Surfactante no iónico	1-7 %
Disilicato de sodio	18-30 %
Citrato de trisodio	10-24 %

ES 2 527 645 T3

Carbonato de sodio	12-20 %
Monopersulfato (2 KHSO ₅ .KHSO ₄ .K ₂ SO ₄)	15-21 %
Estabilizador de blanqueo	0,1-2 %
Copolímero de ácido maléico/ácido acrílico	0-6 %
Pentaacetato de dietilentriamina, sal de pentasodio	0-2,5 %
Enzimas	0,0001-0,1 %
Sulfato de sodio, agua	Balance

6) COMPOSICIÓN DE LAVAVAJILLAS EN POLVO Y LÍQUIDO CON SISTEMA SURFACTANTE DE LIMPIEZA

Surfactante no iónico	0-1,5 %
Octadecil dimetilamina N-óxido dihidrato	0-5 %
80:20 en wt. de mezcla C18/C16 de octadecil dimetilamina N-óxido dihidrato y hexadecildimetilamina N-óxido dihidrato	0-4 %
70:30 en wt. de mezcla C18/C16 de octadecil bis (hidroxietil)amina N-óxido anhidro y hexadecil bis (hidroxietil)amina N-óxido anhidro	0-5 %
Etoxisulfato de alquilo C ₁₃ -C ₁₅ con un grado medio de etoxilación de 3	0-10 %
Etoxisulfato de alquilo C ₁₂ -C ₁₅ con un grado medio de etoxilación de 3	0-5 %
Etoxilato de alcohol C ₁₃ -C ₁₅ con un grado medio de etoxilación de 12	0-5 %
Una mezcla de etoxilatos de alcoholes C ₁₂ -C ₁₅ con un grado medio de etoxilación de 9	0-6,5 %
Una mezcla de etoxilatos de alcoholes C ₁₃ -C ₁₅ con un grado medio de etoxilación de 30	0-4 %
Disilicato de sodio	0-33 %
Tripolifosfato de sodio	0-46 %
Citrato sódico	0-28 %
Ácido cítrico	0-29 %
Carbonato de sodio	0-20 %
Monohidrato de perborato sódico	0-11,5 %
Tetraacetililenodiamina (TAED)	0-4 %
Copolímero de ácido maléico/ácido acrílico	0-7,5 %
Sulfato de sodio	0-12,5 %
Enzimas	0,0001-0,1 %

7) COMPOSICIÓN DE LAVAVAJILLAS AUTOMÁTICO LÍQUIDO NO ACUOSO

Surfactante no iónico líquido (p. ej., etoxilatos de alcohol)	2,0-10,0 %
Silicato de metal alcalino	3,0-15,0 %
Fosfato de metal alcalino	20,0-40,0 %
Portador líquido seleccionado de glicoles, poliglicoles, polióxidos y glicoléteres superiores	25,0-45,0 %
Estabilizador (p. ej., un éster parcial de ácido fosfórico y un alcohol C ₁₆ -C ₁₈)	0,5-7,0 %
Supresor de espuma (p. ej., silicona)	0-1,5 %
Enzimas	0,0001-0,1 %

5

8) COMPOSICIÓN DE LAVAVAJILLAS LÍQUIDO NO ACUOSO

Surfactante no iónico líquido (p. ej. etoxilatos de alcohol)	2,0-10,0 %
Silicato sódico	3,0-15,0 %
Carbonato de metal alcalino	7,0-20,0 %
Citrato sódico	0,0-1,5 %
Sistema estabilizante (p. ej., mezclas de silicona finamente dividida y éteres de dialquil poliglicol de bajo peso molecular)	0,5-7,0 %
Polímero de poliacrilato de bajo peso de molécula	5,0-15,0 %
Espesante de gel de arcilla (p. ej., bentonita)	0,0-10,0 %
Polímero de hidroxipropilcelulosa	0,0-0,6 %
Enzimas	0,0001-0,1 %
Portador líquido seleccionado de licoles, poliglicoles, polióxidos y glicoléteres superiores	Balance

9) COMPOSICIÓN DE LAVAVAJILLAS AUTOMÁTICO LÍQUIDO TIXOTRÓPICO

ES 2 527 645 T3

Ácido graso C ₁₂ -C ₁₄	0-0,5 %
Surfactante de copolímero de bloque	1,5-15,0 %
Citrato sódico	0-12 %
Tripolifosfato de sodio	0-15 %
Carbonato de sodio	0-8 %
Tristearato de aluminio	0-0,1 %
Sulfonato de cumeno sódico	0-1,7 %
Espesante de poliacrilato	1,32-2,5 %
Poliacrilato de sodio	2,4-6,0 %
Ácido bórico	0-4,0 %
Formiato sódico	0-0,45 %
Formiato de calcio	0-0,2 %
N-decidifenil óxido disulfonato de sodio	0-4,0 %
Monoetanolamina (MEA)	0-1,86 %
Hidróxido sódico (50%)	1,9-9,3 %
1,2-Propanodiol	0-9,4 %
Enzimas	0,0001-0,1 %
Supresor de espuma, tinte, perfumes, agua	Balance

10) COMPOSICIÓN DE LAVAVAJILLAS AUTOMÁTICO LÍQUIDO

Etoxilato de alcohol	0-20 %
Sulfonato de éster de ácido graso	0-30 %
Dodecilsulfato sódico	0-20 %
Poliglucosida de alquilo	0-21 %
Ácido oleico	0-10 %
Monohidrato de disilicato de sodio	18-33 %
Dihidrato de citrato sódico	18-33 %
Estearato de sodio	0-2,5 %
Monohidrato de perborato sódico	0-13 %
Tetraacetiltilenodiamina (TAED)	0-8 %
Copolímero de ácido maléico/ácido acrílico	4-8 %
Enzimas	0,0001-0,1 %

11) COMPOSICIÓN DE LAVAVAJILLAS AUTOMÁTICO LÍQUIDO QUE CONTIENE PARTÍCULAS BLANQUEADORAS PROTEGIDAS

Silicato sódico	5-10 %
Pirofosfato de tetrapotasio	15-25 %
Trifosfato de sodio	0-2 %
Carbonato potásico	4-8 %
Partículas blanqueadoras protegidas, p. ej., clorina	5-10 %
Espesante polimérico	0,7-1,5 %
Hidróxido potásico	0-2 %
Enzimas	0,0001-0,1 %
Agua	Balance

12) Composiciones de lavavajillas automático según se describe en 1), 2), 3), 4), 6) y 10), en las que el perborato se sustituye por percarbonato.

10 13) Composiciones de lavavajillas automático según se describe en 1)-6) que contienen además un catalizador de manganeso. El catalizador de manganeso puede, por ejemplo, ser uno de los compuestos descritos en "Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching", Nature 369, 1994, pp. 637-639.

VII. Métodos para medir las propiedades de las α -amilasas

[0227] Esta sección describe ensayos básicos para medir las propiedades de las α -amilasas. Se describen ensayos adicionales en la sección de Ejemplos,

A. Ensayos de selección de filtro

[0228] Los siguientes ensayos se pueden utilizar para seleccionar variantes de α -amilasa de tipo SPEZYME® Xtra que tienen estabilidad alterada con un pH alto o bajo y/o bajo condiciones de agotamiento de Ca^{2+} en comparación con la enzima original y la α -amilasa de tipo SPEZYME® Xtra.

5 **1. Ensayo de filtro con pH alto**

[0229] Se colocan genotecas de *Bacillus* en placas en un sándwich de acetato de celulosa (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) y filtros de nitrocelulosa (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) en placas de TY agar con 10 micro g/ml de kanamicina a 37°C durante al menos 21 horas. La capa de acetato de celulosa se localiza en la placa de TY agar.

10 **[0230]** Cada sándwich de filtro se marca específicamente con una aguja después de colocarlo en placas, pero antes de la incubación, con el objetivo de poder localizar las variantes positivas en el filtro, y el filtro de nitrocelulosa con las variantes ligadas se transfiere a un recipiente con tampón de glicina-NaOH, pH 8.6-10.6 y se incuba a temperatura ambiente (se puede alterar de 10 °C a 60 °C) durante 15 min. Los filtros de acetato de celulosa con colonias se almacenan en las placas TY a temperatura ambiente hasta su uso. Tras la incubación,
15 se detecta actividad residual en las placas que contienen 1 % de agarosa, 0,2 % de almidón en tampón de glicina-NaOH, pH 8.6-10.6. Las placas de ensayo con filtros de nitrocelulosa se marcan de la misma manera que el sándwich de filtro y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de eliminar los filtros, las placas de ensayo se tiñen con una solución de Lugol al 10 %. Las variantes que degradan el almidón se detectan como manchas blancas en fondo azul oscuro y luego se identifican en las placas de almacenamiento. Las
20 variantes positivas se reseleccionan dos veces bajo las mismas condiciones que la primera selección.

2. Ensayo de filtro con calcio bajo

[0231] Se colocan genotecas de *Bacillus* en placas en un sándwich de acetato de celulosa (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) y filtros de nitrocelulosa (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) en
25 placas de TY agar con un antibiótico pertinente, por ejemplo, kanamicina o cloranfenicol, a 37°C durante al menos 21 horas. La capa de acetato de celulosa se localiza en la placa de TY agar.

[0232] Cada sándwich de filtro se marca específicamente con una aguja después de colocarlo en placas, pero antes de la incubación, con el objetivo de poder localizar las variantes positivas en el filtro, y el filtro de nitrocelulosa con las variantes ligadas se transfiere a un recipiente con tampón de carbonato/bicarbonato, pH 8.5-10 y con diferentes concentraciones de EDTA (0,001 mM - 100 mM). Los filtros se incuban a temperatura
30 ambiente durante 1 hora. Los filtros de acetato de celulosa con colonias se almacenan en las placas TY a temperatura ambiente hasta su uso. Tras la incubación, se detecta actividad residual en las placas que contienen 1 % de agarosa, 0,2 % de almidón en tampón de carbonato/bicarbonato, pH 8.5-10. Las placas de ensayo con filtros de nitrocelulosa se marcan de la misma manera que el sándwich de filtro y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de eliminar los filtros, las placas de ensayo se tiñen con una solución de Lugol al
35 10 %. Las variantes que degradan el almidón se detectan como manchas blancas en fondo azul oscuro y luego se identifican en las placas de almacenamiento. Las variantes positivas se reseleccionan dos veces bajo las mismas condiciones que la primera selección.

3. Ensayo de filtro con pH bajo

[0233] Se colocan genotecas de *Bacillus* en placas en un sándwich de acetato de celulosa (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) y filtros de nitrocelulosa (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) en
40 placas de TY agar con 10 micro g/ml de cloranfenicol a 37°C durante al menos 21 horas. La capa de acetato de celulosa se localiza en la placa de TY agar.

[0234] Cada sándwich de filtro se marca específicamente con una aguja después de colocarlo en placas, pero antes de la incubación, con el objetivo de poder localizar las variantes positivas en el filtro, y el filtro de nitrocelulosa con las variantes ligadas se transfiere a un recipiente con tampón de citrato, pH 4.5 y se incuba a
45 80 °C durante 20 min (cuando se seleccionan variantes en la estructura principal natural) o a 85 °C durante 60 minutos (cuando se seleccionan variantes de la α -amilasa original). Los filtros de acetato de celulosa con colonias se almacenan en las placas TY a temperatura ambiente hasta su uso. Tras la incubación, se detecta actividad residual en las placas de ensayo que contienen 1 % de agarosa, 0,2 % de almidón en tampón de citrato, pH 6.0. Las placas de ensayo con filtros de nitrocelulosa se marcan de la misma manera que el sándwich
50 de filtro y se incuban durante 2 horas a 50 °C. Después de eliminar los filtros, las placas de ensayo se tiñen con una solución de Lugol al 10 %. Las variantes que degradan el almidón se detectan como manchas blancas en fondo azul oscuro y luego se identifican en las placas de almacenamiento. Las variantes positivas se reseleccionan dos veces bajo las mismas condiciones que la primera selección.

55 **3. Elección secundaria**

[0235] Los transformantes positivos después de la reselección se eligen de la placa de almacenamiento y se analizan en un ensayo de placas secundario. Los transformantes positivos se cultivan durante 22 horas a 37°C

en 5 ml de LB + cloranfenicol. El cultivo de *Bacillus* de cada transformante positivo y como control un clon que expresa la estructura principal correspondiente se incuban en un tampón de citrato, pH 4.5 a 90°C y se toman muestras a los 0, 10, 20, 30, 40, 60 y 80 minutos. Se mancha una muestra de 3 µL en una placa de ensayo. La placa de ensayo se tinta con una solución de Lugol al 10%. Las variantes mejoradas se ven como variantes con mayor actividad residual (detectada como halos en la placa de ensayo) que la estructura principal. Las variantes mejoradas se determinan mediante secuenciación de nucleótidos.

B. Ensayo de estabilidad de variantes no purificadas

[0236] La estabilidad de las variantes se puede ensayar como sigue: los cultivos de *Bacillus* que expresan las variantes para analizar se cultivan durante 21 horas a 37 °C en 10 ml de LB + cloranfenicol. Se mezclan 800 µL del cultivo con 200 µL de tampón de citrato, pH 4.5. Un número de alícuotas de 70 µL correspondientes al número de puntos en el tiempo de la muestra se preparan en tubos de PCR y se incuban a 70 °C o 90 °C para varios puntos en el tiempo (normalmente 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos) en una máquina de PCR. La muestra de 0 minutos no se incuba a alta temperatura. La actividad en la muestra se mide transfiriendo 20 µL a 200 µL del sustrato PNP-G₇ de α-amilasa MPR3 (Boehringer Mannheim Cat. n° 1660730) como se describe más adelante en el texto en "Ensayos para la actividad de α-amilasa". Los resultados se representan como porcentaje de actividad (con relación al punto en el tiempo 0) en función del tiempo, o se expresan como porcentaje de actividad residual después de la incubación durante un cierto periodo de tiempo.

C. Fermentación y purificación de las variantes de α-amilasa

[0237] Una cepa de *B. subtilis* que contiene el plásmido de expresión pertinente se puede fermentar y purificar como sigue: La cepa se mancha sobre una placa de LB agar con 10 µg/ml de kanamicina de un caldo a -80 °C, y se cultiva durante toda la noche a 37 °C. Las colonias se transfieren a medios de 100 ml PS-1 complementados con 10 micro g/ml de cloranfenicol en un matraz de agitación de 500 ml. El cultivo se agita a 37 °C a 270 rpm durante 5 días.

Composición del medio PS-1:

Azúcar en perlas	100 g/l
Harina de soja	40 g/l
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	10 g/l
Pluronic™ PE 6100	0,1 g/l
CaCO ₃	5 g/l

[0238] Las células y los restos celulares se extraen del caldo de fermentación mediante centrifugado a 4500 rpm en 20-25 minutos. Después, el sobrenadante se filtra para obtener una solución completamente transparente. El filtrado se concentra y se lava en un filtro UF (membrana de corte de 10.000 MW) y el tampón se cambia a 20 mM de acetato, pH 5.5. El filtrado UF se aplica en una S-sefarosa FF y se lleva a cabo la elución mediante una elución por etapas con 0,2 M de NaCl en el mismo tampón. El eluato se dializa contra 10 mM de Tris, pH 9.0 y se aplica en una Q-sefarosa FF y se eluye con un gradiente lineal de 0-0,3 M de NaCl sobre volúmenes de 6 columnas. Las fracciones que contienen la actividad (medidas mediante el ensayo Phadebas) se agrupan, se ajusta el pH a pH 7.5 y el color restante se extrae mediante un tratamiento con 0,5 % en peso/volumen de carbón activo durante 5 minutos.

D. Determinación de la actividad específica

[0239] La actividad específica se determina utilizando el ensayo PHADEBAS® (Pharmacia) como actividad/mg de enzima. Se siguen las instrucciones del fabricante (véase también a continuación en "Ensayo para la actividad de α-amilasa").

E. Determinación del punto isoeléctrico

[0240] El pI se determina mediante isoelectroenfoque (por ejemplo, Pharmacia, Anfolina, pH 3.5-9.3).

F. Determinación de la estabilidad

[0241] La estabilidad de la amilasa se puede medir utilizando el método como sigue:

[0242] La enzima se incuba bajo las condiciones pertinentes. Las muestras se toman en diversos momentos, por ejemplo, después de 0, 5, 10, 15 y 30 minutos y se diluyen 25 veces (misma dilución para todas las muestras tomadas) en un tampón de ensayo (50 mM de tampón Britton pH 7.3) y la actividad se mide utilizando el ensayo Phadebas (Pharmacia) bajo condiciones estándar pH 7.3, 37°C.

[0243] La actividad medida antes de la incubación (0 minutos) se utiliza como referencia (100%). El descenso del porcentaje se calcula como una función del tiempo de incubación. La tabla muestra la actividad residual después de, por ejemplo, 30 minutos de incubación.

G. Ensayos para la actividad de α -amilasa**1. Ensayo PHADEBAS®**

[0244] La actividad α -amilasa se determina mediante un método que emplea tabletas de Phadebas® como sustrato. Los tabletas de Phadebas (Phadebas® Amylase Test, suministrado por Pharmacia Diagnostic) contienen un polímero de almidón de color azul insoluble reticulado, que ha sido mezclado con albúmina de suero bovino y una sustancia del tampón y colocado en tabletas.

[0245] Para cada medición individual se suspende una tableta en un tubo que contiene 5 ml de tampón Britton-Robinson de 50 mM (50 mM de ácido acético, 50 mM de ácido fosfórico, 50 mM de ácido bórico, 0,1 mM de CaCl_2 , pH ajustado al valor de interés con NaOH). La prueba se lleva a cabo en un baño termostático a la temperatura de interés. La α -amilasa que se ha de evaluar se diluye en x ml de 50 mM de tampón Britton-Robinson. Se añade 1 ml de esta solución de α -amilasa a 5 ml de tampón Britton-Robinson de 50 mM. El almidón se hidroliza mediante la α -amilasa dando fragmentos azules solubles. La absorbancia de la solución azul resultante, medida espectrofotométricamente a 620 nm, es una función de la actividad de α -amilasa.

[0246] Es importante que la absorbancia de 620 nm medida después de 10 ó 15 minutos de incubación (tiempo de la prueba) esté en el intervalo de 0,2 a 2,0 unidades de absorbancia a 620 nm. En este intervalo de absorbancia existe una linealidad entre la actividad y la absorbancia (ley de Lambert-Beer). La dilución de la enzima debe ajustarse por consiguiente para adaptarse este criterio. Bajo un conjunto específico de condiciones (temp., pH, tiempo de reacción, condiciones del tampón) 1 mg de una α -amilasa dada hidrolizará una cantidad determinada de sustrato y se producirá un color azul. La intensidad del color se mide a 620 nm. La absorbancia medida es directamente proporcional a la actividad específica (actividad/mg de proteína de α -amilasa pura) de la α -amilasa en cuestión bajo el conjunto de condiciones dadas.

2. Método alternativo

[0247] La actividad de la α -amilasa se determina mediante un método que emplea el sustrato PNP-G₇. PNP-G₇, que es una abreviatura de p-nitrofenil- α ,D-maltoheptaosido, es un oligosacárido bloqueado que puede escindirse mediante una endoamilasa. Después de la escisión, la α -Glucosidasa incluida en el kit asimila el sustrato para liberar una molécula de PNP libre que tiene un color amarillo y, de este modo, se puede medir por espectrofotetría visible a $\lambda=405$ nm (400-420 nm). Los kits que contienen el sustrato PNP-G₇ y la α -Glucosidasa son fabricados por Boehringer-Mannheim (nº cat. 1054635).

[0248] Para preparar la solución del reactivo se añaden 10 ml del sustrato/solución de tampón a 50 ml de enzima/solución de tampón según recomienda el fabricante. El ensayo se lleva a cabo transfiriendo una muestra de 20 μL a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se incuba a 25 °C. Se añaden 200 μL de la solución del reactivo pre-equilibrada a 25 °C. La solución se mezcla y se preincuba 1 minuto y se mide la absorción cada 30 segundos durante 4 minutos a una densidad óptica (OD, por sus siglas en inglés) de 405 nm en un lector ELISA.

[0249] La pendiente de la curva de absorción en función del tiempo es directamente proporcional a la actividad de la α -amilasa en cuestión bajo el conjunto de condiciones dado.

H. Determinación de sensibilidad a LAS

[0250] La variante se incuba con diferentes concentraciones de LAS (alquilbencensulfonato lineal; Nansa 1169/P) durante 10 minutos a 40 °C. La actividad residual se determina mediante el método de ensayo PHADEBAS® o el método alternativo que emplea el sustrato PNP-G₇. El LAS se diluye en un tampón de fosfato de 0,1 M, pH 7.5. Se utilizan las siguientes concentraciones: 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm y 10 ppm o no se utiliza LAS.

[0251] La variante se diluye en los diferentes tampones de LAS a una concentración de 0,01-5 mg/l en un volumen total de 10 ml y se incuba durante 10 minutos en un baño termostático con temperatura controlada. La incubación se detiene al transferir una alícuota pequeña en el tampón de ensayo frío. Es importante que durante la medición de la actividad la concentración de LAS esté por debajo de 1 ppm, para no afectar la medición de actividad.

[0252] Entonces se determina la actividad residual por duplicado utilizando el ensayo PHADEBAS® o el método alternativo antes mencionados. La actividad se mide después de la sustracción del blanco. La actividad sin LAS es 100 %.

G. Determinación de la actividad de fitasa (FTU)

[0253] La actividad de fitasa (FTU) se mide liberando fosfato inorgánico. El fosfato inorgánico forma un compuesto amarillo con reactivo vanadato/molibdato ácido y el compuesto amarillo se mide a una longitud de onda de 415 nm en un espectrofotómetro y el fosfato inorgánico liberado se cuantifica con una curva estándar de fosfato. Una unidad de fitasa (FTU) es la cantidad de enzima que libera 1 micromol de fosfato inorgánico de fitato

por minuto bajo las condiciones de reacción dadas en la norma europea (CEN/TC 327,2005-TC327WI 003270XX).

H. Determinación del contenido de ácido fítico

5 [0254] Para determinar el contenido de ácido fítico, se extrajo ácido fítico de una muestra ajustando el pH de la suspensión al 5 % (si se trata de una muestra seca) a pH 10 y se determinó después mediante un método de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) utilizando una columna de intercambio de iones. El ácido fítico se eluyó de la columna utilizando un sistema de gradiente de NaOH. Se calculó entonces el contenido de ácido fítico en el líquido comparándolo con un estándar de ácido fítico.

10 [0255] Las presentes composiciones y métodos se describen con más detalle en los siguientes ejemplos que no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la invención.

EJEMPLOS

15 [0256] En la descripción y en la sección experimental que sigue, se aplican las siguientes abreviaciones: wt% (concentración porcentual en peso); °C (grados Centígrados); H₂O (agua); dH₂O (agua desionizada); dH₂O (agua desionizada, filtración Milli-Q); g o gm (gramos); µg (microgramos); mg (miligramos); kg (kilogramos); µL y µl (microlitros); mL y ml (mililitros); mm (milímetros); µm (micrometros); M (molar); mM (milimolar); µM (micromolar); U (unidades); MW (peso molecular); seg (segundos); min(s) (minuto/minutos); hr(s) (hora/horas); DO (oxígeno disuelto); W/V (peso/volumen); W/W (peso/peso); V/V (volumen/volumen); IKA (IKA Works Inc. 2635 North Chase Parkway SE, Wilmington, NC); Genencor (Danisco US Inc, Genencor Division, Palo Alto, CA); Ncm (Newton centímetro) y ETOH (etanol). eq (equivalentes); N (normal); ds o DS (contenido de residuo seco), 20 SAPU (unidad de proteasa de ácido espectrofotométrico, en la que 1 SAPU es la cantidad de actividad de enzima de proteasa que libera un micromol de tirosina por minuto a partir de un sustrato de caseína bajo condiciones del ensayo) y GAU (unidad de glucoamilasa, que se define como la cantidad de enzima que producirá 1 g de azúcar reductor calculado como glucosa por hora a partir de un sustrato de almidón soluble con pH 4.2 y a 60 °C).

25 Ejemplo 1. Construcción de variantes

[0257] Las variantes en la secuencia madura de AmyS se construyeron utilizando un enfoque de sitio dirigido. Por ejemplo, las variantes en la posición S242 se construyeron como sigue:

30 [0258] La plantilla para la mutagénesis fue pHPLT-AmyS metilada (véase la Figura 2) utilizando dam-Metilasa de New England Biolabs (Massachusetts). Los cebadores degenerados (S242F (progresivo) y S242R (inverso), dados a continuación) se sintetizaron y se diluyeron a 10 µM en Operon (Huntsville, AL) con secuencias progresivas e inversas complementarias que contenían ambas un fosfato 5' para la ligación en la reacción. La secuencia de la α-amilasa original se muestra como SEQ ID N° 2. Las genotecas se crearon con el kit QUIK-CHANGE™ Multi-sitio de Stratagene (Stratagene, La Jolla CA) utilizando cebadores de oligonucleótido distribuidos de forma aleatoria con NN(G/C) en la posición de destino. El aminoácido seleccionado (por ejemplo, 35 S242) se reemplazó aleatoriamente con las 19 alternativas posibles.

[0259] Cebadores S242 para mutagénesis:

S242 F: 5'-[Phos]GTCAAGCATATTAAGTTCNNSTTTTTCTGATTGGTTG-3' SEQ ID N° 17

S242 R: 5'-[Phos]CAACCAATCAGGAAAAASNNGAACTTAATATGCTTGAC-3' SEQ ID N° 18

[0260] La reacción se llevó a cabo como sigue:

40 Reacción Quik-Change:

[0261] La reacción consistió en 18 µL de H₂O destilada estéril, 2,5 µL de tampón 10x del kit, 1 µL de dNTPs del kit, 1,25 µL de los cebadores progresivos (de 10 uM de caldo), 1,25 µL de los cebadores inversos (de 10 uM de caldo), 1 µL de plásmido de ADN pHPLT-AmyS como plantilla (~70 ng), y 1 µL de la mezcla enzimática del kit para un total de 26,5 µL.

45 Condiciones del ciclo:

[0262] Las condiciones del ciclo fueron 95 °C durante 1 min una vez, después 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, 65 °C durante 10 min para 25 ciclos. Se añadió un µL de Dpn I (10 U/µL) a la mezcla de reacción Quik-Change Multi-sitio y se incubó a 37 °C durante 18 horas y después se añadieron otros 0,5 µL durante 3 horas adicionales.

50 [0263] Se utilizó un µL de la reacción digerida con DpnI como plantilla para la amplificación en círculo rodante con el kit de amplificación Templphi (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y la reacción se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo de Amersham. Se transformó un µL de ADN de círculo rodante en 100 µL de células competentes de *Bacillus subtilis* (dos proteasas de cepa de *B. subtilis* eliminada (*ΔaprE*, *ΔnprE*,

amyE::xyIRPxylAcomK-phleo) y se agitó a 37 °C durante 1 hora. La transformación completa se colocó después en placas de LA + 10 ppm de Neo + almidón insoluble al 1 % (25 µL en una placa, 75 µL en otra placa) y se incubó durante la noche a 37 °C. Se recogieron 96 transformantes en 150 µL de LB + 10 ppm de Neo en una placa de microtitulación y se cultivaron durante la noche a 37 °C. La placa de la noche se estampó en una placa grande de LA + 10 ppm de Neo + almidón insoluble al 1 % con una herramienta de replicación de 96 pocillos y se envió a Quintara Biosciences (Berkeley, CA, USA) para PCR y secuenciación de colonia.

[0264] Después de determinar las variantes de secuencias, éstas se recogieron en una placa de microtitulación de 96 pocillos que contenía 125 µL de LB + 10 ppm de Neo, disponiendo las variantes en un formato cuádruple con controles. La placa de microtitulación dispuesta se cultivó durante 6 horas a 37 °C y a 250 rpm. Utilizando una herramienta de replicación (EnzyScreen, Leiden, Países Bajos) se utilizó la placa del cultivo de microtitulación para inocular una nueva placa de microtitulación (placa de microtitulación y tapas de la placa de EnzyScreen, Leiden, Países Bajos) que contenía 150 µL de medio MBD para la expresión de la proteína (G. Vogtentanz *et al.*, A *Bacillus subtilis* fusion protein system to produce soybean Bowman-Birk protease inhibitor, *Prot. Expr. & Purif.*, 55 (2007) 40-52) y complementada con 5 mM de CaCl₂ para la expresión de la proteína. Las placas de expresión se cultivaron durante 64 horas a 37 °C, 250 rpm y 70 % de humedad. Los cultivos de expresión se filtraron después mediante una placa de microfiltro (0,22 µm, Millipore, Billerica, MA) y se cribaron por termoestabilidad mejorada (véase el Ejemplo 3).

Genotecas de AmyS

[0265] Se realizaron genotecas de evaluación de sitio para las siguientes 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.

Ejemplo 2. Expresión, purificación y caracterización de variantes

[0266] Las colonias se vetearon a partir de las placas de microtitulación del Ejemplo 1 y se pusieron en placas de almidón con 10 ppm de Neomicina. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C y se recogieron las colonias individuales y se utilizaron para inocular matraces de agitación (250 mL con 25 mL de medios de cultivo) que contenían medios de cultivo (véase a continuación) y 20 ppm de Neomicina. Estos se cultivaron a 37 °C, a 275 rpm, durante aproximadamente 8 horas (hasta que se alcanzó una densidad óptica (OD) (600 nm) de 2,0). Después de lo cual, los caldos de cultivo se mezclaron con 50 % de glicerol a una relación de 2:1, se colocaron en frascos de cultivo marcados individualmente y se congelaron a -80 °C. La subsiguiente producción de las α-amilasas seleccionadas se hizo a partir de estas concentraciones de glicerol.

[0267] Las fermentaciones de amilasas se llevaron a cabo en matraces de agitación de 500 mL y se cultivaron a 37 °C durante 60 horas en un medio de cultivo de MOPS mínimo (Neidhardt *et al.*, *J. Bacteriol.* (1974) 119(3):736-747) con 1 % (peso/volumen) de Soytone. Las enzimas se purificaron del caldo de fermentación utilizando cromatografía de interacción hidrófoba. En definitiva, el caldo se concentró 10 veces, después se diluyó de nuevo con 50 mM de MES, 2 mM de CaCl₂, pH 6.8 con 1M de sulfato de amonio, y se filtró de forma estéril utilizando filtro de fibra de vidrio. Las muestras se cargaron entonces en una columna de alta densidad de fenil sefarosa FF (20 x 95 mm; Amersham, GE Healthcare Bio-Sciences, Suecia) preequilibradas con el mismo tampón. Las proteínas que no eran amilasa se eliminaron con 10 volúmenes de columna del mismo tampón sin sulfato de amonio seguido por 5 volúmenes de columna de agua. Finalmente, se eluyeron las enzimas de interés con 50 mM de MES, 2 mM de CaCl₂, pH 6.8 que contenía 40 % de propilenglicol.

[0268] Las concentraciones de proteína se determinaron o mediante un método de densitometría en gel SDS page cuantitativo estándar o mediante un ensayo de actividad que utilizaba un kit de ensayo de amilasa estándar de Megazyme (Wicklow, Irlanda). Los ensayos se convirtieron usando una curva estándar generada utilizando la amilasa purificada (amilasa de *Bacillus* 707; SEQ ID N° 6).

Ejemplo 3. Determinación de propiedades alteradas: Tensión térmica

[0269] Este ejemplo muestra que las variantes descritas en el presente documento pueden tener una propiedad alterada en relación con la α-amilasa original. Se llevó a cabo un cribado de estabilidad térmica de alto rendimiento de variantes de α-amilasa de *G. stearothermophilus* (AmyS).

[0270] Se investigaron las condiciones de tensión por calor y se seleccionaron de tal forma que después de la tensión por calor la enzima natural inicial mostró aproximadamente 40 % de su actividad sin tensión (es decir, la actividad después de la tensión por calor/actividad antes de la tensión por calor fue de aproximadamente 0,4). Las genotecas de mutantes se cribaron por cuadruplicado y los ganadores potenciales se identificaron como los que mostraron una actividad residual después de la tensión por calor que fue de al menos dos desviaciones estándar más que la actividad residual media de la enzima natural inicial.

[0271] La expresión de la amilasa fue aproximadamente 100 ppm en los sobrenadantes del cultivo de las placas de expresión. Después de 60-65 horas de cultivo a 37 °C en un agitador humidificado (a 250 rpm y 70 % de humedad relativa), los sobrenadantes del cultivo se clarificaron para eliminar el material celular utilizando placas de filtro. Los sobrenadantes clarificados se diluyeron 10 veces en un tampón que contenía 50 mM de NaOAc/2,6 mM de CaCl₂/0,002 % de Tween-20, pH 5.8, a una concentración final de aproximadamente 10 ppm. Se diluyó además una alícuota del sobrenadante a 0,02 ppm, y se determinó la actividad de las variantes enzimáticas como se describe más adelante utilizando un sustrato de almidón de maíz marcado de manera fluorescente. Se sometió una segunda alícuota del sobrenadante a 30 minutos de tensión por calor a 95 °C en un ciclador térmico, antes de diluirse a 0,02 ppm en 50 mM de NaOAc/2,6 mM de CaCl₂/0,002 % de Tween-20, pH 5.8 y se ensayó para actividad residual utilizando el mismo sustrato fluorescente y el ensayo se describe más adelante en el texto.

[0272] La actividad de la amilasa se determinó utilizando el ensayo de amilasa EnzCheck esencialmente como describe el fabricante (Invitrogen, San Diego CA). La concentración final de la amilasa en el ensayo fue de aproximadamente 0,02 ppm. El tampón del ensayo fue de 50 mM de NaOAc/2,6 mM de CaCl₂/0,002 % de Tween-20, pH 5.8. El sustrato fue el colorante fluorescente BODIPY conjugado de 100 µg/mL de almidón de maíz de DQ™ (Invitrogen - Eugene, OR). La fluorescencia incrementada, que indica la actividad de la amilasa, se midió utilizando un Spectomax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La reacción se monitorizó a temperatura ambiente durante 5 minutos con el instrumento grabando en modo cinético. La longitud de onda de excitación fue de 485 nm; la emisión se monitorizó a 520 nm con un filtro de corte a 515 nm.

[0273] La AmyS natural (SPEZYME® Xtra) mostró 33 % - 43 % de actividad residual después de someterse a tensión térmica durante 30 minutos a 95 °C. Las variantes de AmyS, S242A y S242Q, retuvieron 55 % - 65 % y 70 % - 80 % de actividades residuales, respectivamente, siguiendo las mismas condiciones de tensión térmica. Véase la Figura 3 y la Tabla 3-1. Estas mediciones de la actividad residual indican que las dos variantes son más termoestables que la α amilasa natural. Algunas variantes faltaban en las genotecas y se indican mediante posición de la letra con indicador de eliminación de texto. En su lugar, se colocó la amilasa natural (SPEZYME® Xtra); (WT) indica que se colocó la amilasa natural en su lugar. Cada placa incluye SPEZYME® Xtra (designada Z) como control.

Tabla 3-1. Porcentaje de actividades residuales de cada muestra de variantes.

Variantes	% de actividad residual				Promedio	Desviación estándar	%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
(WT)	45,3	38,6	39,5	40,7	41,0	3,0	7
(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
(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
(WT)	43,9	43,2	46,0	42,2	43,8	1,6	4
(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
(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
(WT)	32,7	37,5	36,3	38,8	36,3	2,6	7
(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

30 **Ejemplo 4. Determinación de propiedades alteradas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés)**

[0274] Se purificaron SPEZYME® Xtra, S242A y S242Q del caldo de fermentación de la matraz de agitación (véase el Ejemplo 2) utilizando cromatografía de interacción hidrófoba. La proteína se eluyó de la columna en forma purificada utilizando 50 mM de MES, pH 6.8, que contenía 40 % de propilenglicol y 2 mM de CaCl₂.

[0275] Las curvas de capacidad de calor excesivo se midieron utilizando un microcalorímetro de exploración ultrasensible de alto rendimiento, VP-Cap DSC (MicroCal, Inc., Northampton, MA). El procedimiento estándar para las mediciones DSC y la teoría de la técnica se han publicado previamente en (Freire, E. (1995) *Differential Scanning Calorimetry Methods*. Mol. Biol. 41, 191-218). Se examinaron aproximadamente 500 μ L de 0,5 mg/ml de α -amilasa natural de *Bacillus stearothermophilus* o las variantes S242S y S242Q (en ausencia y presencia de 2 mM de cloruro de calcio) en un intervalo de temperatura por encima de 30 °C - 120 °C. La misma muestra se volvió a examinar después para comprobar la reversibilidad del proceso. Para la α -amilasa el proceso de desarrollo térmico fue irreversible. El tampón utilizado fue 10 mM de acetato de sodio, pH 5.5. Se utilizó un índice de exploración de 200 °C/hr para minimizar cualquier objeto que pudiera resultar de la agregación. El punto térmico medio (T_m, por su abreviación del inglés) de las curvas DSC se utilizó como un indicador de la estabilidad térmica. La Tabla 4-1 muestra los puntos de fusión térmicos para las proteínas de amilasa analizadas. En la Figura 5 se muestran las curvas de fusión térmica y los puntos de fusión de la amilasa natural y de las variantes de amilasa.

[0276] El desarrollo térmico de las variantes de amilasa S242A y S242Q en ausencia y presencia de 2 mM de cloruro de calcio muestra un considerable aumento en los puntos de fusión de las variantes cuando se compara con el de la amilasa natural. En ausencia de cloruro de calcio añadido, la amilasa natural tiene un punto de fusión térmico de 100,8 °C, mientras que los T_m de S242A y S242Q son 106,5 °C y 110,1 °C, respectivamente. De esta manera, la sustitución de S242 con A resulta en un aumento en el T_m de 5,7 °C; y la sustitución de S242 con Q resulta en un aumento en el T_m de 9,3 °C.

[0277] En presencia de 2 mM de cloruro de calcio, la amilasa natural caracterizada tiene un punto de fusión térmico de 106,8 °C mientras los T_m para S242A y S242Q son 111,8 °C y 113,8 °C, respectivamente. De esta manera, en presencia de 2 mM de cloruro de calcio, las tres proteínas mostraron valores de T_m aumentados. El aumento de T_m en la amilasa natural y las variantes S242A fue 6 °C y 5,3 °C, respectivamente. El aumento de T_m en las variantes S242Q fue 3,7 °C. Esto sugiere que la variante S242Q se estabiliza en menor medida mediante calcio, o depende menos del calcio para la estabilidad. El aumento en el T_m de S242A y S242Q con relación a la amilasa natural en presencia de cloruro de calcio fue 5 °C y 3°C, respectivamente. Esto sugiere que las propiedades termodinámicas de las variantes difieren de las de SPEZYME® Xtra, y es coherente con su rendimiento mejorado en estudios de aplicación (véase el Ejemplo 5).

Tabla 4-1

	T _m (sin Ca ²⁺)	T _m (con 2 mM Ca ²⁺)
SPEZYME® Xtra	100,8	106,8
S242A	106,5	111,8
S242Q	110,1	113,8

Ejemplo 5. Perfiles de actividad

[0278] Este ejemplo muestra que las variantes analizadas tienen perfiles de actividad alterados con relación no sólo a la α -amilasa original sino también a una enzima estándar de la industria. Las determinaciones de proteína se hicieron sobre muestras purificadas o en placas. Tanto a las variantes experimentales como a las α -amilasas estándar se le administraron concentraciones de proteína iguales.

[0279] Cualquier variante en placa o purificada se diluyó a aproximadamente 20 ppm utilizando tampón de ácido málico de pH 5.6. El sustrato consistió en 15 % de almidón de maíz en el mismo tampón de ácido málico de 50 mM, pH 5.6. Se equilibraron 400 μ L de la suspensión de almidón a 70 °C durante 2,5 minutos. Después se añadieron rápidamente 7 μ L de la enzima diluida al almidón equilibrado (concentración final de proteína de aproximadamente 0,36 ppm). La mezcla de reacción se colocó entonces en un bloque de calentamiento por agitación precalentado a 85 °C y se mezcló a 300 rpm. Las reacciones se desactivaron con 50 μ L de 125 mM de NaOH a intervalos de tiempo predeterminados. Los tubos de reacción se hicieron girar entonces y el sobrenadante se diluyó 10 veces en 10 mM de NaOH, para analizar el perfil DP mediante HPAEC-PAD.

[0280] Las reacciones se establecieron a 4, 10 y 20 minutos. El área total de DP2 al final del proceso HPLC se integró y el área se dividió por la proteína total y el tiempo de reacción.

[0281] La reacción de 4 minutos proporciona una indicación de la rapidez con la que la enzima empieza a descomponer el sustrato; la reacción a los 10 minutos proporciona una indicación de la actividad térmica de la enzima, y la reacción a los 20 minutos proporciona una indicación de la estabilidad térmica de la enzima. Los resultados se proporcionan en las Figuras 7 y 8.

Ejemplo 6. Licuefacción en el viscosímetro

[0282] Este ejemplo muestra que las variantes S242A y S242Q del Ejemplo 3 que presentaron actividad residual alterada con relación a la amilasa natural original también tienen un rendimiento alterado con relación a la α -

amilasa original. Las variantes de α -amilasa del Ejemplo 2 se purificaron y se caracterizaron con respecto a proteína total y actividad específica antes de que se analizaran en la aplicación.

5 **[0283]** La reducción de la viscosidad de la harina de maíz debida a la acción de la α -amilasa se monitorizó utilizando un instrumento HAAKE Viscotester 550. La suspensión del sustrato se prepara nueva a diario a modo de lotes con 30 % de residuos secos de harina de maíz. El pH se ajustó a 5.8 utilizando ácido sulfúrico. Se pesaron 50 g de la suspensión (15 g de residuos secos) y se preincubaron, con agitación, durante 10 minutos para calentarlos hasta 70 °C. Después de la adición de la α amilasa la temperatura se elevó inmediatamente de 70 °C a 85 °C con una velocidad de rotación de 75. Una vez que la temperatura de la suspensión y la mezcla enzimática alcanzó 85 °C, la temperatura se mantuvo constante y la viscosidad se monitorizó durante 30 minutos más. La viscosidad se midió a lo largo del proceso y se reportó en μ Nm. A la AmyS natural, a la S242A y a la S242Q se les administraron concentraciones de proteína iguales (20 o 30 μ g/50 g de suspensión de harina de maíz).

10 **[0284]** La prueba de aplicación del viscosímetro mostró que ambas variantes Amys, S242A y S242Q, tuvieron mejor rendimiento que las α amilasas de referencia - LIQUOZYME® SC y SPEZYME® Xtra. Ambas variantes exhibieron el pico de viscosidad baja característico de SPEZYME® Xtra y la baja viscosidad final de LIQUOZYME® SC. Cuando se cargó a la menor concentración de 20 μ g de proteína total, las diferencias de los picos de viscosidad más bajos de las variantes comparados con los de LIQUOZYME® SC se hicieron aún más evidentes. Véanse las Figuras 9, 10 y 11.

Ejemplo 7. Licuefacción en un *Jet Cooker* (aparato de inyección de vapor a presión)

20 **[0285]** El maíz molido entero se suspendió en una suspensión al 32 % (residuos secos de maíz) utilizando una proporción de 70:30 de agua con respecto a vinaza. El pH de la suspensión se ajustó a pH 5.8 con 10 N de NaOH. La suspensión se calentó a 70 °C (158 °F) utilizando agua y vapor en una caldera con camisa calefactora. Se añadieron las enzimas de la licuefacción (SPEZYME® Xtra, LIQUOZYME® SC o S242Q) y se calentó la suspensión a 85 °C (158 °F) durante aproximadamente 10 minutos. Después de 10 minutos adicionales de incubación a 85 °C, la suspensión se hizo pasar por un *jet-cooker* mantenido a 107 °C (225 °F) con un tiempo de retención de 3 minutos utilizando un chorro grande de planta piloto (equipado con un hidrocalentador M103 de Hydro-thermal Corp., Waukesha, Wisconsin). El licuado se recogió del chorro a presión y se colocó en un baño termostático a 85 °C. Se añadió una segunda dosis de la enzima de licuefacción después del chorro a presión. El licuado se agitó de forma continuada y se mantuvo a 85 °C durante 90 minutos. Se recogieron muestras a los 0, 30, 60 y 90 minutos. Todas las muestras se analizaron después del chorro a presión para determinar el DE (utilizando el método Schoorls; método disponible previa solicitud), y la viscosidad (viscosímetro de tipo Brookfield (Lab-line Instruments Inc. de Melrose Park, Illinois), eje de 3 a 20 rpm). La dosificación de las enzimas de licuefacción antes y después del chorro a presión se indican en las siguientes Figuras como "X + Y", donde X representa el número de unidades de enzima añadidas antes del chorro a presión, e Y representa el número de unidades añadidas al licuado después de pasar por el *jet cooker*. Los resultados se muestran en las Figuras 12 y 13.

Ejemplo 8. Efecto de la eliminación de la inhibición del ácido fítico en la termoestabilidad de la α amilasa

[0286] En este ejemplo se examinó el efecto de la eliminación de la inhibición del ácido fítico en la termoestabilidad de las α -amilasas termoestables licuefactantes.

40 A. Sin *jet cooking* (aplicación de vapor a presión) (dosis de enzima individual)

[0287] Se preparó una suspensión de maíz molido entero (obtenido de Badger State Ethanol, Monroe, WI, EE.UU.) con agua que contenía 30 % volumen/volumen de vinaza a una concentración final de aproximadamente 32 % de residuo seco. Los sólidos de maíz se prepararon en una caldera con camisa calefactora. La suspensión se mezcló bien y se midió el pH de la suspensión (pH 5.2) y se utilizó sin ajustes adicionales de pH. Esta suspensión se mezcló en una caldera con camisa calefactora y se llevó a la temperatura de pretratamiento de 70 °C. Justo antes de alcanzar 70 °C, se añadieron la enzima licuefactante, es decir, una α amilasa (4 AAU por gramo de residuo seco de maíz) y una fitasa (4 FTU por gramo de residuo seco de maíz), y se inició un temporizador para comenzar la incubación o la etapa de licuefacción primaria. La suspensión se incubó durante 30 minutos en presencia de la amilasa con o sin fitasa añadida. La fitasa utilizada en este experimento fue BP-17 (véase el texto anterior). Aunque la fitasa se añadió al mismo tiempo que la α -amilasa en este ejemplo, se puede añadir antes de la amilasa.

55 **[0288]** La suspensión tratada se colocó después en un baño termostático mantenido a 90 °C para iniciar la etapa de licuefacción secundaria (2ª licuefacción). Se tomaron muestras para analizar la viscosidad (mediante Brookfield) y la DE (mediante Schoorls) a los 0, 30, 60 y 90 minutos. Los resultados se muestran en las Figuras 14 y 15.

B. Con *jet cooking* (dosis de enzima fraccionada)

[0289] Se preparó una suspensión de maíz molido entero (obtenido de Badger State Ethanol, Monroe, WI,) con agua que contenía 30 % volumen/volumen de vinaza a una concentración final de aproximadamente 32 % de residuo seco. Los sólidos de maíz se prepararon en una caldera con camisa calefactora. La suspensión se mezcló bien y se midió el pH de la suspensión (pH 5.2). Esta suspensión se mezcló en una caldera con camisa calefactora y se llevó a la temperatura de pretratamiento de 70 °C. Justo antes de alcanzar 70 °C, se añadió la enzima licuefactante, es decir, una variante de α -amilasa S242Q (3 AAU por gramo de residuo seco de maíz) y se inició un temporizador para comenzar la incubación o la etapa de licuefacción primaria. La suspensión se incubó durante 30 minutos en presencia de la α -amilasa con o sin fitasa añadida (4 FTU por gramo de residuo seco de maíz). Aunque la fitasa se añadió al mismo tiempo que la α -amilasa en este ejemplo, se puede añadir antes de la amilasa.

[0290] La suspensión incubada se hizo pasar entonces por un *jet cooker* (225 °F; 107,2° C) que se precalentó a la temperatura deseada utilizando vapor y agua. La suspensión se envió a través del chorro de vapor a presión a la velocidad máxima (configuración 1,5) de aproximadamente 4 litros/minuto. La utilización de los tres primeros circuitos del serpentín de retención dio como resultado un tiempo de retención de poco más de 3 minutos. Después de desplazar toda el agua y de que la temperatura deseada se mantuviera estable, se recogió una alícuota de masa de maíz solubilizada y se colocó en un baño secundario (agitación con varilla) a 85 °C para iniciar la etapa de licuefacción secundaria (2ª licuefacción). Se añadió una segunda dosis de S242Q (1 AAU/gm de residuo seco) y la licuefacción continuó durante 90 minutos más. Se tomaron muestras para analizar la viscosidad (mediante Brookfield) y la DE (mediante Schoorls) a los 0, 30, 60 y 90 minutos. Este licuado se utilizó en el Ejemplo 10B.

C. *Jet cooking*, convencional

[0291] Se preparó una suspensión de maíz molido entero (obtenido de Badger State Ethanol, Monroe, WI,) con agua que contenía 30 % volumen/volumen de vinaza a una concentración final de aproximadamente 32 % de residuo seco. Los sólidos de maíz se prepararon en una caldera con camisa calefactora. La suspensión se mezcló bien y se midió el pH de la suspensión (pH 5.2) y se ajustó a pH 5.8 con NaOH diluido. Esta suspensión se mezcló en una caldera con camisa calefactora y se llevó a la temperatura de pretratamiento de 70 °C. Justo antes de alcanzar 70 °C, se añadió la enzima licuefactante, es decir, una variante de α -amilasa S242Q (3 AAU por gramo de residuo seco de maíz) y se inició un temporizador para comenzar la incubación o la etapa de licuefacción primaria. La suspensión se incubó durante 30 minutos en presencia de la α -amilasa sin fitasa añadida.

[0292] La suspensión incubada se hizo pasar entonces por un *jet cooker* (225 °F; 107,2° C) que se precalentó a la temperatura deseada utilizando vapor y agua. La suspensión se envió a través del chorro de vapor a presión a la velocidad máxima (configuración 1,5) de aproximadamente 4 litros/minuto. La utilización de los tres primeros circuitos del serpentín de retención dio como resultado un tiempo de retención de poco más de 3 minutos. Después de desplazar toda el agua y de que la temperatura deseada se mantuviera estable, se recogió una alícuota de masa de maíz solubilizada y se colocó en un baño secundario (agitación con varilla) a 85 °C para iniciar la etapa de licuefacción secundaria (2ª licuefacción). Se añadió una segunda dosis de la variante de α -amilasa S242Q (1 AAU/gm de residuo seco) y la licuefacción continuó durante 90 minutos más. Se tomaron muestras para analizar la viscosidad (mediante Brookfield) y la DE (mediante Schoorls) a los 0, 30, 60 y 90 minutos. El experimento anterior con un pH de suspensión de 5.5. Véase la Figura 22. Este licuado se utilizó en el Ejemplo 10A.

D. Resultados con y sin *jet cooking*

[0293] La adición de fitasa BP-17 durante la incubación (licuefacción primaria) redujo el contenido de ácido fólico del maíz molido entero de 0,60 % de residuo seco de maíz a 0,09 % de residuo seco de maíz (reducción >85 %) (Figura 21). También es muy evidente a partir de las Figuras 14 y 15 que las α -amilasas se inactivaron a una temperatura de *jet cooking* de 225 °F (107 °C) basándose en el desarrollo del DE o en la reducción de la viscosidad. Sin embargo, la inclusión de fitasa antes del *jet cooking* (que se cree que elimina la inhibición del ácido fólico) dio como resultado un aumento significativo en la termoestabilidad de las α amilasas, como se muestra por la progresión del DE y la reducción de la viscosidad a 90 °C durante la etapa de licuefacción secundaria. Se observaron resultados similares con *jet cooking* (no se muestran los datos) como se muestra en las Figuras 14 y 15.

Ejemplo 9. Efecto de la concentración de fitasa BP-17 en la estabilidad de la α -amilasa con pH bajo

[0294] Se estudió además el aumento en la termoestabilidad de la α amilasa debido a la eliminación de la inhibición del ácido fólico de la α amilasa. El ácido fólico se hidrolizó utilizando fitasa antes de la licuefacción secundaria de maíz molido entero y se determinó la mejora en la estabilidad de pH con un pH bajo.

[0295] En un experimento típico, se suspendió maíz molido entero al 32 % (residuo seco de maíz) utilizando una proporción de 70:30 de agua y vinaza. Se midió el pH de la suspensión y se observó que era pH 5.2. La suspensión se calentó a 70 °C utilizando agua y vapor en una caldera con camisa calefactora. Se añadieron la enzima de licuefacción, es decir, la variante de α -amilasa S242Q (4 AAU/gm de residuo seco de maíz) y

concentraciones distintas de BP-17 (0-12 FTU/gm de residuo seco de maíz), y la suspensión se pretrató manteniendo la temperatura a 70 °C durante 45 minutos. Tras 45 minutos de pretratamiento, la suspensión se colocó en un baño termostático a 90 °C. El licuado se agitó continuamente y se mantuvo a 90 °C durante 90 minutos. Se recogieron muestras a los 0, 30, 60 y 90 minutos. Se analizó el DE (utilizando el método Schoorls) y la viscosidad (viscosímetro Brookfield eje de 2 a 20 rpm) de todas las muestras. Los datos de progresión del DE y de la viscosidad se resumen en las Figuras 16 y 17.

[0296] Los resultados de las Figuras 16 y 17 mostraron que la reducción de la inhibición del ácido fítico de la variante de α -amilasa S242Q dio como resultado un aumento significativo en la estabilidad de pH bajo para la actividad, como se demuestra por un aumento constante en la progresión del DE a 90 °C con una disminución concomitante en la viscosidad del licuado. Los datos mostraron claramente que la variante de α -amilasa S242Q se puede utilizar satisfactoriamente en el proceso de licuefacción para maíz molido entero con un pH 5.2 si se elimina la inhibición del ácido fítico. En la Figura 21, se puede observar que el índice de progresión del DE aumenta con el aumento de la eliminación del ácido fítico y alcanza un máximo en 4 FTU/gm de residuo seco que indica que la fitasa aumenta la termoestabilidad de la variante de α -amilasa S242Q eliminando el ácido fítico de la suspensión.

Ejemplo 10. Efecto del pH

[0297] En este ejemplo se estudió el efecto del pH en la variante de α -amilasa S242Q.

[0298] En un experimento típico, se suspendió maíz molido entero al 32 % (residuo seco de maíz) utilizando una proporción de 70:30 de agua y vinaza. Se midió el pH de la suspensión y se observó que era pH 5.2. El pH se disminuyó a entre 4.2 y 4.8 utilizando H₂SO₄. La suspensión se calentó a 70 °C utilizando agua y vapor en una caldera con camisa calefactora. Se añadieron la enzima de licuefacción, es decir, la variante S242Q (4 AAU/gm de residuo seco) y BP-17 (4 FTU/gm de residuo seco), y la suspensión se pretrató manteniendo la temperatura a 70 °C durante 45 minutos. Tras 45 minutos de pretratamiento, la suspensión se colocó en un baño termostático a 90 °C. El licuado se agitó continuamente y se mantuvo a 90 °C durante 90 minutos. Se recogieron muestras a los 0, 30, 60 y 90 minutos. Se analizó el DE (utilizando el método Schoorls) y la viscosidad (viscosímetro Brookfield eje de 2 a 20 rmps) de todas las muestras. Los datos de progresión del DE y de la viscosidad se resumen en las Figuras 18 y 19.

[0299] Los resultados mostraron que la progresión del DE disminuyó con la disminución del pH de 5.2 a 4.5. La enzima se inactivó por completo a un pH 4.2.

Ejemplo 11. Efecto en la producción de etanol

[0300] Los licuados se utilizaron como materia prima de fermentación en la fermentación del etanol para la producción de alcohol. Se mezcló una suspensión de maíz molido entero (obtenido de Badger State Ethanol, Monroe, WI) con agua que contenía 30 % volumen/volumen de vinaza a una concentración final de aproximadamente 32 % de residuo seco.

A. Proceso convencional

[0301] Se utilizó el licuado del Ejemplo 8C (Licuado A).

[0302] Se ajustó el pH del licuado secundario a 4.2 utilizando H₂SO₄ antes de la etapa de sacarificación y fermentación simultánea (SSF).

B. pH bajo, *jet cooking* (dosis fraccionada)

[0303] Se utilizó el licuado del Ejemplo 8B (Licuado B). No se realizó ningún ajuste de pH antes de la SSF.

C. Sacarificación y fermentación simultánea

[0304] En cada experimento se obtuvieron las taras de los pesos de los recipientes antes de la preparación de los medios. Se colocó un licuado de 32 % de residuo seco de maíz (2 litros) en un matraz de 2 L. Se prepararon inóculos de levadura de Red Star Ethanol Red (RED STAR (Lesaffre)) añadiendo de 10 gramos de levadura y un gramo de glucosa a 40 gramos de agua bajo agitación moderada durante una hora. Se añadieron cinco mls de cada inóculo a los fermentadores equilibrados, seguido por la adición de Etanol de G Zyme™ 480 (Danisco US Inc, Genencor Division) a 0,4 GAU/g de residuo seco (gds) de maíz para iniciar la sacarificación y fermentación simultánea. Se observó el peso bruto inicial y se colocó el matraz en un baño termostático mantenido a 32 °C. Las muestras se tomaron en diferentes intervalos de tiempo y se analizaron para determinar el contenido de carbohidrato y etanol utilizando HPLC. Las fermentaciones también se llevaron a cabo utilizando un kilogramo de cada licuado y se midió la pérdida de peso durante la fermentación en diferentes intervalos de tiempo. Se midió el alcohol, basándose en la pérdida de peso debido a la pérdida de dióxido de carbono. En la conclusión de la fermentación, se obtuvo un peso bruto final. El caldo se transfirió cuantitativamente a un recipiente de fondo redondo de 5 L. La destilación se llevó a cabo al vacío hasta que se recogieron aproximadamente 800 mls de etanol en un receptáculo que contenía 200 mls de agua. El etanol se diluyó a 2 L y se analizó mediante HPLC. El

peso y el DS de los residuos de destilación se obtuvieron antes del secado. El análisis del almidón residual se llevó a cabo en los granos secos de destilería con solubles (DDGS). Los cálculos estequiométricos se llevaron a cabo basándose en la pérdida de peso, la destilación y el análisis de almidón residual.

[0305] Cálculo de etanol utilizando la pérdida de peso de CO₂.

5

Producción de etanol (mmol) = pérdida de CO₂ (g) / 88

Producción de etanol (g) = (pérdida de CO₂ (g) / 88) * 92 => pérdida de CO₂ (g) * 1,045

Producción de etanol (ml) = ((pérdida de CO₂ (g) / 88) * 92) / 0,789

=> pérdida de CO₂ (g) x 1,325

10

[0306] Los datos de la Figura 20 muestran una diferencia principal en el contenido sin sulfato y ácido fítico entre el proceso convencional y el proceso sin ajuste de pH. La eliminación de la inhibición del ácido fítico de la α amilasa termoestable en la incubación dio como resultado los granos secos de destilería con solubles (DDGS) con contenido de ácido fítico reducido, una cantidad de fosfato libre disponible mayor y sulfato reducido. De esta manera, el proceso sin ajuste de pH confiere estabilidad de pH con un pH bajo para las α amilasas termoestables licuefactantes en la licuefacción del almidón.

15

Ejemplo 12. Métodos adicionales

[0307] Se utilizaron los siguientes ensayos en los Ejemplos descritos a continuación. Cualquier desviación de los protocolos proporcionados a continuación se indica en los Ejemplos. En estos experimentos, se utilizó un espectrofotómetro para medir la absorbancia de los productos formados después de la finalización de las reacciones.

20

A. Determinación del contenido de proteína

Ensayo BCA (ácido bicinconónico)

25

[0308] En estos ensayos, se utilizó el ensayo BCA (Pierce) para determinar la concentración de proteína en muestras en la escala de placas de microtitulación (MTP, por sus siglas en inglés). En este sistema de ensayo, las soluciones químicas y de reactivo utilizadas fueron: reactivo de ensayo de proteína BCA y tampón de dilución Pierce (50 mM de MES, pH 6.5, 2 mM de CaCl₂, 0,005 % de TWEEN®-80). El equipo utilizado fue un lector de MTP SpectraMAX (tipo 340; Molecular Devices). Las placas de microtitulación se obtuvieron de Costar (tipo 9017).

30

[0309] En la prueba, se pipetearon 200 µl del Reactivo BCA dentro de cada pocillo, seguido de 20 µl de proteína diluida. Después de mezclar minuciosamente, las MTPs se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Se eliminaron las burbujas de aire y se leyó la densidad óptica (OD) de la solución en los pocillos a 562 nm. Para determinar la concentración de proteína, la lectura de fondo se sustrajo de las lecturas de la muestra. La OD₅₆₂ se representó gráficamente para las proteínas estándar (enzima purificada), para producir una curva estándar. La concentración de la proteína de las muestras se interpoló a partir de la curva estándar.

35

Ensayo Bradford

40

[0310] En estos ensayos, se utilizó el ensayo del reactivo de colorante Bradford (Quick Start) para determinar la concentración de proteína en muestras en la escala MTP. En este sistema de ensayo, las soluciones químicas y de reactivo utilizadas fueron: reactivo de colorante Bradford Quick Start (BIO-RAD n° de catalogo 500-0205), y tampón de dilución (10 mM de NaCl, 0,1 mM de CaCl₂, 0,005 % de TWEEN®-80). El equipo utilizado fue un Robot Biomek FX (Beckman) y un lector de MTP SpectraMAX (tipo 340). Las placas de microtitulación se obtuvieron de Costar (tipo 9017).

45

[0311] En el análisis, se pipetearon 200 µl de reactivo de colorante Bradford dentro de cada pocillo, seguido de 15 µl de dilución de tampón. Finalmente, se añadieron 10 µl de caldo de cultivo filtrado en los pocillos. Después de mezclar minuciosamente, las placas de microtitulación se incubaron durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente. Se eliminaron las burbujas de aire y se leyeron las densidades ópticas de los pocillos a 595 nm. Para determinar la concentración de proteína, la lectura de fondo (es decir, a partir de pocillos no inoculados) se sustrajo de las lecturas de la muestra. Los valores de OD₅₉₅ obtenidos proporcionan una medida relativa del contenido de proteína en las muestras.

B. Ensayo de micromuestra para analizar el rendimiento de la enzima

50

[0312] Los detergentes utilizados en este ensayo no contenían enzimas o las enzimas presentes en detergentes comerciales se destruyeron mediante desactivación por calor como se describe en otra parte de este documento.

El equipo utilizado incluyó un termomezclador Eppendorf y un lector de MTP SpectraMAX (tipo 340). Las placas de microtitulación se obtuvieron de Costar (tipo 9017).

Preparación de detergente (AATCC HDL; condiciones de EE.UU.)

5 [0313] El agua Milli-Q se ajustó a 6 gpg de dureza de agua (Ca/Mg=3/1), y se añadió 1,5 g/l de detergente líquido de referencia estándar AATCC 2003 sin abrillantador. La solución detergente se agitó vigorosamente durante al menos 15 minutos. Después, se añadieron 5 mM de HEPES (sin ácido) y se ajustó el pH a 8.0.

Ensayo de micromuestra de almidón de arroz para analizar el rendimiento de la amilasa

10 [0314] Los detergentes de prueba se prepararon como se describe en otra parte de este documento. El equipo utilizado incluyó una agitadora/incubadora New Brunswick Innova 4230 y un lector de MTP SpectraMAX (tipo 340). Las placas de microtitulación se obtuvieron de Corning (tipo 3641). Las muestras de almidón de arroz refinado con pigmento color naranja (CS-28) se obtuvieron del Center for Test Materials (Centro de materiales de ensayo) (Vlaardingen, Países Bajos). Antes de cortar micro-muestras circulares de 0,25 pulgadas (6,35 mm), la tela se lavó con agua. Se colocaron dos micromuestras en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. El detergente de prueba se equilibró a 20 °C (Norte America) o 40 °C (Europa Occidental). Se añadieron 15 190 µl de solución detergente en cada pocillo de la placa de microtitulación, que contenían micro muestras. A esta mezcla, se añadieron 10 µL de solución de enzima diluida. La placa de microtitulación se selló con una lámina adhesiva y se colocó en la incubadora durante 1 hora con agitación a 750 rpm a la temperatura de prueba deseada (normalmente 20 °C o 40 °C). Después de la incubación, se transfirieron 150 µl de la solución de cada pocillo a una placa de microtitulación nueva. Esta placa de microtitulación se leyó a 488 nm utilizando un lector 20 de placas de microtitulación SpectraMAX para cuantificar la limpieza. Los controles en blanco, así como los controles que contenían las micromuestras y el detergente, pero no enzima, también se incluyeron.

Cálculo del rendimiento de la enzima

25 [0315] El valor de absorbancia obtenido se corrigió para el valor del blanco (es decir, obtenido después de la incubación de las micromuestras en ausencia de enzima). La absorbancia resultante fue una medida de la actividad hidrolítica.

C. Determinación de la concentración de amilasa mediante titulación con anticuerpo

30 [0316] Como se describe en el presente documento, la concentración de α -amilasa y la actividad específica se determinó mediante titulación con un anticuerpo policlonal inhibidor. Se observó que los anticuerpos policlonales originados para α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (AmyS) eran fuertes inhibidores de AmyS y la α -amilasa de *Bacillus sp.* TS-23 (por ejemplo, la unión en lo suficientemente fuerte para producir una titulación lineal de la pérdida de actividad). Por consiguiente, este anticuerpo se puede utilizar para medir la concentración de enzima, que a su vez se utiliza para calcular la actividad específica. En resumen, se mide la cantidad de inhibición enzimática producida por varias concentraciones de anticuerpo conocidas. A partir de esta información, la concentración de anticuerpo requerida para la inhibición completa se extrapola, que es equivalente a la 35 concentración de enzima en la muestra. La actividad de la α -amilasa y la inhibición se midieron utilizando el ensayo de almidón con BODIPY fluorogénico. El tampón fue de 50 mM de MOPS, pH 7.0, que contenía 0,005 % de Tween-80.

40 [0317] Un anticuerpo policlonal dirigido contra AmyS purificadas se originó en un conejo y se purificó mediante métodos estándar. Se determinó un valor "de concentración aparente" empírico de una solución madre del anticuerpo midiendo la inhibición de una muestra de AmyS de actividad específica conocida. Entonces se utilizó la muestra del anticuerpo para determinar la concentración y la actividad específica de las variantes AmyS y TS23t. Estos valores se utilizaron para crear placas madre enzimáticas de 96 pocillos normalizadas, donde todas las variantes se diluyeron a una concentración común.

D. Electroforesis en gel de la proteína nativa

45 [0318] Se midió la movilidad electroforética de muestras de variantes de proteína utilizando el sistema PhastGel (GE Healthcare) en geles de poli(acrilamida) nativos prefabricados (PhastGel Homógeno) a una concentración ya sea de 7,5 % o de 12,5 %. Se utilizaron tiras de tampón (PhastGel Nativo) y consistieron en pH 8.8 en 0,88 M de L-Alanina, 0,25 M de tampón de Tris. Las condiciones normales del proceso consistieron en 400 V durante 12,75 minutos con una distancia de ánodo a cátodo de 3,7 cm.

50 [0319] De forma alternativa, la movilidad electroforética de las muestras de variantes de proteína se midió en geles de agarosa de 1 mm de grosor al 0,5 % - 1,5 % con varios valores de pH (es decir, 5.8, 8.0 y 10.0) mediante una selección de un sistema de tampón adecuado. La electroforesis se lleva a cabo bajo condiciones no desnaturizantes. La longitud del cátodo-ánodo fue de 13,9 cm. Se mezcló una muestra de 1-2 µg de proteína con 5 % de glicerol + 0,05 % de bromofenol azul y se cargó en cada calle. Los geles se procesaron 55 normalmente durante 1 hora a 100 V.

[0320] En ambos casos, los geles se tiñeron con colorante azul Louisville disuelto en 10 % de ácido acético y se destiñeron con 10 % de metanol y 10 % de ácido acético en agua. Es posible cargar entre 12 y 20 variantes de proteína simultáneamente, dependiendo del sistema de gel nativo utilizado. Como consecuencia, la movilidad electroforética de una variante de proteína se puede evaluar inmediatamente con relación a los estándares de escala de carga (*charge ladder standards*) en el mismo gel.

E. Inactivación del detergente por calor

[0321] La inactivación por calor de las fórmulas detergentes comerciales sirve para destruir la actividad enzimática de cualquier componente de proteína mientras se conservan las propiedades de los componentes no enzimáticos. De esta manera, este método fue adecuado para preparar detergentes adquiridos comercialmente para utilizarse en el análisis de variantes de la enzima. Para los detergentes para lavar la ropa líquidos de alta resistencia (HDL, por sus siglas en inglés) de Norteamérica (NA) y de Europa Occidental (WE), la inactivación por calor se realizó colocando el detergente líquido previamente pesado (en una botella de vidrio) en un baño termostático a 95 °C durante 2 horas. El tiempo de incubación para la inactivación por calor del detergente para lavar la ropa granulado de alta resistencia (HDG, por sus siglas en inglés) de Norteamérica (NA) y Japón (JPN) fue de 8 horas y el tiempo de incubación para el detergente HDG de Europa Occidental (WE) fue de 5 horas. El tiempo de incubación para la inactivación por calor de los detergentes para lavavajillas automáticos (ADW, por sus siglas en inglés) de NA y WE fue de 8 horas. Los detergentes se adquirieron en supermercados locales. Tanto los detergentes calentados como los no calentados se ensayaron durante los 5 minutos de disolución del detergente para determinar con precisión el porcentaje desactivado. La actividad de enzima se analizó mediante el ensayo suc-AAPF-pNA.

[0322] Para analizar la actividad enzimática en detergentes inactivados por calor, las disoluciones de detergentes operativas se prepararon a partir de los concentrados inactivados por calor. Las cantidades de dureza del agua adecuadas (6 gpg o 12 gpg) y el tampón se añadieron a las disoluciones detergentes para ajustarse a las condiciones deseadas (Tabla 12-1). Las disoluciones se mezclaron mediante agitación de vórtice o inversión de las botellas.

Tabla 12-1. Condiciones para lavado de ropa y lavavajillas							
Región	Forma	Dosis	Detergente*	Tampón	Gpg	pH	T (°C)
Lavado de ropa (líquido y granulado de alta resistencia)							
NA	HDL	0,78 g/l	P&G TIDE® 2X	5 mM de HEPES	6	8.0	20
WE	HDL	5,0 g/L	Henkel Persil	5 mM de HEPES	12	8.2	40
WE	HDG	8,0 g/L	P&G Ariel	2 mM de Na ₂ CO ₃	12	10.5	40
JPN	HDG	0,7 g/L	P&G TIDE®	2 mM de Na ₂ CO ₃	6	10.0	20
NA	HDG	1,0 g/L	P&G TIDE®	2 mM de Na ₂ CO ₃	6	10.0	20
Lavavajillas automático							
WE	ADW	3,0 g/L	RB Calgonit	2 mM de Na ₂ CO ₃	21	10.0	40
NA	ADW	3,0 g/L	P&G Cascade	2 mM de Na ₂ CO ₃	9	10.0	40

* Abreviaciones: Procter & Gamble (P&G); y Reckitt Benckiser (RB).

F. Ensayo con Terg-o-tometer para determinar el rendimiento de la limpieza

[0323] Se utilizó un protocolo estándar para evaluar la limpieza de suciedad de proteína y carbohidrato por el que se midió el nivel de suciedad en una muestra de tela antes y después de la limpieza bajo condiciones estándar. Las muestras de tela consistieron en tela de algodón tejida manchada con almidón de maíz, almidón de arroz o una mezcla de sangre, leche y negro de carbón, y se compraron de Testfabrics, Inc. (West Pittston, PA). Las manchas técnicas de almidón de maíz (EMPA 161) y sangre, leche y negro de carbón (EMPA 116) se produjeron mediante materiales de prueba AG EMPA (St. Gallen, Suiza). Las manchas de almidón de arroz (CFT CS-28) las produjo el Center for Testmaterials BV (Vlaardingen, Países Bajos). Cada mancha se midió antes y después del tratamiento por reflectancia óptica utilizando un reflectómetro Minolta CR-410 ajustado a un iluminante estándar D65 (6500 °K). La diferencia en los valores L, a, b se convirtió en una diferencia de color total (dE), como se define por el espacio de color CIE-LAB. La limpieza de las manchas se expresó como el índice de eliminación de manchas en porcentaje (% SRI, por sus siglas en inglés) tomando una relación entre la diferencia en color antes y después del lavado y comparándola con la diferencia de manchas no lavadas (antes del lavado) con respecto a la tela no manchada.

[0324] Los experimentos de limpieza se llevaron a cabo en un Terg-o-tometer (United States Testing Co., Hoboken, NJ) equipado con 6 recipientes de acero inoxidable de 2 L con agitadores en la parte superior. Cada tratamiento se llevó a cabo en un volumen total de 1 L que consistía en 6 granos por galón 3:1 (calcio:magnesio) de dureza de agua o en 12 granos por galón de dureza de agua. Los detergentes utilizados en los experimentos de lavado fueron 1,5 g/L de detergente líquido de AATCC HDL WOB 2003 con 5 mM de tampón de HEPES con pH 8, 0,7 g/L de detergente granulado de AATCC HDD WOB 1993, 8 g/L de detergente granulado IEC A* 60456

con perborato y blanqueador TAED, o 5 g/L de detergente líquido Persil Power Gel. La enzima se agregó directamente a la solución de lavado y se iniciaron entonces las reacciones añadiendo 40 g/L o 200 g/L de tela manchada o de lastre. Las reacciones de lavado se agitaron a 100 rpm durante 10, 15 o 40 minutos a 20 °C, 25 °C, 30 °C, 40 °C, o 50 °C. Después de la limpieza, las muestras se enjuagaron durante 3 minutos con agua del grifo, se centrifugaron en una lavadora de carga frontal a 1000 rpm para eliminar el exceso de agua, y se secaron en una secadora a baja temperatura en un ciclo de planchado permanente durante aproximadamente 45 minutos. La comparación del grado de eliminación de suciedad se evaluó mediante reflectometría y se expresó como el índice de eliminación de suciedad en porcentaje (% SRI). La condición de control no contuvo enzima y el control positivo consistió en varias dosis de enzimas comerciales de referencia.

10 **G. Ensayo de almidón con BODIPY para la determinación de la actividad de la amilasa**

[0325] El ensayo de almidón con Bodipy se llevó a cabo utilizando el kit de ensayo de ultra amilasa ENZCHEK® (E33651, Invitrogen). Se preparó 1 mg/mL de solución madre del sustrato de almidón DQ disolviendo el contenido del recipiente que contenía el sustrato liofilizado en 100 µL de 50 mM de tampón de acetato de sodio con pH 4.0. El recipiente se agitó en vórtice durante aproximadamente 20 segundos y se dejó a temperatura ambiente, en la oscuridad, mezclando ocasionalmente hasta que se disolvió. Se añadieron 900 µL de tampón de ensayo (50 mM de acetato de sodio con 2,6 mM de CaCl₂, pH 5.8) y el recipiente se agitó en vórtice durante aproximadamente 20 segundos. La solución de sustrato se almacenó a temperatura ambiente, en la oscuridad, hasta que estuvo lista para utilizarse o a 4 °C. Para el ensayo, se prepararon 100 µg/mL de solución operativa del sustrato DQ a partir de 1 mg/mL de solución del sustrato en el tampón de ensayo. Se añadieron 190 µL de 100 µg/mL de solución del sustrato en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano. Se añadieron 10 µL de las muestras de enzima en los pocillos, se mezcló durante 30 segundos utilizando un termomezclador a 800 rpm. Se incluyó en el ensayo una muestra en blanco que contenía tampón y sustrato solamente (blanco sin enzima). El índice de cambio de la intensidad de fluorescencia se midió (excitación: 485 nm, emisión: 520 nm) en un lector de placas de microtitulación de fluorescencia a 25 °C durante 5 minutos.

25 **H. Hidrólisis de harina de maíz para determinar la actividad de la amilasa**

[0326] *Ensayo de hidrólisis del almidón del de sustrato de harina de maíz para la actividad enzimática.* La harina de maíz orgánico (Azure Farms, lot n° 03227) se extendió uniformemente en una microplaca Greiner de 96 pocillos, con pocillos de tubo de fondo plano negros de polipropileno (n° de cat. 655209), utilizando un dispositivo de dispensación de sólidos (V&P Scientific). Se añadieron 85 µL de 20 mM de acetato de sodio con pH 5.6 en cada pocillo y se mezclaron. Se aplicó un sello de lámina en la parte superior de la placa y la placa se preincubó a 70 °C en el termomezclador durante 20-30 minutos. Las muestras de enzima se diluyeron en la placa de polipropileno de Agilent (5042-1385) en 20 mM de tampón de acetato de sodio. Se añadieron 11 µL de muestras de enzimas diluidas a la placa del sustrato y la placa se selló firmemente con otra lámina. Las placas se transfirieron entonces a una incubadora/agitadora Vortemp 56 de Labnet con bloques de metal (n° de cat. S2056A), se precalentaron a 95 °C y se ajustó la velocidad de agitación a 500 rpm. La incubación continuó durante 30 minutos. Al final de la incubación, las placas se enfriaron rápidamente en un cubo con hielo y la reacción de hidrólisis del almidón se detuvo mediante la adición de 100 µL de 0,1 N H₂SO₄ a cada pocillo. La placa se mezcló brevemente y los productos de la reacción de hidrólisis del almidón se analizaron o por el ensayo PAHBAH o por HPLC.

[0327] *Detección colorimétrica de concentraciones de azúcar soluble a partir de la hidrólisis enzimática del sustrato de harina de maíz.* Se añadieron alícuotas de 80 µL de 0,5 N de NaOH a todos los pocillos de una placa de PCR vacía seguido de 20 µL de reactivo PAHBAH (5 % en peso/volumen de hidrazida de ácido p-hidroxibenzoico (PAHBAH, Sigma # H9882, disuelto en 0,5 N de HCl) y se mezclaron (placa de reacción PAHBAH). Se añadieron 10 µL de los sobrenadantes de la reacción hidrolítica del almidón a la placa de reacción PAHBAH. Todas las placas se sellaron y se colocaron en el termociclador (MJ Research Tetrad), programado durante 2 minutos a 95 °C, y después se enfriaron a 20 °C. Se transfirieron a una placa de lectura muestras de 80 µL de las mezclas de reacción PAHABH desarrolladas y se midió la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro.

[0328] *Determinación HPLC de concentraciones de azúcar soluble a partir de la hidrólisis enzimática del sustrato de harina de maíz.* Los estándares de azúcar soluble (DP1-DP7) obtenidos de Sigma (St. Louis, MO) se diluyeron todos en agua Milli-Q a 100 mg/mL y se utilizaron para convertir el área pico para los azúcares en concentraciones de azúcar reales. La placa inactivada del ensayo de hidrólisis del almidón se hizo girar en una centrifugadora Beckman Coulter Allegra 6R durante 5 minutos a 3000 rpm a 25 °C. El sobrenadante se pipeteó a partir de la placa de giro y se transfirió a una placa de filtro Multiscreen-HV (n° de catálogo MAHVN4550). La placa de filtro se hizo girar sobre una placa HPLC de Agilent en la centrifugadora Hettich Rotanta durante 10 minutos a 6000 rpm a 25 °C. Se transfirieron 50 µL de 0,01 N de la fase móvil de ácido sulfúrico (0,1 N de ácido sulfúrico diluido 10X con agua Milli-Q) a cada pocillo de otra placa HPLC de Agilent limpia. La placa filtrada se mezcló brevemente y se transfirieron 50 µL del filtrado a los pocillos correspondientes en la placa con 50 µL de fase móvil por pocillo. Los estándares del azúcar diluido se añadieron a los pocillos vacíos de la placa para incluirse en la calibración. El contenido se mezcló brevemente en una agitadora de plataforma y la placa se cubrió con una tapa con ranuras para pocillos de Nalgene. La columna HPLC (columna Bio-Rad Aminex HPX-

87H n° de cat. 125-0140) se preparó de antemano con 2 L de fase móvil funcionando a una velocidad de flujo constante de 0,6 mL/minuto. Todas las muestras de la placa se llevaron a cabo con un volumen de inyección de 20 µL y se analizaron utilizando AMINEXH.M y RID (índice de refracción) como detector. Después de completar el proceso, la velocidad de flujo en la HPLC disminuyó a 0,05 mL/min.

5 I. Determinación de la reducción de la viscosidad del almidón mediante amilasa

10 [0329] En este ensayo, se midió la reducción de la viscosidad de la solución del sustrato del almidón de maíz en un viscosímetro. La suspensión del sustrato de almidón de maíz se preparó nueva en el modo por lotes con 30 % de residuos secos de harina de maíz en agua destilada y se ajustó a un pH 5.8 utilizando ácido sulfúrico. Para cada proceso, se pesaron 50 gr de la suspensión (15 gramos de residuos secos) y se preincubaron durante 10 minutos para calentarlos a 70 °C. Después de la adición de la amilasa, la temperatura se elevó inmediatamente de 70 °C a 85 °C con una velocidad de rotación de 75 rpm. Una vez que la temperatura de la mezcla de suspensión y amilasa alcanzó 85 °C, la temperatura se mantuvo constante y la viscosidad se monitorizó durante 30 minutos más.

J. Medición de la unión de la enzima a sustratos macromoleculares

15 [0330] Los ensayos de unión se realizaron para determinar la unión del sustrato de las variantes de la escala de carga de Amilasa (AmyS) (cambio de carga = -12 a +12 con relación a la AmyS natural) a residuos y bagazo de maíz. Los sustratos utilizados incluyeron bagazo (bagazo de caña de azúcar de Brasil, pretratado con ácido diluido por el National Renewable Energy Laboratory, lavado y tamponado a pH 5), AFEX (residuo de maíz de expansión de fibra de amoníaco) y PCS (residuo de maíz pretratado con ácido sulfúrico diluido, lavado y ajustado a pH 5). Todos los sustratos se llevaron al porcentaje de sólidos deseado antes de utilizarse.

25 [0331] *Unión de amilasa:* Las variantes de la escala de carga de amilasa (*Amylase charge ladder variants*) se purificaron y se diluyeron a 200 ppm para analizarlas. Se preparó una solución de bagazo de celulosa al 1 % en tampón de borato (40 mM, pH 8.5, 0,016 % de Tween80). Se añadieron 150 µl de la solución de bagazo en cada pocillo en una placa de filtración de microtitulación. Se añadieron 150 µl de tampón de borato en un grupo de pocillos separados, que sirvieron como controles. Se añadieron 10 µl de variantes de la escala de carga de amilasa en la placa de filtración, cada condición estaba por duplicado. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. El filtrado se recogió y la actividad de la amilasa en el sobrenadante se midió mediante el ensayo de almidón con BODIPY.

30 [0332] *Medición de la unión de la enzima a micromuestras:* Las variantes de amilasa se incubaron con o sin micromuestras de almidón de arroz CS-28 bajo condiciones de lavado estándar durante 30 minutos. La cantidad de enzima libre se midió mediante el ensayo de almidón con BODIPY. La fracción de la unión de la enzima a las micromuestras se calculó como sigue: Fracción de unión = Actividad de la enzima en ausencia de muestra - Actividad de la enzima en presencia de muestra) / (Actividad de la enzima en ausencia de muestra).

K. Cuantificación de proteína de amilasa de *Geobacillus stearothermophilus*

35 [0333] La proteína de amilasa de *G. stearothermophilus* se cuantificó mediante inmunoensayo competitivo. En resumen, la amilasa de *G. stearothermophilus* purificada se marcó con un colorante fluorescente (fluoresceína) y el anticuerpo con respecto a la amilasa de *G. stearothermophilus* se marcó con un colorante inhibidor de la fluorescencia (tetrametilrodamina). La señal de fluorescencia del conjugado de amilasa con fluoresceína se inactiva tras la unión del anticuerpo marcado con inhibidor. La presencia de amilasa libre en la muestra compite por el anticuerpo marcado con inhibidor, dando como resultado un aumento de la señal de fluorescencia. Por consiguiente, la intensidad de la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de amilasa libre en la muestra. El ensayo se calibró con amilasa de *G. stearothermophilus* purificada de concentraciones conocidas.

45 [0334] *Marcado de la amilasa de G. stearothermophilus con colorante fluorescente:* La amilasa de *Geobacillus stearothermophilus* purificada se marcó con isotiocianato de fluoresceína (Molecular Probes, Eugene OR) con pH 9.5 en 50 mM de tampón de carbonato de sodio según el protocolo del fabricante. Al final de la reacción, la proteína se separó del colorante no unido mediante filtración de gel sobre Sephadex G-25 (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) en solución salina tamponada con fosfato.

50 [0335] *Preparación del anticuerpo y marcado con colorante inhibidor:* El anticuerpo con respecto a la amilasa de *Geobacillus stearothermophilus* se preparó mediante inmunizando conejos y recuperando el antisuero. El antisuero se almacenó a -20 °C hasta su uso. Se preparó la fracción de inmunoglobulina llevando a cabo la precipitación de sulfato de amonio; se añadieron 15 ml de 3,75 M de sulfato de amonio a 20 ml de antisuero y se dejó reposar a 4 °C durante 60 minutos antes de la centrifugación a 2000 g para recuperar el precipitado. El precipitado recuperado se lavó dos veces mediante suspensión y sedimentación en 10 ml 1,6 M de sulfato de amonio helado. El precipitado final se disolvió en 4 ml de agua y se dializó frente a 50 mM de carbonato de sodio con pH 9.5 a 4 °C. Se estimó que la concentración de proteína fue 29,2 mg/ml mediante A280 utilizando el coeficiente de extinción $\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}} = 15$. La fracción de inmunoglobulina se marcó con isotiocianato de tetrametilrodamina (Sigma, St. Louis, MO) en 50 mM de carbonato de sodio pH 9.5. El colorante no unido se

eliminó entonces por filtración en gel en una columna de Sephadex G-25 equilibrada con solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,1 % de desoxicolato.

5 **[0336] Procedimiento del ensayo:** El inmunoensayo se llevó a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos (Coming #3650). La concentración de la amilasa con fluoresceína se ajustó de manera que la concentración final en el ensayo fuera el centro de la curva estándar deseada. De forma similar, la concentración del anticuerpo inhibidor se ajustó de tal manera que la concentración final permitiera la máxima modulación de la señal de fluorescencia. Utilizando un sistema de manipulación de líquidos automatizado, se añadieron 5 µL de muestra, 5 µL de amilasa con fluoresceína y 5 µL de anticuerpo inhibidor a 180 µL de solución salina tamponada con fosfato que contenía 2 % (peso/volumen) de polietilenglicol 8000 (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.). Después de agitar brevemente, las placas se dejaron incubar a temperatura ambiente durante una hora y la señal de fluorescencia se determinó utilizando un lector de placas de fluorescencia (Molecular Devices) con filtros de excitación y emisión ajustados a 495 nm y 520 nm, respectivamente.

Ejemplo 13. Producción de amilasa en *B. subtilis*

15 **[0337]** En este ejemplo, se describen la producción de un mutante truncado de α amilasa de amilasa de *G. stearothermophilus* (que tiene una mutación S242Q y una delección del aminoácido 29 del extremo C-terminal; también referido en el presente documento como S242Q) y sus variantes en *B. subtilis*. La transformación se llevó a cabo como se conoce en la técnica (véase por ejemplo, WO 02/14490). En resumen, el gen que codifica las amilasas originales se clonó en el vector de expresión pHPLT, que contiene el promotor LAT (PLAT), una secuencia que codifica el péptido de señal LAT (preLAT), seguido por los sitios de restricción PstI y HpaI para la clonación.

[0338] La región de codificación para el péptido de señal LAT se muestra a continuación:

atgaaacaac aaaaacggct ttacgccoga ttgctgacgc tggtatttgc gctcatcttc
ttgctgcttc attctgcagc ttcagca (SEQ ID N° 20).

[0339] La secuencia de aminoácidos del péptido de señal LAT se muestra a continuación:

25 MKQQKRLYAR LLTLLFALIF LLPHSAASA (SEQ ID N° 21)

[0340] La secuencia de aminoácidos de la amilasa S242Q madura truncada con el aminoácido sustituido que se muestra en cursiva se utilizó como base para hacer las genotecas de variantes descritas en el presente documento:

30 AAFPNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANEA NNLSSLGITA LWLPPAYKGT SRSDVGYGVY
DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWDAVE
VNPSDRNQEI SGTYQIQAWT KDFPGRGNT YSSEFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG
IGKAWDWEVD TENGNYDYLM YADLDMOHPE VVTELKNWVK WYVNTTNIDG FRLDAVKHIK
FQFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NKLHNYITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK
SGGAFDMRTL MTNTLMKDQP TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WWDPFKPLA YAFILTRQEG
YPCVFYGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG WTREGVTEKP
35 GSGLAALITD GPGGSKWYV GKQHAGKVFY DLTGNRSDTV TINS DGWGEF KVNGGSVSVW
VPRKTT (SEQ ID N° 22).

[0241] La región de codificación de la amilasa AmyS madura se muestra a continuación:

gccgcaccgt ttaacggtac catgatgcag tattttgaat ggtacttgcc ggatgatggc
 acggttatgga ccaaagtggc caatgaagcc aacaacttat ccagccttgg catcaccgct
 ctttggtctgc cgcccgtta caaaggaaca agccgcagcg acgtagggtta cggagtatac
 gacttgatg acctcggcga attcaatcaa aaagggaccg tccgcacaaa atatggaaca
 aaagctcaat atcttcaage cattcaagcc gcccacgccc ctggaatgca agtgtacgcc
 5 gatgtcgtgt tgcaccataa aggcggcgcgt gacggcacgg aatgggtgga cgccctcgaa
 gtcaatccgt ccgaccgcaa ccaagaaatc tcgggcacct atcaaatcca agcatggacg
 aaatttgatt ttcccgggcg gggcaacacc tactccagct ttaagtggcg ctggtacat
 tttgacggcg ttgactggga cgaaagccga aaattaagcc gcatttaca atcccgggc
 atcggcaaaag cgtgggattg ggaagtagac acggaaaacg gaaactatga ctacttaatg
 tatgccgacc ttgatatgga tcatcccga gtcgtgaccg agctgaaaaa ctgggggaaa
 10 tgggtatgtca acacaacgaa cattgatggg ttccggcctt atgccgtcaa gcatattaag
 ttcagttttt ttccctgattg gttgtcgtat gtgcgttctc agactggcaa gccgctat
 accgtcgggg aatattggag ctatgacatc aacaagttgc acaattacat tacgaaaaca
 aacggaacga tgtctttgtt tgatgccccg ttacacaaca aattttatac cgcttccaaa
 tcagggggcg catttgatat gcgcacgta atgaccaata ctctcatgaa agatcaaccg
 acattggccg tcacctcgt tgataatcat gacaccgaac ccggccaagc gctgcagtca
 15 tgggtcgacc catggttcaa accgttgget tacgccttta ttctaactcg gcaggaagga
 taccctgctg tcttttatgg tgactattat ggcattccac aatataacat tccttcgctg
 aaaagcaaaa tcgatccgct cctcatcgcg cgcagggatt atgcttacgg aacgcaacat
 gattatcttg atcactccga catcatcggg tggacaaggg aaggggtcac tgaaaaacca
 ggatccgggc tggccgcact gatcaccgat gggccgggag gaagcaaatg gatgtacggt
 ggcaaaacac acgctggaag agtgttctat gaccttaccg gcaaccggag tgacaccgct
 accatcaaca gtgatggatg gggggaattc aaagtcaatg gcgggttcggt ttcggtttgg
 20 gttcctagaa aaacgaccgt ttctaccatc gctcggccga tcacaaccgg accgtggact
 ggtgaattcg tccggttgac cgaaccacgg ttggtggcat ggct (SEQ ID N° 23).

[0342] La secuencia de aminoácidos de la amilasa AmyS madura se utilizó como bases para hacer las genotecas de variantes AmyS y se proporciona como SEQ ID N° 2.

25 **[0343]** Los productos de PCR se purificaron utilizando columnas Qiaquick de Quiagen, y se volvieron a suspender en 50 µL de agua desionizada. Se asimilaron 50 µL del ADN purificado con HpaI (Roche) y PstI (Roche), y el ADN resultante se volvió a suspender en 30 µL de agua desionizada. Se clonaron 10-20 ng/µL del ADN en plásmido pHPLT utilizando los sitios de clonación PstI y HpaI. Las mezclas de ligación se transformaron directamente en células *B. subtilis* competentes (genotipo: Δvpr, ΔwprA, Δmpr-ybfJ, ΔnprB). Las células *B. subtilis* tienen un gen de competencia (comK) que se coloca bajo un promotor inducible de xilosa, por lo que se utilizó xilosa para inducir competencia para la unión y absorción de ADN (véase, Hahn *et al.* (1996) *Mol. Microbiol.* 21:763-775).

35 **[0344]** Los elementos del plásmido pHPLT-AmyS incluyen: pUB 110 = fragmento de ADN del plásmido pUB110 (McKenzie *et al.* (1986) *Plasmid* 15: 93-103). Las características del plásmido incluyen: oripUB 110 = origen de la replicación de pUB110; neo = gen de resistencia a neomicina de pUB110, Plat = promotor de transcripción de la amilasa de *B. licheniformis*; Pre LAT = péptido de señal de amilasa de *B. licheniformis*; SAMY 425ss = La región de codificación de la secuencia del gen de AmyS truncada (reemplazada por las regiones de codificación para cada variante de AmyS truncada expresada en este estudio); Terminador = terminador de transcripción de la amilasa de *B. licheniformis*.

40 **Ejemplo 14. Expresión de variantes de enzima**

[0345] Este ejemplo describe los métodos utilizados para expresar varias enzimas recombinantes de la *B. subtilis* transformada de los Ejemplos anteriores en una escala de 2 ml.

45 **[0346]** Los clones de *B. subtilis* que contienen los vectores de expresión de AmyS (o una de sus variantes) o de S242Q (o una de sus variantes) se replicaron con un replicador de 96 pocillos de acero a partir de concentrados de glicerol en placas de cultivo de 96 pocillos (BD, 353075) que contenían 150 µl de medio LB + 10 µg/ml de

neomicina, se cultivaron durante la noche a 37 °C, 220 rpm en un contenedor humidificado. Se utilizó una alícuota de 100 µl del cultivo de la noche para inocular 2000 µl de medio definido + 10 µg/ml de neomicina en tubos de cultivo de plástico de 5 ml. El medio de cultivo fue un medio semidefinido enriquecido basado en el tampón de MOPS, con urea como la fuente de nitrógeno principal, glucosa como la fuente de carbono principal, y se complementó con 1 % de soytone y 5 mM de calcio para un crecimiento celular fuerte. Los tubos del cultivo se incubaron a 37 °C, 250 rpm, durante 72 horas. Después de esta incubación, los caldos de cultivo se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 x g. La solución del sobrenadante se decantó en tubos cónicos de polipropileno de 15 ml y se alicuotaron 80 µL de cada muestra en placas de 96 pocillos para cuantificar la proteína.

10 **Ejemplo 15. Producción de variantes de enzima**

[0347] Este Ejemplo describe la producción de las escalas de carga de enzima y de las genotecas de carga de combinación.

Escalas de carga de enzima

15 [0348] Se seleccionan múltiples variantes de proteína que abarcan una gama de propiedades físicas de interés a partir de genotecas existentes o se generan mediante técnicas de mutagénesis dirigida como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, la publicación de la patente estadounidense nº 2008-0293610). Este grupo de proteínas sonda definido se ensaya entonces en un análisis de interés.

20 [0349] Se muestran ejemplos de variantes de escala de carga de amilasa en las tablas que aparecen a continuación y se ensayaron como se describe en el presente documento. En estas tablas, el cambio de carga es relativo a la enzima original.

[0350] Se proporcionó la secuencia del gen AmyS a Gene Oracle (Mountain View, CA) para sintetizar las 28 variantes de escalas de carga que se muestran en las Tablas 15-1 y 15-2. Gene Oracle sintetizó y clonó las variantes AmyS en el vector pGov4 y las transformó en *E. coli*. Se proporcionó a cada variante el ADN aislado de minipreps, así como una inserción de agar.

25 [0351] Las variantes eran PCR amplificado y clonado en el vector de expresión pHPLT de *B. subtilis*. Las variantes se amplificaron como un fragmento PstI-HindIII del plásmido pGov4 utilizando cebadores:

Satori F 5'-CTCATCTTCTTGCTGCCTCATTCTGCAGCTTC-3' (SEQ ID Nº 24); y

Satori R 5'-TTATCCTTACCTTGCTCCAAGC-3' (SEQ ID Nº 25).

30 [0352] Los productos de PCR se purificaron utilizando columnas Qiaquick de Quiagen, y se volvieron a suspender en 50 µL de agua milli-Q. Se asimilaron 50 µL del ADN purificado con HindIII (Roche) y PstI (Roche), y el ADN resultante se volvió a suspender en 30 µL de agua desionizada. Se clonaron 10-20 ng/µL del ADN en plásmido pHPLT utilizando los sitios de clonación PstI y HpaI. Las mezclas de ligación se transformaron directamente en células *B. subtilis* competentes (genotipo: amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Estas células de *B. subtilis* tienen un gen de competencia (comK) que se coloca bajo un promotor inducible de xilosa, por lo que se utilizó xilosa para inducir la competencia para la unión y la absorción de ADN.

35

Tabla 15-1. Primera escala de carga de AmyS		
Número	Variante de AmyS	Carga Δ
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	Original	0
2-1	D318N N28R	+2
2-2	D318N D306N N28R N224R	+4
2-3	D318N D306N D19N N28R N224R N271R	+6
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

Tabla 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

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

Genotecas de combinación de carga de enzima (CCL, por sus siglas en inglés): Generación de CCL de AmyS-S242Q de *G. stearothermophilus*

- 5 [0353] El ADN de plásmido de AmyS-S242Q se aisló de una cepa de *B. subtilis* transformada (genotipo: $\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $amyE::xyIRPxyIAcomK-phleo$) y se envió a DNA2.0 Inc. como la plantilla para la construcción de CCL. Se pidió a DNA2.0 Inc. (Mountain View, CA, EE.UU.) la generación de genotecas de posición en cada uno de los cuatro sitios en la amilasa AmyS-S242Q (S242Q) que se muestran en la Tabla 15-4. Las variantes se suministraron como concentrados de glicerol en placas de 96 pocillos.
- 10 [0354] La genoteca de carga de combinación de AmyS-S242Q se designó mediante la identificación de los cuatro residuos siguientes: Gln-97, Gln 319, Gln 358 y Gln 443. Se creó un CCL de cuatro sitios, de 81 miembros realizando todas las combinaciones de tres posibilidades en cada sitio: amilasa natural, arginina o ácido aspártico.

Tabla 15-4. Variantes de CCL de S242Q					
Variante #	Q97	Q319	Q358	Q443	Carga Δ
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 15-4. Variantes de CCL de S242Q					
Variante #	Q97	Q319	Q358	Q443	Carga Δ
6	Q97E	Q319E	Q358R	-	-1
7	Q97E	Q319E	-	Q443E	-3
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
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

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

Ejemplo 16. Rendimiento del lavado de enzima

5 [0355] Este Ejemplo describe el análisis de la variante S242Q en un ensayo de micromuestra de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ en detergente HDL de AATCC o 5 mM de tampón HEPES bajo resistencia iónica variable. Se utilizaron los métodos proporcionados en el Ejemplo 12 (véase, por ejemplo, "Ensayo de micromuestra de almidón de arroz para analizar el rendimiento de la amilasa").

10 [0356] Existe un cambio de carga neta óptima para el rendimiento de limpieza de la enzima en detergente HDL de AATCC. El rendimiento se mide en términos de rendimiento de limpieza relativo observado en un ensayo de la actividad de la micromuestra de almidón de arroz. Un valor de aproximadamente 1,0 indica el rendimiento de limpieza más alto en este ensayo. Esto es un ejemplo de la optimización de una propiedad física de la proteína (por ejemplo, carga neta) para mejorar un resultado o beneficio dado (por ejemplo, el rendimiento de la limpieza en un detergente para ropa líquido). La carga óptima identificada con este grupo de proteínas sonda limitado coincide con la carga óptima observada cuando se mide la genoteca de combinación de carga completa. El uso de proteínas sonda es, por consiguiente, predictivo del comportamiento de toda la genoteca.

15 [0357] De acuerdo con la teoría de Debye-Hückel (Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, segunda edición: With Applications to Colloidal and Biological Systems, Academic Press 2d Ed. [1992]), las interacciones electroestáticas están controladas principalmente por la resistencia de las fuerzas de doble capa entre las especies que interactúan a un potencial constante o carga constante (enzimas, sustratos, tela y detergente), su tamaño y la constante dieléctrica del medio circundante. Con el fin de caracterizar el comportamiento electroestático de las partículas en un medio complejo, tal como una formulación detergente, su interacción en un ambiente reducido que posee la misma longitud de apantallamiento Debye es suficiente. Esto se logró seleccionando un tampón de pH y una conductividad coincidentes con los del detergente bajo condiciones de lavado. Un tampón apropiado para tal análisis es 5 mM de tampón HEPES con pH 8.0 con cantidades variables de electrolito indiferente, tal como NaCl. La adición de 2,5 mM de NaCl a este tampón coincide con el pH y la conductividad de las condiciones de lavado normales de América del Norte. La adición de 100 mM de NaCl es representativo de las condiciones de lavado japonesas y europeas, normalmente más altas en resistencia iónica debido tanto al incremento de la dureza del agua como al de las concentraciones de detergente.

20

25

[0358] La Figura 23 muestra que las variantes S242Q de carga positiva eran mejores para limpiar las micromuestras de almidón de arroz bajo las condiciones de lavado de América del Norte. De forma similar, las

variantes de carga positiva de otra α -amilasa (es decir, TS23t) eran mejores para limpiar micromuestras de almidón de arroz bajo las condiciones de lavado de América del Norte (Figura 24), demostrando que las mutaciones de carga tienen un efecto similar en diferentes α -amilasas. Las variantes S242Q de carga positiva también muestran una actividad específica más alta para la hidrólisis de los sustratos de almidón de maíz granulado (Figura 25).

[0359] La licuefacción del almidón por parte de las variantes de escala de carga de AmyS se determinó monitorizando la viscosidad final tras la licuefacción del almidón de maíz. Un valor de viscosidad bajo es indicativo de descomposición de polisacáridos de almidón. Como se muestra en la Figura 14, se observó una carga óptima (por ejemplo, -4 a -2) en la licuefacción. Las variantes de AmyS que fueron demasiado negativas (por ejemplo, -12 a -10) mostraron viscosidades finales muy elevadas, y las variantes que fueron demasiado positivas (por ejemplo, +6 o mayor) mostraron viscosidades finales aún más elevadas (por ejemplo, fuera de los límites de la instrumentación de laboratorio debido a la sobrecarga de torsión).

Ejemplo 17. Termoestabilidad

[0360] Este Ejemplo describe la determinación de la relación entre la carga de la proteína y la estabilidad térmica. Los ensayos de amilasa se basaron en la hidrólisis del almidón con BODIPY antes y después de calentar el sobrenadante del cultivo. Se utilizaron las mismas soluciones químicas y de reactivos que se describen en el Ejemplo 12.

Ensayo de estabilidad térmica para α -amilasas

[0361] Los sobrenadantes del cultivo filtrado se diluyeron en serie en 50 mM de acetato de sodio + 2 mM de CaCl_2 , pH 5.8, con 0,002 % de Tween. Se ensayaron 10 μl de cada sobrenadante del cultivo diluido para determinar la actividad de amilasa inicial mediante el ensayo de almidón con BODIPY. Se colocaron 50 μl de cada sobrenadante del cultivo diluido en una placa de PCR de bajo perfil de 96 pocillos de VWR. Se agregaron 30 μl de aceite mineral en cada pocillo a modo de sellador. La placa se incubó en un ciclador térmico Peltier DNA engine de BioRad a 95 °C durante 30 o 60 minutos dependiendo de la estabilidad de la enzima original. Después de la incubación, la placa se enfrió a 4 °C durante 5 minutos y después se mantuvo a temperatura ambiente. Se añadieron 10 μl de cada muestra a una placa nueva y se ensayó para determinar la actividad final de amilasa mediante el ensayo de almidón con BODIPY descrito en el Ejemplo 1.

Cálculo de la termoestabilidad

[0362] La actividad residual de una muestra se expresó como la relación de la absorbancia final y la absorbancia inicial, ambas corregidas para blancos. Un índice más alto indica una variante más estable térmicamente. Esto es un ejemplo de la optimización de una propiedad física de una proteína, en este caso la carga neta, para mejorar la estabilidad térmica de la enzima para una aplicación de detergente para ropa líquido.

[0363] La termoestabilidad de las variantes se evaluó como se ha descrito anteriormente. Los ganadores en termoestabilidad de las CCL de S242Q se enumeran en la Tabla 17-1. Los ganadores se definen como los que tienen una relación de actividad residual del mutante con respecto a actividad residual de la enzima original (es decir, S242Q) mayor que 1. La Figura 30 muestra la actividad residual de la primera escala de carga de AmyS como una función de cambio de carga en relación con la enzima natural. La estabilidad termal empleada en este ensayo se describe en el Ejemplo 12. Una vez más, como se muestra en la Figura, la acumulación de cargas negativas extremas (-12) o cargas positivas (+4) en relación con la enzima natural son perjudiciales para la estabilidad térmica. Esto es un ejemplo de la optimización de una propiedad física de una proteína, en este caso la carga neta, para mejorar la estabilidad térmica de la enzima para una aplicación de detergente para ropa líquido.

Tabla 17-1: CCL de S242Q – ganadores en estabilidad térmica

Variante #	97	319	358	443	act. residual del mutante/act. residual de la enzima orig.
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

ES 2 527 645 T3

Variante #	97	319	358	443	act. residual del mutante/act. residual de la enzima orig.
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

Ejemplo 18. Rendimiento de la enzima

5 [0364] Este Ejemplo muestra que el rendimiento de la enzima puede verse afectado por la carga. El rendimiento de la enzima se evaluó utilizando detergentes inactivados por calor como se describe anteriormente en el Ejemplo 12. Los ganadores se definieron como los que tenían un Índice de Rendimiento (PI, por sus siglas en inglés) mayor que 1. El PI es la relación de la actividad residual del mutante con respecto a la actividad residual de la enzima original (es decir, S242Q). Los resultados se muestran en las Tablas 18-1 y 18-2.

Tabla 18-1: CCL de S242Q – ganadores de micromuestra de almidón de arroz CS-28, Tide 2x (Condiciones de América del Norte como se describen en el Ejemplo 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
39	Q97R	Q319R	Q358E		1	2,14
40	Q97R	Q319R	Q358R	Q443E	2	1,92
41	Q97R	Q319R	Q358R	Q443R	4	1,37

ES 2 527 645 T3

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

Tabla 18-2: CCL de S242Q – ganadores de micromuestra de almidón de arroz CS-28, Persil (condiciones de Europa Occidental)

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

ES 2 527 645 T3

Variante #	97	319	358	443	carga rel	PI
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	G1358R	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
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		G1358R	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		Q319 R	Q358R	Q443E	1	1,29
70		Q319R		Q443E	0	1,15

[0365] La actividad también se midió utilizando el ensayo de hidrólisis de almidón con BODIPY como se proporciona en el presente documento. Los resultados se muestran en la Tabla 18-3. Una actividad específica relativa en este sustrato de almidón (un almidón de maíz) mayor que 1 indica que la variante tiene actividad específica mayor que la enzima S242Q original. El ppm relativo es el título de expresión de la variante en relación con la enzima original, mayor que 1 indica títulos superiores (en tubos de agitación), que los de la enzima S242Q original.

5

Tabla 18-3: CCL de S242Q – ganadores de título y/o almidón con BODIPY

Variante #	97	319	358	443	Carga	ppm rel	act. especif. 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

ES 2 527 645 T3

Variante #	97	319	358	443	Carga	ppm rel	act. especif. rel.
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	G1443E	-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	G97E	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	G97E		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	Q443 R	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
42	Q97R	G319R	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	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

Variante #	97	319	358	443	Carga	ppm rel	act. específ. rel.
63		Q319E			-1	0,75	1,41
64		Q319R	G358E	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

Ejemplo 19. Equilibrio de los efectos de la mutación en la actividad y la expresión de la amilasa

[0366] Este Ejemplo muestra que dos propiedades enzimáticas en conflicto se pueden optimizar simultáneamente mediante la introducción de múltiples sustituciones de aminoácidos.

5 **[0367]** Como se determinó durante la experimentación, la expresión media de AmyS-242Q disminuyó con un aumento de la carga positiva. No obstante, la hidrólisis del almidón con BODIPY específica aumentó con el aumento de la carga positiva. La expresión de la amilasa recombinante mejorada y la hidrólisis del almidón son deseables en una variante modificada de AmyS-242Q adecuada para la licuefacción del almidón en la industria del etanol como combustible o en la limpieza en aplicaciones detergentes, por ejemplo. Sin embargo, estas propiedades son aparentemente propiedades en conflicto. Como se determinó durante la experimentación, es posible producir una variante de amilasa más altamente expresada sin comprometer gravemente la hidrólisis del almidón mediante la combinación selectiva de mutaciones individuales. La estrategia descrita en el presente documento se utilizó satisfactoriamente para producir y seleccionar variantes de AmyS-242Q con muchas sustituciones que presentan mejoras en una primera propiedad (por ejemplo, la expresión como la propiedad principal), mientras se mejora o no se sacrifica una segunda propiedad (por ejemplo, la hidrólisis del almidón como la propiedad secundaria).

20 **[0368]** Además, opuesta a la expresión media de las variantes AmyS-242Q, la limpieza de micromuestras de almidón de maíz aumentó con el aumento de la carga positiva. La expresión de la amilasa recombinante mejorada y el rendimiento de la limpieza son deseables en una variante modificada de AmyS-242Q adecuada para la licuefacción del almidón en la industria del etanol como combustible o en la limpieza en aplicaciones detergentes, por ejemplo. Sin embargo, estas propiedades también son aparentemente propiedades en conflicto. Como se determinó durante la experimentación, es posible producir una variante de amilasa más altamente expresada sin comprometer gravemente el rendimiento de la limpieza mediante la combinación selectiva de mutaciones individuales. La estrategia descrita en el presente documento se utilizó satisfactoriamente para producir y seleccionar variantes de AmyS-242Q con muchas sustituciones que presentan mejoras en una primera propiedad (por ejemplo, la expresión como la propiedad principal), mientras se mejora o no se sacrifica una segunda propiedad (por ejemplo, la limpieza de micromuestras de almidón de arroz como la propiedad secundaria).

30 **[0369]** En concreto, una genoteca de combinación de carga de AmyS-S242Q de 80 miembros que comprendía variantes que tenían combinaciones de desde una a cuatro sustituciones de residuos cargados se analizó para determinar la expresión en tubo de agitación, la hidrólisis del almidón con BODIPY y la actividad de limpieza del almidón de arroz. Los ganadores AmyS-S242Q se muestran en las Tablas 19-1 y 19-2. Es importante destacar que las variantes con muchas sustituciones de la Tabla 19-1 tienen una expresión igual o mejorada y una hidrólisis de almidón con BODIPY igual o mejorada en comparación con la enzima original. De manera similar, las variantes con muchas sustituciones de la Tabla 19-2 tienen una expresión igual o mejorada y una actividad de limpieza del almidón de arroz igual o mejorada en comparación con la enzima original.

Tabla 19-1. Ganadores de expresión y de hidrólisis de almidón con BODIPY de AmyS-S242Q							
Variante	97	319	358	443	Carga	Expresión (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

Variante	97	319	358	443	Carga	Expresión (PI)	BODIPY (PI)
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

Variante	97	319	358	443	Carga	Expresión	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
24	Q97E		Q358R	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

5 **[0370]** En resumen, debido a que la actividad enzimática y la producción enzimática tienen dependencias de carga diferentes (véanse las Figuras, 27A, 27B, 28A y 28B) están negativamente correlacionadas (véanse las Figuras 26A y 26B). No obstante, existen un número de variantes que se mejoran en ambas, expresión y actividad, y analizar la genoteca de esta manera permite identificarlas.

10 **[0371]** Aunque se muestra con amilasas, este método es aplicable a otras clases de enzimas tales como proteasas, lipasas, celulasas, transferasas y pectinasas. Además, cualquier combinación de dos o más propiedades se puede analizar simultáneamente tales como expresión, actividad, unión, estabilidad térmica y estabilidad quelante y detergente.

Ejemplo 20 – Limpieza de micromuestra e hidrólisis de almidón

15 **[0372]** El rendimiento de la enzima se evaluó utilizando detergentes inactivados por calor como se describe anteriormente. Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 12 (véase “Ensayo de micromuestra de almidón de arroz para analizar el rendimiento de la amilasa” y “Ensayo de almidón con BODIPY para la determinación de la actividad de la amilasa”). Los ganadores se definen como los que tienen un Índice de Rendimiento (PI, por sus siglas en inglés) mayor que 1. El PI es la relación de la actividad residual del mutante con respecto a la actividad residual de la enzima natural. La Tabla 20-1 muestra los cálculos de las variantes AmyS que son mejores que la enzima natural ($\Delta\Delta G < 0$) en comparación con los resultados de cambio de carga (Δ CHR). El cambio de carga, Kyte-Doolittle, Eisenberg y la unión de hidrógeno se definen en WO 2008/153925, presentada el 6 de junio de 2008. Además, la Tabla 20-1 muestra los resultados de hidropaticidad de Kyte-Doolittle (Δ K-D) y de las escalas de hidrofobicidad de Eisenberg (Δ E). La Tabla 20-1 también muestra los valores de la unión de hidrógeno (Δ HB), con un resultado de -2 significando la pérdida de capacidad de unión de hidrógeno. La Tabla 20-1 muestra los cálculos de las variantes AmyS que son mejores que la enzima natural con respecto a la hidrólisis de harina de maíz a 5, 10 y 60 minutos (CF5, CF10, CF60), actividad sobre sustratos DP7 con pH 4.0 y 5.8 (pH 4, pH 5.8), limpieza del almidón de arroz con pH 8.6 y 10 (Limpieza 8 y Limpieza 10) y expresión de proteína en *B. subtilis* (EXP). El efecto de la carga en la actividad tiene el sentido opuesto al efecto de la carga en la expresión. La unión de hidrógeno y la hidrofobicidad también muestran efectos estadísticamente relevantes en estas propiedades. Evidentemente, las propiedades de las sustituciones de aminoácidos tales como carga e hidrofobicidad pueden afectar a los niveles de expresión en *B. subtilis* y *E. coli*, así como a la actividad básica y a la estabilidad de las proteínas.

20

25

30

Tabla 20-1. Quintiles de AmyS para múltiples propiedades							
AmyS	o/e	AmyS	o/e	AmyS	o/e	AmyS	o/e
CF5 ΔΔG Δ CHRG -2	1,60	CF5 ΔΔG Δ HB -2	0,84	CF5 ΔΔG Δ K-D -2	1,12	CF5 ΔΔG Δ E -2	1,13
Δ CHRG -1	1,29	Δ HB -1	0,98	Δ K-D -1	1,19	Δ E -1	1,09
Δ CHRG 0	0,97	Δ HB 0	1,02	Δ K-D 0	0,83	Δ E 0	1,05
Δ CHRG +1	0,84	Δ HB +1	0,92	Δ K-D +1	1,15	ΔE+1	0,89
Δ CHRG +2	0,56	Δ HB +2	1,19	Δ K-D +2	0,77	ΔE +2	1,12
CF10 ΔΔG Δ CHRG -2	1,66	CF10 ΔΔG Δ HB -2	0,86	CF10 ΔΔG Δ K-D-2	1,10	CF10 ΔΔG Δ E -2	1,26
Δ CHRG -1	1,18	Δ HB -1	1,00	Δ K-D -1	1,15	Δ E -1	1,04
Δ HRG 0	0,97	Δ HB 0	1,02	Δ K-D 0	0,86	ΔE 0	1,08
Δ CHRG +1	0,91	Δ HB +1	0,97	Δ K-D +1	1,12	Δ E +1	0,90
Δ CHRG +2	0,77	Δ HB +2	1,12	Δ K-D +2	0,82	Δ E +2	1,16
CF60 ΔΔG Δ CHRG -2	1,46	CF60 ΔΔG Δ HB -2	1,00	CF60 ΔΔG A K-D -2	0,94	CF60 ΔΔG Δ E -2	0,98
Δ CHRG -1	1,33	Δ HB -1	0,96	Δ K-D -1	1,15	Δ E -1	1,01
Δ CHRG 0	0,96	Δ HB 0	1,01	Δ K-D 0	0,79	Δ E 0	1,05
Δ CHRG +1	0,84	Δ HB +1	0,95	Δ K-D+1	1,16	Δ E+1	0,94
Δ CHRG +2	0,82	Δ HB +2	1,05	Δ K-D +2	0,89	Δ E +2	1,54
pH4 ΔΔG Δ CHRG -2	1,63	pH4 ΔΔG Δ HB -2	0,91	pH4 ΔΔG Δ K-D -2	1,29	pH4 ΔΔG Δ E -2	1,07
Δ CHRG -1	1,28	Δ HB -1	0,89	Δ K-D -1	1,19	Δ E -1	1,13
Δ CHRG 0	0,96	Δ HB 0	0,97	Δ K-D 0	0,72	Δ E 0	1,01
Δ CHRG +1	0,88	Δ HB +1	0,93	Δ K-D +1	1,12	Δ E +1	0,89
Δ CHRG +2	0,19	Δ HB +2	1,26	Δ K-D +2	0,86	Δ E +2	0,95
pH5.8 ΔΔG Δ CHRG -2	1,66	pH5.8 ΔΔG A HB -2	0,99	pH5.8 ΔΔG Δ K-D -2	1,00	pH5.8 ΔΔG Δ E -2	1,23
Δ CHRG -1	1,26	Δ HB -1	0,99	Δ K-D -1	1,17	Δ E -1	1,06
Δ CHRG 0	0,95	Δ HB 0	0,95	Δ K-D 0	0,80	Δ E 0	0,99
Δ CHRG +1	0,94	Δ HB +1	0,90	Δ K-D +1	1,08	ΔE+1	0,94
Δ CHRG +2	0,83	Δ HB +2	1,15	Δ K-D +2	0,92	Δ E +2	1,16
Limpieza 8 ΔΔG Δ CHRG -2	1,34	Limpieza 8 ΔΔG Δ HB -2	1,07	Limpieza 8 ΔΔG Δ K-D -2	0,89	Limpieza 8 ΔΔG Δ E -2	0,88
Δ CHRG -1	1,22	Δ HB -1	1,02	Δ K-D -1	1,10	Δ E -1	0,98
Δ CHRG 0	0,96	Δ HB 0	0,96	Δ K-D 0	0,83	ΔE 0	1,00
Δ CHRG +1	0,94	Δ HB +1	0,90	Δ K-D +1	1,07	Δ E +1	1,01
Δ CHRG +2	0,62	Δ HB +2	1,05	Δ K-D +2	1,02	Δ E +2	1,32
Limpieza 10 ΔΔG Δ CHRG -2	1,32	Limpieza 10 ΔΔG Δ HB -2	0,86	Limpieza 10 ΔΔG Δ K-D -2	1,03	Limpieza 10 ΔΔG Δ E -2	0,81
Δ CHRG -1	1,43	Δ HB -1	1,36	Δ K-D-1	1,11	ΔE -1	1,03

Tabla 20-1. Quintiles de AmyS para múltiples propiedades							
AmyS	o/e	AmyS	o/e	AmyS	o/e	AmyS	o/e
Δ CHRG 0	0,92	Δ HB 0	0,72	Δ K-D 0	0,80	Δ E 0	1,00
Δ CHRG +1	0,88	Δ HB +1	1,07	Δ K-D +1	1,16	Δ E +1	0,97
Δ CHRG +2	0,74	Δ HB +2	1,11	Δ K-D +2	0,91	Δ E +2	1,48
EXP $\Delta\Delta$ G Δ CHRG -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 E -2	0,71
Δ CHRG -1	0,35	Δ HB -1	0,91	Δ K-D -1	1,11	Δ E -1	1,29
Δ CHRG 0	1,08	Δ HB 0	0,95	Δ K-D 0	1,49	Δ E 0	1,06
Δ CHRG +1	1,35	Δ HB +1	1,39	Δ K-D +1	0,77	Δ E +1	0,79
Δ CHRG +2	1,64	Δ HB +2	1,16	Δ K-D +2	0,72	Δ E +2	0,20

Ejemplo 21. Modulación de un perfil pH-actividad de una enzima

[0373] Este Ejemplo describe la utilización de mutaciones de carga de superficie para optimizar un perfil pH-actividad de una enzima para una reacción dada. La Figura 31A muestra la actividad de limpieza de micromuestra de almidón de arroz como una función del pH para la primera escala de carga de AmyS del Ejemplo 15. El intervalo de pH desde 3.0 hasta 4.25 estuvo en 200 mM de formiato de Na que contenía Tween-80 al 0,01 %, mientras que el intervalo de pH desde 4.25 hasta 5.5 estuvo 200 mM de en acetato de Na que contenía Tween-80 al 0,01 %. Los datos se ajustan a las curvas de titulación, cada una con un valor pKa individual. La Figura 31B muestra un pKa aparente para catálisis de AmyS como una función del cambio de carga para la primera escala de carga de AmyS del Ejemplo 15. Estos datos muestran que los perfiles pH-actividad de una α -amilasa pueden cambiarse significativamente mediante mutaciones de carga de superficie, incluso en tampón de 200 mM. Aunque esto se ha reportado a una resistencia iónica muy baja para subtilisina (Russell *et al.* (1987) *J Mol Biol.* 193: 803-13) y para D-xilosa isomerasa (Cha *et al.* (1998) *Mol Cell.* 8:374-82), se cree que es la primera vez que esto se ha realizado con α -amilasa, y sorprendentemente, incluso a una resistencia iónica alta.

Ejemplo 22. Supercibado de AmyS

[0374] Los siguientes ensayos se utilizaron en los ejemplos que se describen a continuación. Cualquier desviación de los protocolos proporcionados a continuación se indica en los ejemplos. En estos experimentos, se utilizó un espectrofotómetro de 96 pocillos para medir la absorbancia de los productos formados después de la finalización de las reacciones.

Ensayo de hidrólisis de almidón para la determinación de la actividad específica y estabilidad térmica

[0375] Se llevó a cabo un ensayo de la actividad de la α -amilasa en harina de maíz para medir la actividad específica y la estabilidad de AmyS de *B. subtilis* y variantes de AmyS. Se utilizaron las condiciones que más se asemejaban a las aplicaciones del mundo real en la limpieza y el procesamiento del grano. La actividad se define como extremos reductores generados debido a la descomposición enzimática de la harina de maíz, determinada por el método PAHBAH (hidrazida de ácido p-hidroxibenzoico). La estabilidad se define como actividad sostenida a 85 °C.

[0376] *Hardware*: Variomag Teleshake 95 de Inheco con adaptador de placa de PCR, Multidrop de Thermo Electron, placa de PCR PCR-96-FS-C con faldilla amplia de Axygen, Termocicladores - con un mínimo de 4 bloques de 96 pocillos (un MJ Research Tetrad), manipuladores de líquidos Biomek FX.

[0377] *Hidrólisis del almidón*: Se utilizó harina de maíz orgánico de Azure Farms, tamizada para fines de manejo de líquidos, para obtener la fracción < 600 micras, se horneó 4 horas a 80 °C, después se dejó equilibrar durante la noche a temperatura ambiente. Se preparó una suspensión al 2 % en peso/peso en lotes de 500 g y 1000 g. La suspensión se agitó vigorosa y continuamente durante el ajuste de pH, el equilibrado de pH y el traslado del vaso de precipitados a la placa de PCR. Para 1000 g, se agitaron durante 15 minutos 23 g de harina de maíz prehorneada y 977 g de agua desionizada casera, se ajustaron con H₂SO₄ a pH 5.8 y se dejó equilibrar durante 30 minutos, punto en el cual se realizó un ajuste final de pH si fue necesario. Se utilizaron pipetas de 8 canales con las puntas recortadas para un tamaño de apertura de aproximadamente 1,5 mm para distribuir la suspensión en los pocillos de las placas de PRC de Axygen.

[0378] Los sobrenadantes del cultivo de AmyS y de las variantes de AmyS se diluyeron a aproximadamente 1 μ g/mL en un tampón de dilución (agua + 0,005 % de Tween-80) y 10 μ L de sobrenadante diluido se transfirieron a las placas de reacción de 5 minutos, 10 minutos y 60 minutos y se mezcló una vez pipeteando la muestra arriba y abajo. Se transfirió una alícuota de 50 μ L de aceite mineral ligero a cada pocillo. Las placas se transfirieron a las unidades de Inheco precalentadas a 85 °C. En los puntos de tiempo indicados tras la

incubación (5, 10 y 60 minutos), se detuvo la reacción de hidrólisis de almidón por adición de 10 µL de 4 N de NaOH en cada pocillo. Los productos de la reacción de la hidrólisis de almidón se analizaron mediante el ensayo PAHBAH.

5 **[0379]** *Ensayo PAHBAH:* Se añadieron alícuotas de 80 µL de 0,5 N de NaOH a todos los pocillos de una placa de PCR vacía seguido de 20 µL del reactivo PAHBAH (5 % en peso/volumen de hidrazida de ácido p-hidroxibenzoico (PAHBAH, Sigma # H9882, disuelto en 0,5 N de HCl) y se mezclaron pipeteando arriba y abajo (placa de reacción PAHBAH). Se añadieron 10 µL de los sobrenadantes de la reacción hidrolítica del almidón a la placa de reacción PAHBAH. Todas las placas se sellaron y se colocaron en el termociclador, programado durante 2 minutos a 95 °C, y después se enfriaron a 20 °C. Las muestras de 80 µL de las mezclas de reacción
10 PAHABH desarrolladas se transfirieron a una placa (de lectura) nueva y se midió la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro.

Ensayo de limpieza de muestras para determinar el rendimiento de eliminación de manchas

15 **[0380]** En este ensayo, el rendimiento de eliminación de manchas de las AmyS de *B. subtilis* y de las variantes de AmyS se determinó en una escala de placa de microtitulación utilizando micromuestras manchadas de almidón de arroz CS-28. Se obtuvieron micromuestras de diámetro circular de ¼" de CFT Vlaardingen (Países Bajos). Se colocaron dos micromuestras en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos.

[0381] Se analizaron las muestras del caldo de cultivo filtrado a una concentración adecuada mediante dilución con una mezcla de 10 mM de NaCl, 0,1 mM de CaCl₂, 0,005 % de Tween-80 a 20x la concentración final deseada en el análisis de rendimiento (conc. final en el análisis 0,025 - 0,10 ppm).

20 **[0382]** Se midió el rendimiento de la amilasa tanto con pH 8 como con pH 10.

[0383] A cada pocillo de las placas que contenían micromuestras se añadieron o 190 µl de solución tampón que contenía 25 mM de HEPES (Sigma, H7523), 2 mM de CaCl₂, 0,005 % de Tween-80, pH 8.0, o 190 µl de solución tampón que contenía 25 mM de CAPS (Sigma, C2632), 2 mM de CaCl₂, 0,005 % de Tween-80, pH 10.0. Se añadieron 10 µL de muestras de amilasas diluidas a cada pocillo que contenía micromuestras (para proporcionar un volumen total de 200 µL/pocillo). La placa se cubrió con un sello de placa y se colocó en una incubadora durante 60 minutos a 40 °C, con agitación a 1150 rpm (incubadora iEMS). Tras la incubación bajo las condiciones apropiadas, se extrajeron 100 µL de solución de cada pocillo, se colocaron en una placa de microtitulación nueva y se midió la absorbancia a 488 nm en un espectrofotómetro. "Los controles de blanco", que contenían 2 micromuestras por pocillo y detergente pero ninguna muestra de amilasa se incluyeron también
25 en el análisis.
30

[0384] Cálculo del rendimiento de la hidrólisis del almidón de arroz CS-28: El valor de absorbancia obtenido se corrigió para el valor de blanco (micromuestras incubadas en ausencia de enzima). La absorbancia resultante - ΔOD488 - fue una medida de la actividad amilolítica. Para cada muestra (de AmyS o de variante de AmyS) se calculó el índice de rendimiento dividiendo la actividad de la variante por la actividad de la enzima natural. El índice de rendimiento comparó el rendimiento de la variante (valor real) y de la enzima de referencia de AmyS estándar (valor teórico) a la misma concentración de proteína.
35

[0385] Un índice de rendimiento (PI) que es mayor que 1 (PI > 1) identificó una variante mejor (en comparación con la estándar, por ejemplo, la natural), mientras que un PI de 1 (PI = 1) identificó una variante que presentaba el mismo rendimiento que la estándar, y un PI menor que 1 (PI < 1) identificó una variante con un rendimiento peor que la estándar. Por lo tanto, el PI identificó variantes con diferencias de rendimiento con respecto a la enzima natural.
40

[0386] Se evaluaron las siguientes variantes de sitio utilizando los ensayos descritos en este Ejemplo:

P17A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y

D19A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y

45 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

V74A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y

50 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
 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
 5 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
 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
- 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
- 5 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
- 10 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
- 15 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
- 20 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

Ejemplo 23. Rendimiento de las variantes de AmyS

25 **[0387]** El rendimiento de las variantes de AmyS (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 22) se analizó para determinar la expresión de la proteína (expresión), la hidrólisis de harina de maíz durante 10 minutos (Harina de maíz 10) o la hidrólisis de harina de maíz durante 60 minutos (Harina de maíz 60), la actividad en sustrato DP7 con pH 4 (DP7 pH 4) o la actividad en sustrato DP7 con pH 5.8 (DP7 pH 5.8), y la limpieza de micromuestra manchada con almidón de arroz CS 28 con pH 8 (limpieza pH 8) o la limpieza de micromuestra manchada con almidón de arroz CS 28 con pH 10 (limpieza pH 10). Los resultados se muestran en la Tabla 23-1.

30 La expresión de la proteína se midió mediante el ensayo Bradford descrito en el Ejemplo 12. Los ensayos de hidrólisis de la harina de maíz y de limpieza de muestras se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 22. La funcionalidad de las variantes de AmyS se cuantificó como un índice de rendimiento (*PI*) (es decir, la relación de rendimiento de una variante en relación con la AmyS natural). Un $PI > 1$ de cualquier propiedad indica que la variante se ha mejorado (en comparación con el control) para esa propiedad. ND indica que el valor obtenido

35 estaba fuera de los límites del ensayo.

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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	i.is	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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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	W156L	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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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	z0,26
358	Q358D	1,35	1,37	1,21	1,29	1,55	1,10	0,79
358	Q358E	130	1,35	1,22	1,27	1,57	1,02	0,74

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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	0,8]
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	1,15	0,64
383	K383P	1,89	2,46	1,17	1,37	1,82	2,31	0,22

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 23-1: Rendimiento de las variantes de AmyS								
Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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	4,98	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

Posición	variante	Harina de maíz 10	Harina de maíz 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	Limpieza pH 8	Limpieza pH 10	Expresión
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

[0388] Resultará evidente que un gran número de sustituciones produjeron variantes de α -amilasas que tenían una o varias propiedades mejoradas en comparación con la α -amilasa natural. Estas sustituciones se incluyen en las presentes composiciones y métodos.

5 Ejemplo 24. Propiedad alterada de variantes de AmyS

[0389] Este ejemplo muestra que algunas variantes de α -amilasa de *G. stearothermophilus* (AmyS) (descritas en el Ejemplo 22) tienen una propiedad alterada en relación con la α -amilasa original. Se llevó a cabo un cribado de estabilidad térmica de alto rendimiento de variantes AmyS como se describe en el Ejemplo 3. Los índices de rendimiento de la actividad (medidos como ensayo con BODIPY) y de la actividad residual (después de la tensión térmica) se muestran en las Tablas 24-1, 24-2, 24-3.

Tabla 24-1: Posiciones en proteínas AmyS con mutaciones (se muestran en la columna llamada "variante") que tienen índices de rendimiento tanto de la actividad como de la actividad residual después de tensión por calor mejores que la AmyS natural.

Variante	Actividad	Actividad 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

ES 2 527 645 T3

Variante	Actividad	Actividad residual
146 D	1,0111003	1,0989512
146 E	1,0209598	1,076157
146 T	1,0557131	1,0905141
146 W	1,0503671	1,0446909
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
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

ES 2 527 645 T3

Variante	Actividad	Actividad residual
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
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
398 A	1,0127464	1,2067063
418 A	1,070915	1,3701437
418 M	1,101424	1,3091549
418 N	1,1440828	1,4650527

ES 2 527 645 T3

Variante	Actividad	Actividad residual
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	1,0884338	1,0761389
437 G	1,1270339	1,2057266
437 H	1,0624587	1,2128077
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	1,0937657
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

ES 2 527 645 T3

Variante	Actividad	Actividad residual
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
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

Tabla 24-2: Posiciones en proteínas AmyS con mutaciones (se muestran en la columna llamada “variante”) que tienen índices de rendimiento de la actividad residual después de tensión por calor al menos 20 % mejores que la AmyS natural e índices de rendimiento de expresión o actividad de partida de al menos la mitad que la AmyS natural.

5

Variante	Actividad	Actividad 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
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

ES 2 527 645 T3

Variante	Actividad	Actividad Residual
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
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

ES 2 527 645 T3

Variante	Actividad	Actividad Residual
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
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
4640	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

Tabla 24-3: Posiciones en proteínas AmyS con mutaciones (se muestran en la columna llamada “variante”) que tienen índices de rendimiento de la actividad o la expresión al menos 20 % mayores que la AmyS natural

Variante	Actividad	Actividad 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
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

ES 2 527 645 T3

Variante	Actividad	Actividad Residual
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
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

[0390] Basándose en los datos de rendimiento relativo y en los datos de estabilidad de las posiciones AmyS descritas en las Tablas 23-1, 24-1, 24-2, y en la Tabla 24-3, las posiciones de AmyS se clasificaron como restrictivas frente a no restrictivas como sigue: Las posiciones no restrictivas tienen $\geq 20\%$ de mutaciones neutras para al menos una propiedad. Estas posiciones son buenas candidatas para la mutación cuando se preparan α -amilasas modificadas ya que las mutaciones en estas posiciones tienen una alta probabilidad de mejorar el rendimiento. Las posiciones restrictivas tienen $< 20\%$ de mutaciones neutras para actividad y estabilidad. Estas posiciones generalmente se dejan solas (es decir, no se mutan) cuando se modifican variantes de α -amilasas, puesto que la mutación en estas posiciones tiende a reducir el rendimiento, en vez de incrementarlo. Todas las posiciones/sitios descritos en la Tabla 23-1 son no restrictivos.

5

10 Ejemplo 25. Genotecas de posición adicionales en la proteína AmyS

[0391] Además de las variantes de AmyS descritas en el Ejemplo 22, se generaron genotecas de posición en sitios adicionales en α -amilasa de *G. stearothermophilus* con un truncamiento (SEQ ID N° 2). Las genotecas las produjo Genearth (Genearth GmbH, Josef-Engert-strasse 11, D-93053 Regensburg, Alemania). La Tabla 25-1 muestra las variantes de sitio que se generaron.

Tabla 25-1: Variantes de sitio generadas en 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,M,N,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,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
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

Tabla 25-1: Variantes de sitio generadas en AmyS
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
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 25-1: Variantes de sitio generadas en AmyS
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
T312: A,C,D,E,F,G,H,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W,Y
N313: A,C,D,B,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,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,FG,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
I427: 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

Tabla 25-1: Variantes de sitio generadas en AmyS
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,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

Ejemplo 26. Propiedades alteradas de las variantes descritas en el Ejemplo 25

[0392] Este ejemplo muestra que las variantes de alfa-amilasa de *G. stearothermophilus* (AmyS) (descritas en el Ejemplo 25) pueden tener una propiedad alterada en relación con la α -amilasa original. Se llevó a cabo un cribado de estabilidad térmica de alto rendimiento de variantes AmyS como se describe en el Ejemplo 3. Los índices de rendimiento de la actividad (medidos como ensayo con BODIPY) y de la actividad residual (después de la tensión térmica) se muestran en las Tablas 26-1, 26-2, 26-3.

Tabla 26-1: Posiciones en proteínas AmyS con mutaciones (se muestran en la columna llamada "variante") que tienen índices de rendimiento tanto de la actividad como de la actividad residual después de tensión por calor mejores que la AmyS natural.

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

ES 2 527 645 T3

Variante	Actividad	Actividad residual
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
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
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

ES 2 527 645 T3

Variante	Actividad	Actividad residual
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
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

ES 2 527 645 T3

Variante	Actividad	Actividad residual
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
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
340N	1,75	1,10
340Q	1,76	1,21
340T	1,14	1,21
343E	1,07	1,00

ES 2 527 645 T3

Variante	Actividad	Actividad residual
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
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

ES 2 527 645 T3

Variante	Actividad	Actividad residual
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
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	Actividad	Actividad 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

Tabla 26-2: Posiciones en proteínas AmyS con mutaciones (se muestran en la columna llamada "variante") que tienen índices de rendimiento de la actividad residual después de tensión por calor al menos 20 % mejores que la AmyS natural e índices de rendimiento de expresión o actividad de partida de al menos la mitad que la AmyS natural.

5

5

10

15

20

25

30

35

Variante	Actividad	Actividad 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
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
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
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

5

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
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

10

15

20

25

30

35

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
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

5

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
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

10

15

20

25

30

35

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
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

Tabla 26-3: Posiciones en proteínas AmyS con mutaciones (se muestran en la columna llamada "variante") que tienen índices de rendimiento de la actividad o la expresión al menos 20 % mayores que la AmyS natural

5

10

15

20

25

30

35

5

10

15

20

25

30

35

Variante	Actividad
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
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
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
221A	1,54
221D	1,31
221F	1,28
221I	1,23

5

10

15

20

25

30

35

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
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
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

5

10

15

20

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

La Tabla 26-4 muestra los valores de índice de rendimiento (Pi) para 2666 variantes de AmyS en 152 posiciones.

Los índices de rendimiento menores o iguales que 0,05 en el ensayo de la actividad se fijaron a 0,05 y se indicaron en negrita y en cursiva en la Tabla 26-4. Además, para la medición de la estabilidad, si el índice de rendimiento de la actividad en los ensayos de estabilidad fue menor o igual que 0,05, el índice de rendimiento de estabilidad asociada se fijó a 0,05.

25

Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	LA03N	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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	LA27H	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

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS			
Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

Tabla 26-4: Índices de rendimiento de las mediciones de la estabilidad y la actividad de las variantes AmyS

Posición	Variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

[0393] La Tabla 26-5 enumera las variantes de AmyS que son mutaciones combinables (2250) para las 152 posiciones. Estas variantes tienen valores de índice de rendimiento $\geq 0,5$ para al menos una propiedad (actividad o estabilidad) y $> 0,05$ para ambas propiedades.

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	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	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

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	G020M	0,69	0,10
20	G020N	0,78	0,09
20	G020Q	0,61	0,07
20	G020T	0,82	0,09
20	G020V	0,77	0,19
20	G020W	0,80	0,69
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	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	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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	D054G	0,11	0,97
54	D054H	0,11	1,04
54	D054I	0,30	0,83
54	D054M	0,11	0,88
54	D054N	0,94	1,05
54	D054R	0,06	0,89
54	D054S	0,38	0,96
54	D054T	0,17	0,95
54	D054V	0,17	0,77
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	E067Q	0,93	0,95
67	E067R	1,01	0,90
67	E067S	1,23	1,00
67	E067T	0,99	0,98
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	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	K077Q	0,07	0,86
77	K077R	0,77	1,07
77	K077S	0,11	0,89

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
77	K077V	0,05	0,83
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	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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	H092N	0,85	0,78
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
92	H092W	0,83	0,44
92	H092Y	0,71	0,63
106	H106D	0,58	0,07
106	H106P	0,59	0,06
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	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	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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	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	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	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	V121C	0,92	0,55
121	V121T	0,07	0,92
128	Q128C	0,42	0,95
128	Q128D	0,15	1,05
128	Q128E	0,90	1,00
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	Q128R	0,31	1,14
128	Q128S	0,28	1,02
128	Q128V	0,86	0,97
128	Q128W	0,07	0,76
128	Q128Y	0,13	0,86
131	S131D	0,26	1,08
131	S131G	0,24	0,86

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
131	S131N	0,76	1,02
131	S131T	0,49	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	A138G	0,90	1,02
138	A138I	0,23	0,90
138	A138N	0,50	0,94
138	A138P	1,07	1,15
138	A138Q	0,13	0,69
138	A138S	1,12	1,02
138	A138T	1,16	1,05
138	A138V	1,17	0,87
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

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	D143M	0,86	1,05
143	D143N	1,10	0,99
143	D143P	0,98	0,84
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	R147D	0,66	0,07
147	R147G	0,74	0,11
147	R147H	0,81	0,21
147	R147K	1,05	0,48
147	R147M	0,65	0,07

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
147	R147N	0,91	0,30
147	R147Q	0,88	0,30
147	R147S	0,90	0,39
147	R147T	0,90	0,10
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	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	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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
152	S152A	0,95	0,88
152	S152C	0,83	0,75
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	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	H160Q	0,98	0,47
160	H160R	0,54	0,62
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
165	D165G	0,63	0,20
165	D165M	0,58	0,10
165	D165N	1,16	1,10
165	D165Q	0,53	0,11
165	D165S	0,83	0,43
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	E168L	0,80	0,92
168	E168M	1,12	0,80
168	E168N	0,97	0,83
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	K177L	0,89	0,91
177	K177M	0,10	0,90
177	K177Q	0,08	1,07
177	K177R	0,47	1,09
188	E188P	140	1,16
191	T191A	0,49	1,11
191	T191C	0,13	1,07
191	T191D	0,91	1,03
191	T191G	0,19	1,09
191	T191I	0,18	1,06
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	T191S	0,72	1,05
191	T191V	0,16	1,02
192	E192C	0,55	1,12
192	E192D	0,42	1,50
192	E192Q	0,22	1,55
192	E192T	0,10	1,35
193	N193C	0,73	0,62
193	N193F	1,71	0,98
193	N193H	1,10	0,92
193	N193K	1,28	1,17
193	N193L	1,22	0,78
193	N193M	0,81	0,96
193	N193R	0,87	0,97
193	N193W	1,09	0,73
193	N193Y	1,89	1,10
196	Y196A	0,74	1,57
196	Y196D	0,29	1,29
196	Y196F	0,74	1,38
196	Y196N	0,54	0,94
196	Y196S	0,36	1,59
199	L199V	0,61	0,13
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	M200I	1,14	0,57
200	M200L	0,68	1,11
200	M200N	0,46	0,72
200	M200Q	0,78	0,77
200	M200S	0,61	1,11

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
200	M200T	0,80	0,61
200	M200V	0,97	0,56
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	Y201Q	1,11	0,79
201	Y201R	0,87	0,06
201	Y201S	0,74	1,11
201	Y201T	0,65	0,39
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	A202G	0,45	0,83
202	A202I	0,50	1,02
202	A202L	0,46	0,95
202	A202M	0,32	0,84
202	A202N	0,53	1,08
202	A202Q	0,47	1,01
202	A202S	0,69	0,79
202	A202T	0,63	1,07
202	A202V	0,82	1,02
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	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	K216E	1,03	1,30
216	K216G	0,83	1,20

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
216	K216H	0,90	1,28
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	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
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	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	W221F	1,07	1,28
221	W221I	1,33	1,23
221	W221L	0,88	1,50
221	W221M	1,16	1,35
221	W221N	1,11	1,57
221	W221R	0,93	1,29

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	R232H	0,66	0,34
232	R232K	0,52	0,47
232	R232M	0,62	0,12
232	R232Q	0,54	0,12
232	R232S	0,59	0,16
232	R232T	0,76	0,17
232	R232V	0,70	0,15
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	A235V	1,01	0,86
235	A235W	0,98	0,60
235	A235Y	0,91	0,93
237	K237R	0,48	0,88
238	H238N	0,21	0,83
240	K240M	0,31	1,13
240	K240Q	0,12	1,21

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
240	K240R	0,27	1,41
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	Y250W	0,99	1,35
252	R252A	1,12	1,08

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	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	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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	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	K272R	0,90	0,86
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	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	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	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

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
275	N275Y	0,89	0,93
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

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	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	K300Q	0,90	0,86
300	K300R	1,20	0,92

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	D306Y	0,94	0,12
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	L338M	1,20	1,27
338	L338P	1,11	1,23
338	L338Q	0,96	0,61
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	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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	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	C363Q	0,88	1,78
363	C363S	0,88	1,35
363	C363T	1,15	0,18
363	C363V	1,02	0,99

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
363	C363W	0,35	0,70
363	C363Y	0,92	0,12
366	Y366A	0,96	1,14
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	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	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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	S379G	0,90	0,91
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	D385E	0,89	1,05
385	D385F	0,73	0,54
385	D385G	1,05	0,88
385	D385H	0,96	0,99
385	D385K	1,00	1,06
385	D385L	0,96	0,47
385	D385N	0,91	0,96
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	R391H	0,59	0,29
391	R391K	0,88	0,59
391	R391N	0,71	0,38
391	R391Q	0,62	0,28
391	R391T	0,67	0,25
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	D393K	1,09	0,80
393	D393L	1,04	0,70
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	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	H400Q	0,96	0,94
400	H400R	1,03	0,87

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	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	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	G410F	0,96	0,22
410	G410H	0,93	0,34
410	G410M	1,13	0,35
410	G410N	0,99	0,27
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	G410Y	0,92	0,49
413	R413A	1,02	1,06
413	R413D	0,71	0,40

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	R413Q	0,81	0,35
413	R413S	0,85	0,87
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	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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
419	K419F	0,90	0,17
419	K419H	0,05	0,05
419	K419I	1,12	1,32
419	K419M	1,20	1,27
419	K419P	1,11	1,23
419	K419Q	0,96	0,61
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	LA27E	0,86	0,27
427	L427F	0,89	0,30
427	L427G	0,63	0,26
427	L427I	1,08	0,64
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	L427S	0,78	0,27
427	L427T	0,80	0,70
427	L427V	0,82	0,72
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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	Y439F	0,77	0,78
439	Y439G	1,01	0,77
439	Y439H	0,96	0,73
439	Y439K	0,96	0,74
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	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

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	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	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

ES 2 527 645 T3

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
448	V448S	1,20	1,10
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	Y450W	1,21	0,95
452	LA52A	1,08	1,06
452	L452C	1,00	1,01
452	L452D	0,98	1,08
452	L452E	0,75	0,55
452	LA52F	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	LA52Q	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

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	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	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

Tabla 26-5: Mutaciones combinables en AmyS			
POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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	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	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

POS	variante	PI de la estabilidad	PI de la actividad
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

Ejemplo 27. Posiciones restrictivas frente a no restrictivas

[0394] Basándose en los datos de rendimiento relativo y estabilidad de las posiciones de AmyS descritas en el Ejemplo 26, las posiciones de AmyS se clasificaron como “restrictivas” frente a “no restrictivas” como sigue: Las posiciones no restrictivas tienen $\geq 20\%$ de mutaciones neutras para al menos una propiedad; y las posiciones restrictivas tienen $< 20\%$ de mutaciones neutras para actividad y estabilidad. Las posiciones no restrictivas son buenas candidatas para la mutación para diseñar α -amilasas con función mejorada debido a que un gran número de mutaciones tienen un rendimiento o tolerado (para mantener un rendimiento cercano al de la enzima natural) o mejorado. Las posiciones restrictivas no son buenas candidatas para la mutación puesto que generalmente no toleran las mutaciones. Se pueden mejorar las propiedades de cualquier amilasa combinando mutaciones en posiciones no restrictivas. La Tabla 27-1 muestra las dos posiciones restrictivas identificadas en AmyS (% = porcentaje de variantes evaluadas que cumplieron con la definición de mutación neutra). La Tabla 27-2 muestra las 150 posiciones no restrictivas identificadas en AmyS (% = porcentaje de variantes evaluadas que cumplieron con la definición de mutación neutra; $\geq 20\%$ de mutaciones neutras para al menos una propiedad). Se espera que las posiciones restrictivas y no restrictivas se conserven entre las diferentes α -amilasas.

Posición	Aminoácido natural	% del PI de la estabilidad $>0,5$	% del PI de la actividad $>0,5$
106	H	18 %	0 %
199	L	13 %	0 %

Posición	Aminoácido natural	% del PI de la estabilidad $>0,5$	% del PI de la actividad $>0,5$
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 %

Ejemplo 28. Reducción de la viscosidad de las variantes de AmyS

5 [0395] Se monitorizó la reducción de la viscosidad de diferentes lotes de harina de maíz (saco A, C, E, G) de las variantes de AmyS como se describe en el Ejemplo 6 y se comparó con la reducción de la viscosidad de SPEZYME® Xtra (Genencor). Los resultados se muestran en la Figura 32A y en la Tabla 28-1. Se pueden identificar variantes de AmyS mejoradas en el ensayo de viscosímetro mediante un número de criterios: viscosidad pico disminuida, viscosidad final disminuida, o una dosis de enzima disminuida requerida para producir viscosidades pico o finales similares en relación con la dosis requerida para la enzima natural. En la Tabla 28-1 se muestran en negrita las propiedades mejoradas de las variantes de AmyS.

Tabla 28-1; Reducción de la viscosidad de la harina de maíz de las variantes AmyS en comparación con Xtra				
		dosis (ug)	viscosidad pico	viscosidad final
saco de harina de maíz A	Xtra (UFC)	30,0	20610	4850
	I181A	27,5	16930	13140
	I181P	27,5	17320	13910
		dosis (us)	viscosidad pico	viscosidad final
saco de harina de maíz 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
		dosis (ug)	viscosidad pico	viscosidad final
saco de harina de maíz E	Xtra	15,0	18890	2830
	S242A	15,0	17300	1165
	S242E	15,0	18640	1345
	S242Q	15,0	20490	1800
		dosis (ug)	viscosidad pico	viscosidad final
saco de harina de maíz 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

Ejemplo 29. Reducción de la viscosidad de las variantes de AmyS en presencia de fitasa

5 [0396] La reducción de la viscosidad de la harina de maíz de la AmyS N193Y se monitorizó con y sin la adición de Fitasa BP111 como se describe en el Ejemplo 6 con las siguientes modificaciones. El efecto de la reducción de la viscosidad se midió con pH 5.2, pH 5.5 y 5.8. Los resultados se muestran en la Figura 32B y C. La adición de Fitasa (BP111) a la AmyS N193Y aporta mejoras significativas a la capacidad de la variante para reducir la viscosidad en el Viscosímetro.

10 [0397] Aunque la invención se ha descrito en relación con los modos de realización preferidos específicos, debería entenderse que la invención como se reivindica no debería limitarse indebidamente a dichos modos de realización específicos. De hecho, se pretende que varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención, que son obvias para los expertos en la materia, estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Reivindicaciones

1. Una variante de polipéptido que tiene actividad de α -amilasa en la que la variante de polipéptido tiene al menos una característica alterada que mejora el rendimiento de la enzima, comprendiendo la variante de polipéptido:
- 5 una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a un polipéptido de α -amilasa parental seleccionado de entre AmyS que tienen la secuencia de SEQ ID N°: 1 o una variante truncada de AmyS que tiene la secuencia de SEQ ID N° 2, y que tiene al menos la siguiente mutación en un residuo de aminoácido correspondiente al del polipéptido de α -amilasa parental como se determina alineando las variantes de polipéptidos con el polipéptido parental, donde la mutación cambia el residuo de aminoácido a partir del de los polipéptidos parentales,
- 10 y donde la mutación es una sustitución que introduce uno o varios de los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo consistente en 188P y 188D.
2. Variante según la reivindicación 1, en la que la sustitución es 188P y la variante ha mejorado la termoestabilidad en comparación con el polipéptido parental.
3. Variante según la reivindicación 1, en la que la sustitución es 188D y la variante presenta actividad o expresión aumentada en comparación con el polipéptido parental.
4. Variante según la reivindicación 1, en la que la sustitución es E188P y la variante presenta reducción aumentada de la viscosidad en un ensayo de licuefacción de almidón en comparación con el polipéptido parental.
- 20 5. Variante según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, en la que la mutación está presente en combinación con glutamina en la posición 242, o en la que la mutación está presente en combinación con una delección en las posiciones 179 y 180.
6. Variante según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, en la que el polipéptido parental incluye un truncamiento de los 29 residuos de aminoácidos en la posición C-terminal.
- 25 7. Variante según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4, en la que la sustitución es E188P.
8. Composición de limpieza que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7.
9. Composición de licuefacción de almidón que comprende los polipéptidos según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7.
- 30 10. Método para hidrolizar un sustrato de almidón soluble utilizando una variante de α -amilasa, que comprende la puesta en contacto del sustrato de almidón con una variante de α -amilasa según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7.
11. Método según la reivindicación 10, en el que la variante incluye una sustitución que introduce uno o varios de los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo consistente en I181A, I181P, I181C, I181E, I181Y, S242A, S242E, S242Q, G132A, y N193Y.
- 35 12. Método según la reivindicación 10 u 11, que comprende además la puesta en contacto del sustrato de almidón con una fitasa antes de la puesta en contacto con la variante de α -amilasa o de forma simultánea.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 12, en el que el sustrato de almidón hidrolizado se fermenta en etanol.
- 40 14. Método para la producción de edulcorante, comprendiendo el método la puesta en contacto de un sustrato de almidón con una variante de α -amilasa según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7.
15. Utilización de una variante de α -amilasa según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7 en:
- (i) el desaprestado de textiles, tejidos y prendas; o
 - (ii) en la producción de pulpa de celulosa y papel.

	1	50
SEQID No 1	(1)	-AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSSLGITALWLPPAYKG
SEQID No 2	(1)	-AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSSLGITALWLPPAYKG
SEQID No 3	(1)	-AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSSLGITALWLPPAYKG
SEQID No 4	(1)	-AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSSLGITALWLPPAYKG
SEQID No 5	(1)	-AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSSLGITALWLPPAYKG
SEQID No 6	(1)	HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLNSDASNLSKSGITAVWI PPAWKG
SEQID No 7	(1)	--ANLNGTLMQYFEWYMPNDGQHWKRLQNDASAYLAEHGITAVWI PPAWKG
SEQID No 8	(1)	--ANLNGTLMQYFEWYMPNDGQHWKRLQNDASAYLAEHGITAVWI PPAWKG
SEQID No 9	(1)	----VNGTLMQYFEWYTPNDGQHWKRLQNDAEHLSDIGITAVWI PPAWKG
SEQID No 10	(1)	HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLRSDASNLSKSGITAVWI PPAWKG
SEQID No 11	(1)	HHNGTNGTMMQYFEWHL PNDGNHWNRLRDDASNLRNRGITAIWI PPAWKG
SEQID No 12	(1)	HHNGTNGTMMQYFEWHL PNDGNHWNRLRDDASNLSKSGITAVWI PPAWKG
SEQID No 13	(1)	--DGLNGTMMQYFEWHL PNDGNHWNRLRDDASNLSKSGITAVWI PPAWKG
SEQID No 14	(1)	--DGLNGTMMQYFEWHL PNDGNHWNRLRDDASNLSKSGITAVWI PPAWKG
SEQID No 15	(1)	-AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSSLGITALWLPPAYKG
Consensus	(1)	A NGTMMQYFEWYLPNDGQHW RL NDA NLSS GITALWI PPAWKG
		51
SEQID No 1	(50)	TSRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTKAQYLQAIQAHAAGMQVY
SEQID No 2	(50)	TSRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTKAQYLQAIQAHAAGMQVY
SEQID No 3	(50)	TSRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTKAQYLQAIQAHAAGMQVY
SEQID No 4	(50)	TSRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTKAQYLQAIQAHAAGMQVY
SEQID No 5	(50)	TSRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTKAQYLQAIQAHAAGMQVY
SEQID No 6	(51)	ASQNDVGYGAYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTRSQLQAAVTSLNNGIQVY
SEQID No 7	(49)	TSQADVGYGAYDLYDLGFEFHQKGTVRTKYGTGKELQSAIKSLHSRDINVY
SEQID No 8	(49)	TSQADVGYGAYDLYDLGFEFHQKGTVRTKYGTGKELQSAIKSLHSRDINVY
SEQID No 9	(47)	LSQSDNGYGPYDLYDLGFEFQKGTVRTKYGTKSELQDAIGSLHSRNQVY
SEQID No 10	(51)	ASQNDVGYGAYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTRNQLQAAVNALKSNGIQVY
SEQID No 11	(51)	TSQNDVGYGAYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTRSQLQAAVTSLNNGIQVY
SEQID No 12	(51)	TSQNDVGYGAYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTRSQLQAAVTSLNNGIQVY
SEQID No 13	(49)	NSQADVGYGAYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTQAQLERAIGSLKSNQINVY
SEQID No 14	(49)	NSQADVGYGAYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTQAQLERAIGSLKSNQINVY
SEQID No 15	(50)	TSRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTKAQYLQAIQAHAAGMQVY
Consensus	(51)	TSQSDVGYGAYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTKAQL AI ALHA GIQVY
		101
SEQID No 1	(100)	ADVVFHDKGGADGTEWVDAVEVNPSSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 2	(100)	ADVVFHDKGGADGTEWVDAVEVNPSSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 3	(100)	ADVVFHDKGGADGTEWVDAVEVNPSSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 4	(100)	ADVVFHDKGGADGTEWVDAVEVNPSSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 5	(100)	ADVVFHDKGGADGTEWVDAVEVNPSSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 6	(101)	GDVVMNHKGGADATEMVRAVEVNPNNRNQEVTSGEYTIKAWTRFDFPGRGN
SEQID No 7	(99)	GDVVMNHKGGADATEMVRAVEVNPNNRNQEVTSGEYTIKAWTRFDFPGRGN
SEQID No 8	(99)	GDVVMNHKGGADATEMVRAVEVNPNNRNQEVTSGEYTIKAWTRFDFPGRGN
SEQID No 9	(97)	GDVVMNHKGGADATEMVRAVEVNPNNRNQEVTSGEYTIKAWTRFDFPGRGN
SEQID No 10	(101)	GDVVMNHKGGADATEMVRAVEVNPNNRNQEVTSGEYTIKAWTRFDFPGRGN
SEQID No 11	(101)	GDVVMNHKGGADATEMVRAVEVNPNNRNQEVTSGEYTIKAWTRFDFPGRGN
SEQID No 12	(101)	GDVVMNHKGGADATEMVRAVEVNPNNRNQEVTSGEYTIKAWTRFDFPGRGN
SEQID No 13	(99)	GDVVMNHKGGADATEMVRAVEVNPNNRNQEVTSGEYTIKAWTRFDFPGRGN
SEQID No 14	(99)	GDVVMNHKGGADATEMVRAVEVNPNNRNQEVTSGEYTIKAWTRFDFPGRGN
SEQID No 15	(100)	ADVVFHDKGGADGTEWVDAVEVNPSSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
Consensus	(101)	ADVVFHDKGGADGTE V AVEVNPSSDRNQEISG Y I AWTKFDFPGRGN

Figura 1

	151	200
SEQID No 1	(150)	TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRLKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDY
SEQID No 2	(150)	TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRLKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDY
SEQID No 3	(150)	TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRLKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDY
SEQID No 4	(150)	TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRLKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDY
SEQID No 5	(150)	TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRLKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDY
SEQID No 6	(151)	THSSFKWRWYHFDGVDWDQSRRLNNRIYKFRGHGKAWDWEVDTENGNYDY
SEQID No 7	(149)	TYSDFKWHWYHFDGTDWDESRLKN-RIYKFOG--KAWDWEVSNENGNYDY
SEQID No 8	(149)	TYSDFKWHWYHFDGTDWDESRLKN-RIYKFOG--KAWDWEVSNENGNYDY
SEQID No 9	(147)	TYSDFKWHWYHFDGADWDESRLKIS-RIFKFRGEGKAWDWEVSSENGNYDY
SEQID No 10	(151)	THSNFKWRWYHFDGVDWDQSRKLNRIYKFRGDGKAWDWEVDTENGNYDY
SEQID No 11	(151)	TYSDFKWRWYHFDGVDWDQSRQFQRIYKFRGDGKAWDWEVDSENGNYDY
SEQID No 12	(151)	THSNFKWRWYHFDGTDWDQSRQLQNKIYKFRGTGKAWDWEVDIENGNYDY
SEQID No 13	(149)	AYSDFKWRWFHFNQVDWDQRYQEN-HIFRFAN--TNWNWRVDEENGNYDY
SEQID No 14	(149)	AYSDFKWRWFHFNQVDWDQRYQEN-HLFRFAN--TNWNWRVDEENGNYDY
SEQID No 15	(150)	TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRLKLS-RIYKFRG--KAWDWEVTEFGNYDY
Consensus	(151)	TYS FKWRWYHFDGVDWDESRLKN RIYKFRG GKAWDWEVDTENGNYDY
	201	250
SEQID No 1	(199)	LMYADLDMDHPEVVTELKNWGKQVYVNTTNIDGFRLDAVKHIKFSFFPDWL
SEQID No 2	(199)	LMYADLDMDHPEVVTELKNWGKQVYVNTTNIDGFRLDAVKHIKFSFFPDWL
SEQID No 3	(199)	LMYADLDMDHPEVVTELKNWGKQVYVNTTNIDGFRLDAVKHIKFSFFPDWL
SEQID No 4	(199)	LMYADLDMDHPEVVTELKNWGKQVYVNTTNIDGFRLDAVKHIKFSFFPDWL
SEQID No 5	(199)	LMYADLDMDHPEVVTELKNWGKQVYVNTTNIDGFRLDAVKHIKFSFFPDWL
SEQID No 6	(201)	LMYADIDMDHPEVVNELRNWGVWYVNTNLGLDGFRLDAVKHIKYSFTRDWI
SEQID No 7	(196)	LMYADIDYDHPDVAEIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSFLRDWV
SEQID No 8	(196)	LMYADIDYDHPDVAEIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSFLRDWV
SEQID No 9	(196)	LMYADVDYDHPDVVAETKKWGTWYANELSLDGFRLDAAKHIKFSFLRDWV
SEQID No 10	(201)	LMYADIDMDHPEVVNELRNWGVWYVNTNLGLDGFRLDAVKHIKYSFTRDWI
SEQID No 11	(201)	LMYADVDMDHPEVVNELRRWGEWYVNTNLNLDGFRLDAVKHIKYSFTRDWI
SEQID No 12	(201)	LMYADIDMDHPEVINELRNWGVWYVNTNLNLDGFRLDAVKHIKYSFTRDWI
SEQID No 13	(196)	LLGSNIDFHSPEVQDELKDWGSWFTDELDLDGYRLDAIKHIPWYTSWV
SEQID No 14	(196)	LLGSNIDFHSPEVQDELKDWGSWFTDELDLDGYRLDAIKHIPWYTSWV
SEQID No 15	(197)	LMYADLDMDHPEVVTELKNWGKQVYVNTTNIDGFRLDAVKHIKFSFFPDWL
Consensus	(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)	NHVRATGKMFVAEAFWKNDLGALENYLQKTNWNHNSVFDVPLHYNLNA
SEQID No 7	(246)	NHVREKTGKEMFTVAEYQNDLGALENYLNKTNFNHNSVFDVPLHYQFHAA
SEQID No 8	(246)	NHVREKTGKEMFTVAEYQNDLGALENYLNKTNFNHNSVFDVPLHYQFHAA
SEQID No 9	(246)	QAVRQATGKEMFTVAEYQNNAGKENYLNKTSFNQSVFDVPLHFNLQAA
SEQID No 10	(251)	NHVRATGKMFVAEAFWKNDLGALENYLNKTNWNHNSVFDVPLHYNLNA
SEQID No 11	(251)	THVRNATGKMFVAEAFWKNDLGALENYLNKTNWNHNSVFDVPLHYNLNA
SEQID No 12	(251)	THVRNTTGKPMFVAEAFWKNDLAAIENYLNKTSWNHNSVFDVPLHYNLNA
SEQID No 13	(246)	RHORNEADQDLFVVGEYWKDDVGALEFYLDENWEMSLFDVPLNYNFYRA
SEQID No 14	(246)	RHORSEADQDLFVVGEYWKDDVGALEFYLDENWEMSLFDVPLNYNFYRA
SEQID No 15	(247)	SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTA
Consensus	(251)	SHVRS TGK LFTVGEYW DIGALENYL KTNW MSLFDVPLHYNFY A

Figura 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)	SKSGGNVDMRNIFNGTVVQRHPHAVTFVDNHDSPPEEALESFVEEWFKP	
SEQID No 7	(296)	STQGGGYDMRKLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTPQGSLESTVQTFWFKP	
SEQID No 8	(296)	STQGGGYDMRKLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTPQGSLESTVQTFWFKP	
SEQID No 9	(296)	SSQGGGYDMRRLDGTVVSRHPEKAVTFVENHDTOPGQSLSTVQTFWFKP	
SEQID No 10	(301)	SKSGGNVDMRQIFNGTVVQRHPHAVTFVDNHDSPPEEALESFVEEWFKP	
SEQID No 11	(301)	SNSGGNYDMAKLLNGTVVQKHPMHAVTFVDNHDSPGESLESFVQEWFKP	
SEQID No 12	(301)	SNSGGYFDMRNILNGSVVQKHPHIVAVTFVDNHDSPGESLESFVQSWFKP	
SEQID No 13	(296)	SQGGSYDMRNILRGSLSVEAHPMHAVTFVDNHDTPGESLESWVADWFKP	
SEQID No 14	(296)	SKQGGSYDMRNILRGSLSVEAHPHIVAVTFVDNHDTPGESLESWVADWFKP	
SEQID No 15	(297)	SKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKP	
Consensus	(301)	SKSGGAYDMR LL GTLV HF AVTFVDNHDTPGQALQSWVDPWFKP	
		351	400
SEQID No 1	(349)	LAYAFILTRQEGYPCVFGDYGGIPQYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA	
SEQID No 2	(349)	LAYAFILTRQEGYPCVFGDYGGIPQYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA	
SEQID No 3	(349)	LAYAFILTRQEGYPCVFGDYGGIPQYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA	
SEQID No 4	(349)	LAYAFILTRQEGYPCVFGDYGGIPQYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA	
SEQID No 5	(349)	LAYAFILTRQEGYPCVFGDYGGIPQYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA	
SEQID No 6	(351)	LAYALTLTREQGYPSVFGDYGGIPTHG---VPAMRSKIDPILEARQKYA	
SEQID No 7	(346)	LAYAFILTRESGYPQVFGDMYGTGKDSQREIPALKHKIEPILKARKQYA	
SEQID No 8	(346)	LAYAFILTRESGYPQVFGDMYGTGKDSQREIPALKHKIEPILKARKQYA	
SEQID No 9	(346)	LAYAFILTRESGYPQVFGDMYGTGKTSPEKIPSLKDNIEPILKARKEYA	
SEQID No 10	(351)	LAYALTLTREQGYPSVFGDYGGIPTHG---VPAMRSKIDPILEARQKYA	
SEQID No 11	(351)	LAYALILTREQGYPSVFGDYGGIPTHS---VPAMKAKIDPILEARQNFYA	
SEQID No 12	(351)	LAYALILTREQGYPSVFGDYGGIPTHG---VPSMKSIDPELLQARQTYA	
SEQID No 13	(346)	LAYATILTREGGYPNVFGDYGGIPNDN---ISAKKDMIDELLDARQNYA	
SEQID No 14	(346)	LAYATILTREGGYPNVFGDYGGIPNDN---ISAKKDMIDELLDARQNYA	
SEQID No 15	(347)	LAYAFILTRQEGYPCVFGDYGGIPQYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA	
Consensus	(351)	LAYAFILTRE GYP VFGDYGGIPQYN 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)	YGKQNDYLDHSDIIGWTREGNTAHPNSSLATIMSDGAGGSKWMFVGRNKA	
SEQID No 7	(396)	YGAQHDYFDHSDIIGWTREGDSSVANSGLAALITDGPGGAKRMYVGRQNA	
SEQID No 8	(396)	YGAQHDYFDHSDIIGWTREGDSSVANSGLAALITDGPGGAKRMYVGRQNA	
SEQID No 9	(396)	YGPQHDYIDHSDIIGWTREGDSSAAKSGLAALITDGPGGSKRMYAGLKNA	
SEQID No 10	(398)	YGRQNDYLDHSDIIGWTREGNTAHPNSSLATIMSDGAGGKWMFVGRNKA	
SEQID No 11	(398)	YGTQHDYFDHSDIIGWTREGNTAHPNSSLATIMSDGPGGKWMFVGRNKA	
SEQID No 12	(398)	YGTQHDYFDHSDIIGWTREGDSSHPNSGLATIMSDGPGGKWMFVGRNKA	
SEQID No 13	(393)	YGTQHDYFDHSDIIGWTREGSSSRPNSSLATIMSDGPGGSKWMYVGRQNA	
SEQID No 14	(393)	YGTQHDYFDHSDIIGWTREGTSSRPNSGLATIMSDGPGGSKWMYVGRQNA	
SEQID No 15	(394)	YGTQHDYLDHSDIIGWTREGGTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQHA	
Consensus	(401)	YGTQHDYLDH DIIGWTREG TSKPNSSLAALITDGPGGSKWMYVGKQ A	

Figura 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)	GQVWSDITGNRTGTVTINADGWGNFVNGGSVSIWVVK-----	
SEQID No 7	(446)	GETWHDITGNRSEPVVINSEGWGEFHVNGGSVSIYVQR-----	
SEQID No 8	(446)	GETWHDITGNRSEPVVINSEGWGEFHVNGGSVSIYVQR-----	
SEQID No 9	(446)	GETWYDITGNRSDTVKIGSDGWGEFHVNDGGSVSIYVQK-----	
SEQID No 10	(448)	GQVWTDITGNRAGTVTINADGWGNFVNGGSVSIWVVK-----	
SEQID No 11	(448)	GQVWHDITGNKPGTVTINADGWANFVNGGSVSIWVKR-----	
SEQID No 12	(448)	GQVWRDITGNRSGTVTINADGWGNFTVNGGAVSVWVKQ-----	
SEQID No 13	(443)	GQTWDLTGNGASVTINGDGWGEFFTINGGSVSVVYNQ-----	
SEQID No 14	(443)	GQTWDLTGNAASVTINGDGWGEFFTINGGSVSVVYNQ-----	
SEQID No 15	(444)	GKVFYDLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVVWVPRKTTVS-----	
Consensus	(451)	G VWYDLTGNRSDTVTINSDGWGEF 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)	-----	
Consensus	(501)		

Figura 1 (cont.)

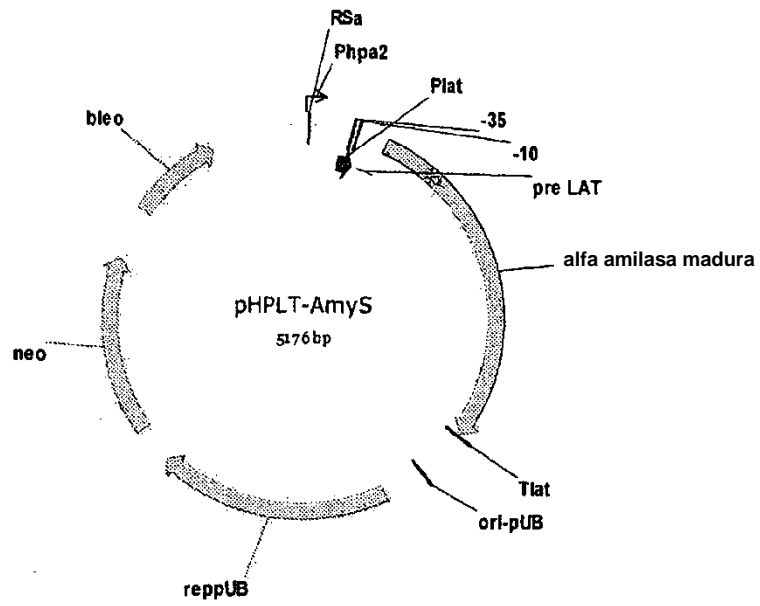


Figura 2

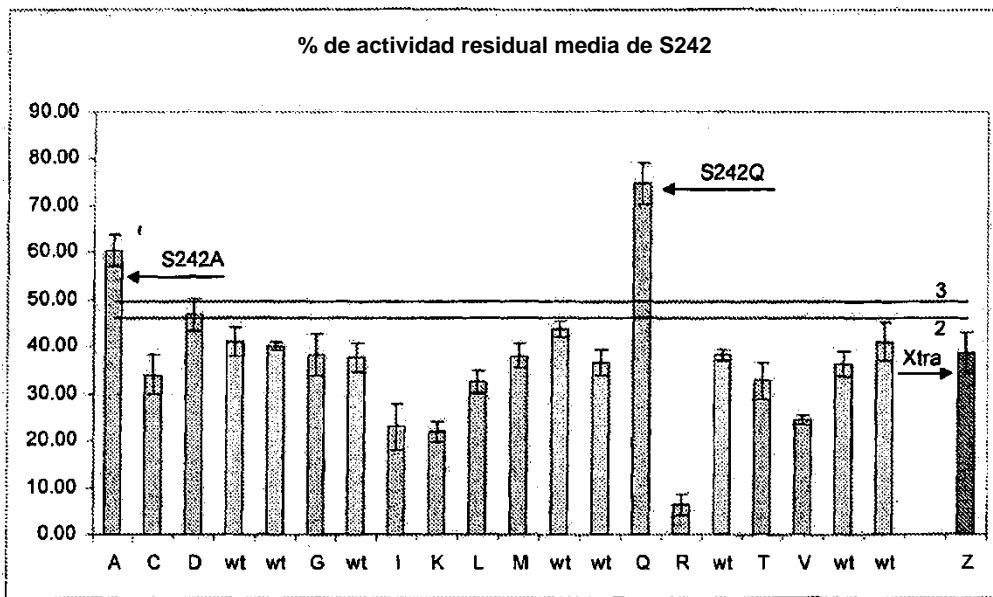


Figura 3

ES 2 527 645 T3

```

1
50
SEQID No 1 (1) -AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKG
SEQID No 6 (1) HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLNSDASNLKSKGITAVWIPPAWKG
Consensus (1) NGTMMQYFEWYLP DG W KL DA NL S GITALWIPPAWKG
51 100
SEQID No 1 (50) TSRSVDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY
SEQID No 6 (51) ASQNDVGYGAYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTRSQQAQAVTSLKNNGIQVY
Consensus (51) S DVGYG YDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKQ AI A GIQVY
101 150
SEQID No 1 (100) ADVVFDHKGADGTEWVDAVEVNPSPDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 6 (101) GDVVMNHKGGADATEMVRAVEVNPNNRNQEVTEGYTIEAWTRFDFPGRGN
Consensus (101) ADVV HKGADATE V AVEVNP RNQEISG Y I AWTKFDFPGRGN
151 200
SEQID No 1 (150) TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNNDY
SEQID No 6 (151) THSSFKWRWYHFDGVDWDQSRRLNRIYKFRGHGKAWDWEVDTENGNNDY
Consensus (151) THSSFKWRWYHFDGVDWD SRKL RIYKFRG GKAWDWEVDTENGNNDY
201 250
SEQID No 1 (199) LMYADLMDHPEVVTELKNWGKVVNTTNIDGFRLDAVKHIKFSFPDNL
SEQID No 6 (201) LMYADIDMDHPEVVNELRNWGVWYNTNLGLDGFRIIDAVKHKYSFTRDWI
Consensus (201) LMYADIDMDHPEVV ELKNWG WY NT IDGFRIDAVKHKFSF DWI
251 300
SEQID No 1 (249) SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKIFYTA
SEQID No 6 (251) NHVRSATGKNMFAVAEPWKNLDGAIENYLQKTNNWNHVSFVDFVPLHYNLYNA
Consensus (251) HVRS TKG LF VAEPW DI I NYI KTN SLFD PLH Y A
301 350
SEQID No 1 (299) SKSGGAFDMRITLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDWFKFP
SEQID No 6 (301) SKSGGNVDMRNIFNGTVVQRHPSHAVTFVDNHDSPPEEALSFVEWFKFP
Consensus (301) SKSGG FDMR I TLM PS AVTFVDNHDSP AL SFVD WFKFP
351 400
SEQID No 1 (349) LAYAFILTRQEGYPCVFGDYDYGIPQYNIPLSKSKIDPLLIARRDYAYGT
SEQID No 6 (351) LAYALTLTRQGYPSVFGDYDYGIPTHGVPAMRSKIDPILEARQKYAYGK
Consensus (351) LAYA LTR GYP VFGDYDYGIP H IPALKSKIDPIL AR YAYG
401 450
SEQID No 1 (399) QHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWYVVGKQHAGKV
SEQID No 6 (401) QNDYLDHSDIIGWTREGNTAHPNSGLATIMSDGAGGSKWYVVGKRNKAGQV
Consensus (401) Q DYLDH IIGWTREG T P SGLA IISDG GSKWYVVGKN AG V
451 500
SEQID No 1 (449) FYDLTGNRSDTVTINSDGWGFEKVNNGSVSVVWVPRKTTVSTIARPIITRP
SEQID No 6 (451) WSDITGNRTGTVTINADGWGNFVNGGSVSIWVNK-----
Consensus (451) F DITGNRS TVTINADGWG F VNGGSVSIWV K
501 517
SEQID No 1 (499) WTGEFVRWTEPRLVAWP
SEQID No 6 (486) -----
Consensus (501)

```

Figura 4A

```

1
50
SEQID No 1 (1) AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITLWLPAYKGT
SEQID No 8 (1) -ANLNGTLMQYFEWYMENDGQHRRRLQNDAYSALAEHGITAVWIPPAYKGT
Consensus (1) A NGTLMQYFEWYLP DG W KL NDA LA GITALWIPPAYKGT
51 100
SEQID No 1 (51) SRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAHAAGMQVYA
SEQID No 8 (50) SQADVGYGAYDLYDLGFEFHQKGTVRTKYGTGELQSAIKSLHSRDINVYG
Consensus (51) S ADVGYG YDLYDLGEF QKGTVRTKYGTAK AI A HA INVYA
101 150
SEQID No 1 (101) DVVFDHKGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGNT
SEQID No 8 (100) DVVINHKGADATEDVTAVEVDPADRNRVISGEHLIKAWTHFHPGRGST
Consensus (101) DVV HKGADATE V AVEV PADRN ISG H I AWT F FPGRG T
151 200
SEQID No 1 (151) YSDFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTEGNYDYLM
SEQID No 8 (150) YSDFKWRWYHFDGTDWDESRKLNRIYKFK--GKAWDWEVSNENGNDYLM
Consensus (151) YS FKW WYHFDG DWDESRKL RIYKF GKAWDWEV ENGNDYLM
201 250
SEQID No 1 (201) YADLMDHPEVVTELNKWKWYVNTNIDGFRDLAVKHKIFSFPPDWLSY
SEQID No 8 (198) YADIDYDHPDVAAEIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHKIFSLRDWVNH
Consensus (201) YADID DHPDV EIK WG WY N NIDGFRDLAVKHKIFSF DWL H
251 300
SEQID No 1 (251) VRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFTASK
SEQID No 8 (248) VREKTGKEMFTVAEYWQNDLGALENYLNKTNFNHVSFVDPVPLHYQFHAAS
Consensus (251) VR TGK LFTVAEYW DI L NYI KTN SLFD PLH FH AS
301 350
SEQID No 1 (301) SGGAFDMRMLTNTLMKQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFPLA
SEQID No 8 (298) QGGGYDMRKLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTPGGQSLSTVQTFWFKPLA
Consensus (301) GGAFDMR LL TLM P AVTFVDNHDTPGQAL S V WFKPLA
351 400
SEQID No 1 (351) YAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIP--QYNIPSLKSKIDPLLIARRDYAYG
SEQID No 8 (348) YAFILTRQEGYPCVFYGDYMGTKGDSQREIPALKHKIEPILKARKQYAYG
Consensus (351) YAFILTR GYP VFYGD YG Q IPALK KIDPIL ARK YAYG
401 450
SEQID No 1 (398) TQHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGGGSKWYVVGKQHAGK
SEQID No 8 (398) AQHDYFDHHDIVGWTRREGDSSVANSGLAALITDGGGAKRMYVGRQAGE
Consensus (401) QHDY DH DIIGWTREG S SGLAALITDGGGAK MYVGKQ AG
451 500
SEQID No 1 (448) VFYDLTGNRSDTVTINSWGGEFVNGGVSVWVPRKTTVSTIARPIITR
SEQID No 8 (448) TWHDITGNRSEPVVINSEGWGEFVNGGVSIVYVQR-----
Consensus (451) FHDITGNRSD V INSDGWGEF VNGGVSIVV R
501 518
SEQID No 1 (498) PWTGEFVRWTEPRLVAVP
SEQID No 8 (484) -----
Consensus (501)

```

Figura 4B

```

1
50
SEQID No 1 (1) AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT
SEQID No 9 (1) ---VNGTLMQYFEWYTPNDGQHWKRLQNDAEHLSDIGITAVWIPPAYKGL
Consensus (1) NGTLMQYFEWY P DG W KL NDA LS IGITALWIPPAYKG
51 100
SEQID No 1 (51) SRSDVGYGVYDLYDLGEPNQKGTVRTKYGTKAQYLQAIQAAHAAGMQVYA
SEQID No 9 (48) SQSDNGYGPYDLYDLGEPQKGTVRTKYGTKSELQDAIGSLHSRNVQVYG
Consensus (51) S SD GYG YDLYDLGEPNQKGTVRTKYGTKA AI A HA MQVYA
101 150
SEQID No 1 (101) DVVFDHKGGADGTEWVDAVEVNPSPDRNQEISGTYQIQAWTKFDPPGRGNT
SEQID No 9 (98) DVVLNHRKAGADATEDVTAVEVNPANRNQETSEEYQIKAWTDFRFPGRGNT
Consensus (101) DVV HKAGADATE V AVEVNPA RNQE S YQI AWT F FPGRGNT
151 200
SEQID No 1 (151) YSDFKRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTEGNYDYLM
SEQID No 9 (148) YSDFKRWYHFDGADWDESRKISRIYKFRGEGKAWDWEVSENGNYDYLM
Consensus (151) YS FKW WYHFDG DWDESRKISRIYKFRG GKAWDWEV SENGNYDYLM
201 250
SEQID No 1 (201) YADLDMHPEVVTELKNWGWVNTTNIDGFRDLDAVKHIKFSFFPDWLSY
SEQID No 9 (198) YADVVDHDPDVAETKKWGIWYANESLDGFRIDA AKHIKFSFLRDWVQA
Consensus (201) YADLD DHPDVV E K WG WY N IDGFRIDA KHIKFSF DWL
251 300
SEQID No 1 (251) VRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFTYASK
SEQID No 9 (248) VRQATGKEMFTVAEYWQNNAGKLENYLNKTSFNQSVFDVPLHFNLAASS
Consensus (251) VR TGK LFTVAEYW KL NYI KT SLFD PLH AS
301 350
SEQID No 1 (301) SGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKPLA
SEQID No 9 (298) QGGGYDMRLLDGTVVSRHPEKAVTFVENHDTQPGQSLESTVQTFWKPLA
Consensus (301) GGAFDMR LL TLM P AVTFVDNHDTE PGQAL S V WFKPLA
351 400
SEQID No 1 (351) YAFILTRQEGYPCVFYGDYYPQYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYAYG
SEQID No 9 (348) YAFILTRQEGYPCVFYGDYYPQYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYAYG
Consensus (351) YAFILTR GYP VFYGD YG IPSLK IDPIL ARKDYAYG
401 450
SEQID No 1 (398) TQHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWYVVGKQHAGK
SEQID No 9 (398) PQHDYIDHDPVIGWTREGDSSAAKSGLAALITDGPGGSKRMYAGLKNAGE
Consensus (401) QHDYIDH DIIGWTREG S SGLAALITDGPGGSK MY G AG
451 500
SEQID No 1 (448) VFYDLTGNRSDTVTINSDGWGEFVNGGVSVWVPRKTTVSTIARPIITR
SEQID No 9 (448) TWYDITGNRSDTVKIGSDGWGEFVNDGVSISIVQK-----
Consensus (451) FYDITGNRSDTV I SDGWGEF VN GSVSIWV K
501 518
SEQID No 1 (498) PWTGEFVRWTEPRLVAVP
SEQID No 9 (484) -----
Consensus (501)

```

Figura 4C

```

1
50
SEQID No 1 (1) -AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLWPPAYKG
SEQID No 10 (1) HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLRSDASNLDKDGISAVWIPPAAWKG
Consensus (1) NGTMMQYFEWYLP DG W KL DA NL GISALWIPPAAWKG
51 100
SEQID No 1 (50) TSRSVGVYGYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY
SEQID No 10 (51) ASQNDVGVYGYDLYDLGFEFNQKGTIRTQYGTNRQLQAAVNALKSNGIQVY
Consensus (51) S DVGYG YDLYDLGFEFNQKGTIRTQYGTK Q AINA A GIQVY
101 150
SEQID No 1 (100) ADVVFDHKGGADGTEWVDAVEVNPSPDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 10 (101) GVVVMNHKGGADATEMVRRAVEVNPNNRNQEVSGEYTIKAWTKFDFPGRGN
Consensus (101) ADVV HKGGADATE V AVEVNP RNQEISG Y I AWTKFDFPGRGN
151 200
SEQID No 1 (150) TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDY
SEQID No 10 (151) THSNFKWRWYHFDGVDWQSRKLNRIYKFRGDGKAWDWEVDTENGNYDY
Consensus (151) THS FKRWRWYHFDGVDW SRKL RIYKFRG GKAWDWEVDTENGNYDY
201 250
SEQID No 1 (199) LMYADLMDHPEVVTELKNWGKQVYVNTTIDGFRIDAVKHIKFSFPDWL
SEQID No 10 (201) LMYADIDMDHPEVVELRNWGVWYTNLGLDGFRIKAVKHIKYSFTRDWI
Consensus (201) LMYADIDMDHPEVV ELKNWG WY NT IDGFRIDAVKHIKFSF DWI
251 300
SEQID No 1 (249) SYVRSQTGKPLFTVGEYYSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKPYTA
SEQID No 10 (251) NHVRSATGKNMFAVAEFPWKNDLGAENYLNKTNWNHVSFVPLHYNLYNA
Consensus (251) HVRS TCK LF VAEFW DI I NYI KTN SLFD PLH Y A
301 350
SEQID No 1 (299) SKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTPEGQALQSWVDPWFKP
SEQID No 10 (301) SKSGGNYDMRQIFNGTVVQRHPMHAVTFVDNHDSQPBEALBSFVEWFKP
Consensus (301) SKSGG FDMR I TLM P AVTFVDNHDS P AL SFVD WFKP
351 400
SEQID No 1 (349) LAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYNIPSLKSKIDPLLIARRDYAYGT
SEQID No 10 (351) LAYALTLTREQGYPSVFYGDYYGIPTHGVPAMKSKIDPILBARQKYAYGR
Consensus (351) LAYA LTR GYP VFYGDYYGIP H IPALKSKIDPIL AR YAYG
401 450
SEQID No 1 (399) QHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWVVGKQHGKQV
SEQID No 10 (401) QNDYLDHNNIIGWTREGNTAHPNSGLATIMSDGAGGNKWMFVGRNKAGQV
Consensus (401) Q DYLDH IIGWTREG T P SGLA IISDG GG KWMFVVGK AG V
451 500
SEQID No 1 (449) FYDLTGNRSDTIVTINSDGWGEFKNVGGSVSVVWPRKTTVSTIARPIITRP
SEQID No 10 (451) WTDITGNRAGTIVTINADGWGNFVNGGVSIVWNK-----
Consensus (451) F DITGNRA TVTINADGWG F VNGGVSIVW K
501 517
SEQID No 1 (499) WTGEFVRWTEPRLVAVP
SEQID No 10 (486) -----
Consensus (501)

```

Figura 4D


```

1
SEQID No 1 (1) -AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKG 50
SEQID No 11 (1) HHNGTNGTMMQYFEWHLFNDGNHWNRLRDDASNLRNRGITAIWIPPAWKG
Consensus (1) NGTMMQYFEWHL P DG W KL DA NL GITAIWIPPAWKG
51 100
SEQID No 1 (50) TSRSVGVGYVVDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTKAQYLQAIQAHAAGMQVY
SEQID No 11 (51) TSQNDVGVGAYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTRSQLESIAHALKNNGVQVY
Consensus (51) TS DVGYG YDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTKAQ AI A GMQVY
101 150
SEQID No 1 (100) ADVVFDHKGADGTEWVDAVEVNPNSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 11 (101) GDVVMNHKGGADATENVLAVEVNPNNRNQEISGDYIEAWTKFDFPGRGN
Consensus (101) ADVV HKGGADATE V AVEVNP RNQEISG Y I AWTKFDFPGRGN
151 200
SEQID No 1 (150) TYSSFKWRWYHFDGVDWDESR-KLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDY
SEQID No 11 (151) TYSDFKWRWYHFDGVDWQSRQFQNRRIYKFRGDGKAWDWEVDSNGNYDY
Consensus (151) TYS FKWRWYHFDGVDWD SR RIYKFRG GKAWDWEVDSNGNYDY
201 250
SEQID No 1 (199) LMYADLMDHPEVVTELKNWGKWYVNTTNIDGFRIDAVKHKIKFSFFPDWL
SEQID No 11 (201) LMYADVMDHPEVVNELRRWGEWYNTLNLDGFRIDAVKHKIKYSFTRDWL
Consensus (201) LMYADLMDHPEVV ELK WG WY NT NIDGFRIDAVKHKIKFSF DWL
251 300
SEQID No 1 (249) SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTA
SEQID No 11 (251) THVRNATGKEMFAVAFBWKNDLGALENYLNKTNWNHVSFVDFLHYNLYNA
Consensus (251) SHVR TGK LF VAEFW DI L NYI KTN SLFD PLH Y A
301 350
SEQID No 1 (299) SKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKP
SEQID No 11 (301) SNSGGNYDMAKLLNGTVVQKHPMAVTFVDNHDSPGESLESFVQEWFKP
Consensus (301) S SGG FDM LL TLM P AVTFVDNHD S PG AL SFV WFKP
351 400
SEQID No 1 (349) LAYAFILTRQEGYPCVFGDYDGIPQYNIPSLKSKIDPLLIARRDYAYGT
SEQID No 11 (351) LAYALILTRQGYPSVFGDYDGIPTHSVPAMKAKIDPILEARQNFAYGT
Consensus (351) LAYA ILTR GYP VFGDYDGIP H IPALKAKIDPIL AR FAYGT
401 450
SEQID No 1 (399) QHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWYVVGKQHAGKV
SEQID No 11 (401) QHDYFDHHNIIGWTREGNTTHPNSGLATIMSDGPGGEKWMYVVGQNKAGQV
Consensus (401) QHDY DH IIGWTREG T P SGLA IISDGP GG KWYVVG N AG V
451 500
SEQID No 1 (449) FYDLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVVWPRKTTVSTIARPIITRP
SEQID No 11 (451) WHDITGNKPGTVTINADGWANFSVNGGSVSIWVKR-----
Consensus (451) FHDITGNK TVTINADGWA F VNGGSVSIWV R
501 517
SEQID No 1 (499) WTGEFVRWTEPRLVAMP
SEQID No 11 (486) -----
Consensus (501)

```

Figura 4E

		1		50
SEQID No 1	(1)	-AAPFNQYFQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKG		
SEQID No 12	(1)	HHNGTNGTMMQYFEWHLPNQGNHWNRLRDDAANLKSQGITAVWIPPAWKG		
Consensus	(1)	NGTMMQYFEWHL P DG W KL DA NL S GITALWIPPAWKG		
		51		100
SEQID No 1	(50)	TSRSDVGYGVYDLYDLGEBFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY		
SEQID No 12	(51)	TSQNDVGYGAYDLYDLGEBFNQKGTVRTKYGTRSQIQGAVTSLKNNGIQVY		
Consensus	(51)	TS DVGYG YDLYDLGEBFNQKGTVRTKYGTAKQ AI A GIQVY		
		101		150
SEQID No 1	(100)	ADVVPDHHKGGADGTEWVDAVEVNPSPDRNQEISGYQIQAWTKFDFPGRGN		
SEQID No 12	(101)	GDVVMNHKGGADGTEMVNAVEVNRNDRNQEISGEYIEAWTKFDFPGRGN		
Consensus	(101)	ADVV HKGGADGTE V AVEVN S RNQEISG Y I AWTKFDFPGRGN		
		151		200
SEQID No 1	(150)	TYSSFKWRWYHFDGVDWDESR-KLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDY		
SEQID No 12	(151)	THSNFKWRWYHFDGTDWQSRQLQNKIYKFRGTGKAWDWEVDIENGNYDY		
Consensus	(151)	THS FKWRWYHFDG DWD SR KIYKFRG GKAWDWEVD ENGNVDY		
		201		250
SEQID No 1	(199)	LMYADLMDHPEVVTTELKNWGKVVNTTIDGFRLDVAVKHKFSFPDWL		
SEQID No 12	(201)	LMYADIDMDHPEVINELRNWGVVYVNTLNLGFRIDAVKHKYSYTRDWL		
Consensus	(201)	LMYADIDMDHPEVI ELKNWG WY NT NIDGFRIDAVKHKFSF DWL		
		251		300
SEQID No 1	(249)	SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKNGTMSLFDAPLHNKPYTA		
SEQID No 12	(251)	THVRNTTGKPMFAVAEFWKNDLAAIENYLNKTSWNHVSFVPLHYNLYNA		
Consensus	(251)	SHVR TGKPLF VAEFW DI I NYI KT SLFD PLH Y A		
		301		350
SEQID No 1	(299)	SKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKP		
SEQID No 12	(301)	SNSGGYFDMRNILNGSVQKHPHIAVTFVDNHDSPGEALSFVQSWFKP		
Consensus	(301)	S SGG FDMR IL SLM P AVTFVDNHD S PG AL SFV WFKP		
		351		400
SEQID No 1	(349)	LAYAFILTRQEGYPCVFGDYDGIPQYNIPSLKSKIDPLLIARRDYAYGT		
SEQID No 12	(351)	LAYALILTRQGYPSVFGDYDGIPHTGVPSMKSIDPLLQARQTYAYGT		
Consensus	(351)	LAYA ILTR GYP VFGDYDGIP H IPSLKSIDPLL AR YAYGT		
		401		450
SEQID No 1	(399)	QHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWYVVGKQHAGKV		
SEQID No 12	(401)	QHDYFDHSDIIGWTREGDSSHPSGLATIMSDGPGGNKMYVVGKQAGQV		
Consensus	(401)	QHDY DH DIIGWTREG S P SGLA IISDGP GG KMYVVGK AG V		
		451		500
SEQID No 1	(449)	FYDLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVVWVPRKTTVSTIARPIITRP		
SEQID No 12	(451)	WRDITGNRSGTVTINADGWGNFTVNGGAVSVVWVQ-----		
Consensus	(451)	F DITGNRS TVTINADGWG F VNGGAVSVVW		
		501		517
SEQID No 1	(499)	WTGEFVRWTEPRLVAVP		
SEQID No 12	(486)	-----		
Consensus	(501)			

Figura 4F

		1		50
SEQID No 1	(1)	AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITLWLPAYKGT		
SEQID No 13	(1)	-DGLNGTMMQYFEWHLNDGQHWNRHLHDDAAALSDAGITAIWIIPPAYKGN		
Consensus	(1)	NGTMMQYFEWHL DG W KL DA LS GITAIWIIPPAYKG		
		51		100
SEQID No 1	(51)	SRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTRYGTKAQYLOAIQAAHAAGMQVYA		
SEQID No 13	(50)	SQADVGYGAYDLYDLGFEFNQKGTVRTRYGTKAQLERAIGSLKSNIDINVYG		
Consensus	(51)	S ADVGYG YDLYDLGFEFNQKGTVRTRYGTKAQ AI A A INVYA		
		101		150
SEQID No 1	(101)	DVVPDHHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGYQIQAWTKFDFPGRGNT		
SEQID No 13	(100)	DVVMNHKMGADFTAVQAVQVNPTNRWQDISGAYTIDAWTGFDFSGRNN		
Consensus	(101)	DVV HK GAD TE V AV VNPS R QDISG Y I AWT FDF GR N		
		151		200
SEQID No 1	(151)	YSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNVDYLM		
SEQID No 13	(150)	YSDFKWRWPHFNGVDWQRYQENHIFRFANTN--WNWRVDEENGNVDYLL		
Consensus	(151)	YS FKWRWFH F GVDWD IFKF W W VD ENGNVDYLL		
		201		250
SEQID No 1	(201)	YADLMDHPEVVTTELKNWGKQVNTTIDGFRLDAVKHIKFSFFPDWLSY		
SEQID No 13	(198)	GSNIDFSPHPEVQDELKDWGSWFTDELDDGYRLDAIKHIPFWYTSDWVRH		
Consensus	(201)	A ID HPEV ELK WG WF IDGFRLDAIKHI F F DWL H		
		251		300
SEQID No 1	(251)	VRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKPYTASK		
SEQID No 13	(248)	QRNEADQDLFVVEYWKDDVGALEFYLDENWEMSLFDVPLNYPYRASQ		
Consensus	(251)	R LF VGEYW DI L YI N MSLFD PL FY AS		
		301		350
SEQID No 1	(301)	SGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKPLA		
SEQID No 13	(298)	QGGSYDMRNILRGLSVEAHPMHAVTVDNHDTPGGSLESWVADWFKPLA		
Consensus	(301)	GGAFDMR IL SLM P AVTFVDNHDTPG AL SWV WFKPLA		
		351		400
SEQID No 1	(351)	YAFILTRQEGYPCVFGDYDGIPQYNIPLSKSKIDPLLIARRDYAYGTQH		
SEQID No 13	(348)	YATILTRQEGYPNVFGDYDGIPNDNISAKKDMIDELLDARQNYAYGTQH		
Consensus	(351)	YA ILTR GYP VFGDYDGIPN NI A K ID LL AR YAYGTQH		
		401		450
SEQID No 1	(401)	DYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPSSKWMYVKGQHAGKVFY		
SEQID No 13	(398)	DYFDHWDVVGWTRREGSSSRPNSGLATIMSNPSSKWMYVGRQNAQTWT		
Consensus	(401)	DY DH DIIGWTREG S KP SGLA IIS GPGSSKWMYVKGQ AG F		
		451		500
SEQID No 1	(451)	DLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVVWVPRKTTVSTIARPIITRPWT		
SEQID No 13	(448)	DLTGNGASVTINGDCWGEFPTNGGSVSVVYVNO-----		
Consensus	(451)	DLTGN SVTIN DGWGEF NGGSVSVVW		
		501	515	
SEQID No 1	(501)	GEFVRWTEPRLVAVP		
SEQID No 13	(481)	-----		
Consensus	(501)			

Figura 4G

```

1 50
SEQID No 1 (1) AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT
SEQID No 14 (1) -DGLNGTMMQYFEWHLNDGQHWNRLLHDDAEALSNAGITAIWIPPAYKGN
Consensus (1) NGTMMQYFEWHL DG W KL DA LS GITAIWIPPAYKG
51 100
SEQID No 1 (51) SRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTKAQYLQAIQAAHAAGMQVYA
SEQID No 14 (50) SQADVGYGAYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTKAQLERAIGSLKSNNDINVYV
Consensus (51) S ADVGYG YDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTKAQ AI A A INVYA
101 150
SEQID No 1 (101) DVVFDHKGGADGTEWVDAVEVNPSPDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGNT
SEQID No 14 (100) DVVMNHKLGADFEAVQAVQVNPSPNRWQDISGVYTIQAWTKFDFPGRNNA
Consensus (101) DVV HK GAD TE V AV VNPS R QDISG Y I AWT FDFPGR N
151 200
SEQID No 1 (151) YSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTEGNYDYLLM
SEQID No 14 (150) YSDFKWRWFHFNQVVDWQRYQENHLFRFANTN--WNWRVDEENGNYDYLL
Consensus (151) YS FKWRWFH FVDWD IFKF W W VD ENGNYYDYLL
201 250
SEQID No 1 (201) YADLDMDHPEVVTTELKNWGKQVNTNIDGFRRLDAVKHKIFSFPPDWLSY
SEQID No 14 (198) GSNIDFSHPEVQEELKDWGSWFTDELDDLGYRLDAIKHIFPFWYTSDWVRH
Consensus (201) A ID HPEV ELK WG WF IDGFRRLDAIKHI F F DWL H
251 300
SEQID No 1 (251) VRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKIFYTASK
SEQID No 14 (248) QRSEADQDLFVVEYWKDDVGALEFYLDENWEMSLFDVPLNYPYRASK
Consensus (251) RS LF VGEYW DI L YI N MSLFD PL FY ASK
301 350
SEQID No 1 (301) SGGAFDMRMLTNTLTKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKPLA
SEQID No 14 (298) QGGSYDMRNILRGLVBAHPHIAVTFVDNHDTPGESLESWVADWFKPLA
Consensus (301) GGAFDMR IL SLM P AVTFVDNHDTPG AL SWV WFKPLA
351 400
SEQID No 1 (351) YAFILTRQEGYPCVYFYGDYYGIPQYNIPSLKSKIDPLLIARRDYAYGTQH
SEQID No 14 (348) YATILTRGGYPNVFYGDYYGIPNDNISAKKDMIDELLDARQNYAYGTQH
Consensus (351) YA ILTR GYP VFYGDYYGIPN NI A K ID LL AR YAYGTQH
401 450
SEQID No 1 (401) DYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVQKQHAGKVY
SEQID No 14 (398) DYFDHWDIVGWTREGTSSRPNSGLATIMSNPGGSKWMYVQKQHAGQWT
Consensus (401) DY DH DIIGWTREG S KP SGLA IIS GPGGSKWMYVQ QHAG F
451 500
SEQID No 1 (451) DLTGNRSDTVTINS DGWGEFKVNGGSVSVVWPRKTTVSTIARPIITRPPWT
SEQID No 14 (448) DLTGNHAASVTINDGWGEFFTNGGSVSVVWVQ-----
Consensus (451) DLTGN A SVTIN DGWGEF NGSVSVVW
501 515
SEQID No 1 (501) GEFVRWTEPRLVAVP
SEQID No 14 (481) -----
Consensus (501)

```

Figura 4H

		1		50
SEQID No 1	(1)	AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT		
SEQID No 15	(1)	AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT		
Consensus	(1)	AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT		
		51		100
SEQID No 1	(51)	SRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTKAQYLQAIQAAHAAGMQVYA		
SEQID No 15	(51)	SRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTKAQYLQAIQAAHAAGMQVYA		
Consensus	(51)	SRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTKAQYLQAIQAAHAAGMQVYA		
		101		150
SEQID No 1	(101)	DVVFDHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGNT		
SEQID No 15	(101)	DVVFDHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGNT		
Consensus	(101)	DVVFDHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGNT		
		151		200
SEQID No 1	(151)	YSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTEGNYDYLM		
SEQID No 15	(151)	YSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFR--GKAWDWEVDTEFGNYDYLM		
Consensus	(151)	YSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFR GKAWDWEVDE GNYDYLM		
		201		250
SEQID No 1	(201)	YADLDMDHPEVVTELNKNGKQVNTTNIDGFRDLAVKHKFSFFPDWLSY		
SEQID No 15	(199)	YADLDMDHPEVVTELNKNGKQVNTTNIDGFRDLAVKHKFSFFPDWLSY		
Consensus	(201)	YADLDMDHPEVVTELNKNGKQVNTTNIDGFRDLAVKHKFSFFPDWLSY		
		251		300
SEQID No 1	(251)	VRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFTASK		
SEQID No 15	(249)	VRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFTASK		
Consensus	(251)	VRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFTASK		
		301		350
SEQID No 1	(301)	SGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKPLA		
SEQID No 15	(299)	SGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKPLA		
Consensus	(301)	SGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKPLA		
		351		400
SEQID No 1	(351)	YAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYNIPLSKSKIDPLLIARRDYAYGTQH		
SEQID No 15	(349)	YAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYNIPLSKSKIDPLLIARRDYAYGTQH		
Consensus	(351)	YAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYNIPLSKSKIDPLLIARRDYAYGTQH		
		401		450
SEQID No 1	(401)	DYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWYVVGKQHAGKVFY		
SEQID No 15	(399)	DYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWYVVGKQHAGKVFY		
Consensus	(401)	DYLDHSDIIGWTRREG VTEKPGSGLAALITDGPGGSKWYVVGKQHAGKVFY		
		451		500
SEQID No 1	(451)	DLTGNRSDTVTINSDGWGEFKNVNGGSVSVVWVPRKTTVSTIARPIITRPWT		
SEQID No 15	(449)	DLTGNRSDTVTINSDGWGEFKNVNGGSVSVVWVPRKTTVS-----		
Consensus	(451)	DLTGNRSDTVTINSDGWGEFKNVNGGSVSVVWVPRKTTVS		
		501	515	
SEQID No 1	(501)	GEFVRWTEPRLVAWP		
SEQID No 15	(487)	-----		
Consensus	(501)			

Figura 4I

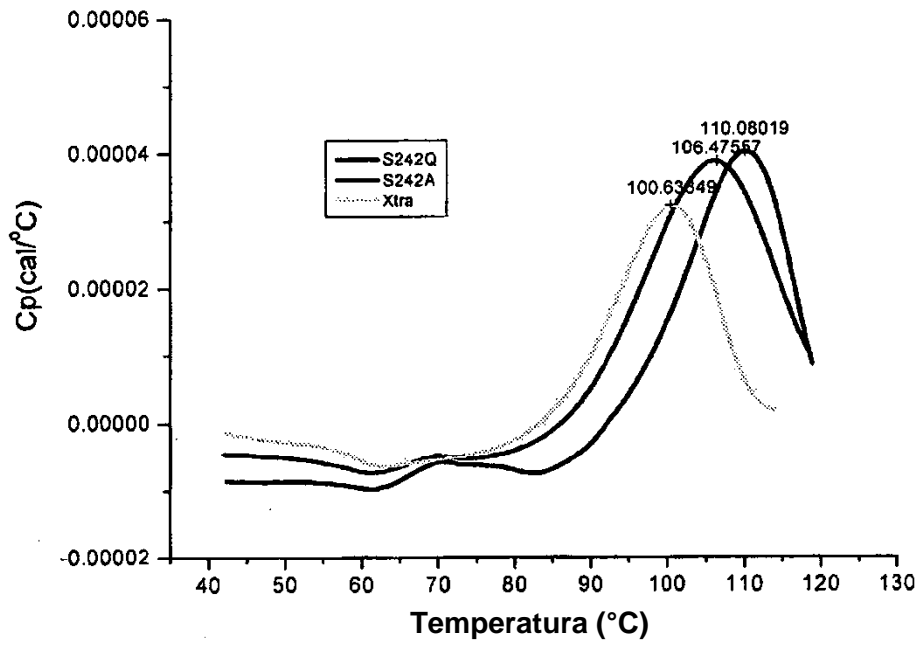


Figura 5

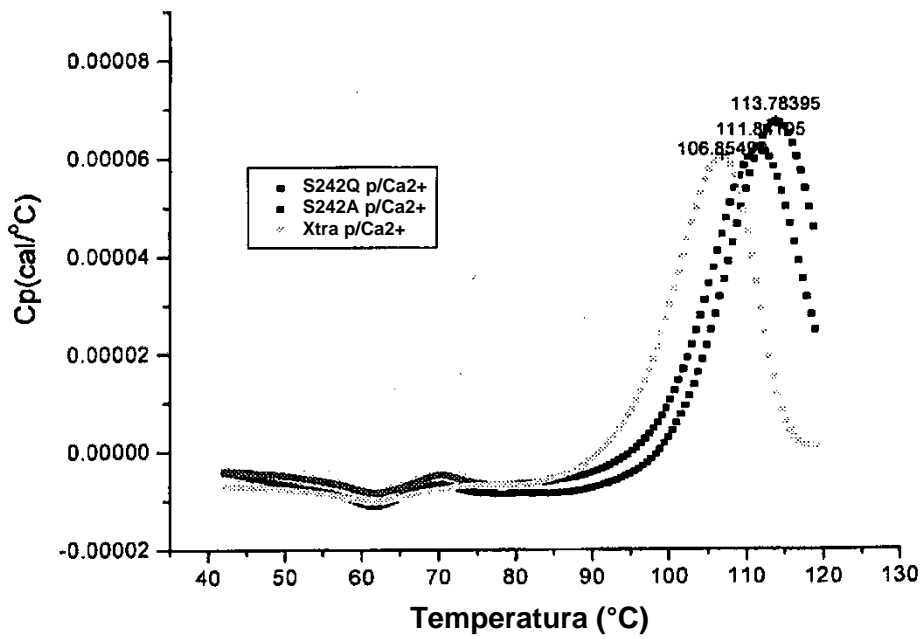


Figura 6

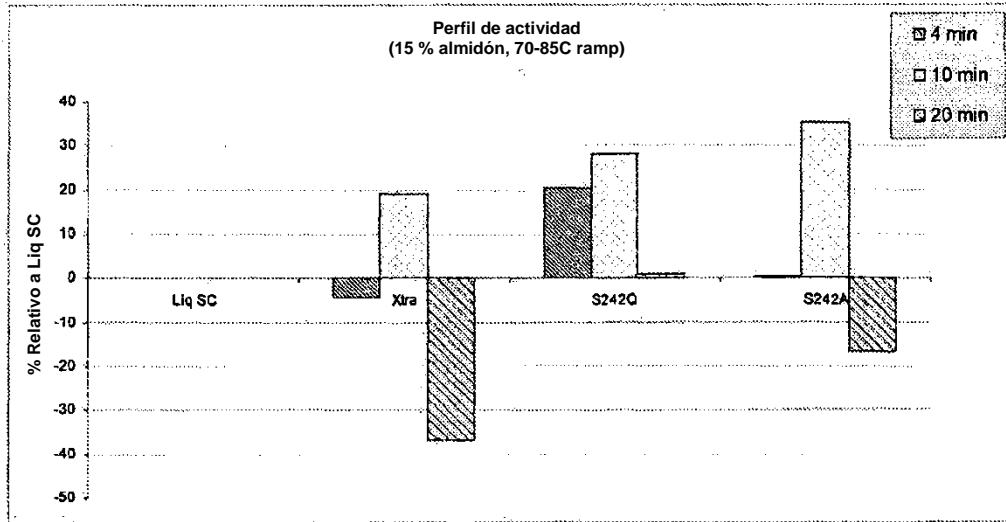


Figura 7

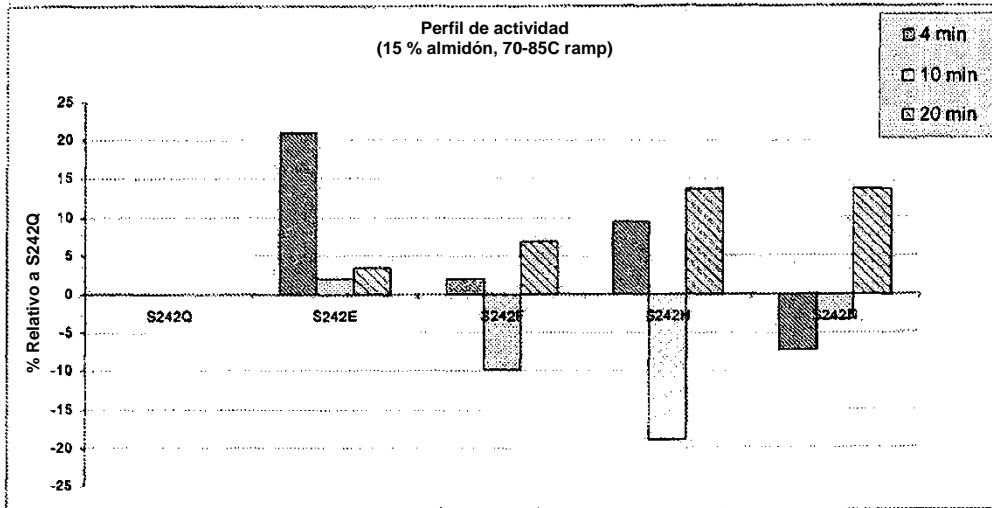


Figura 8

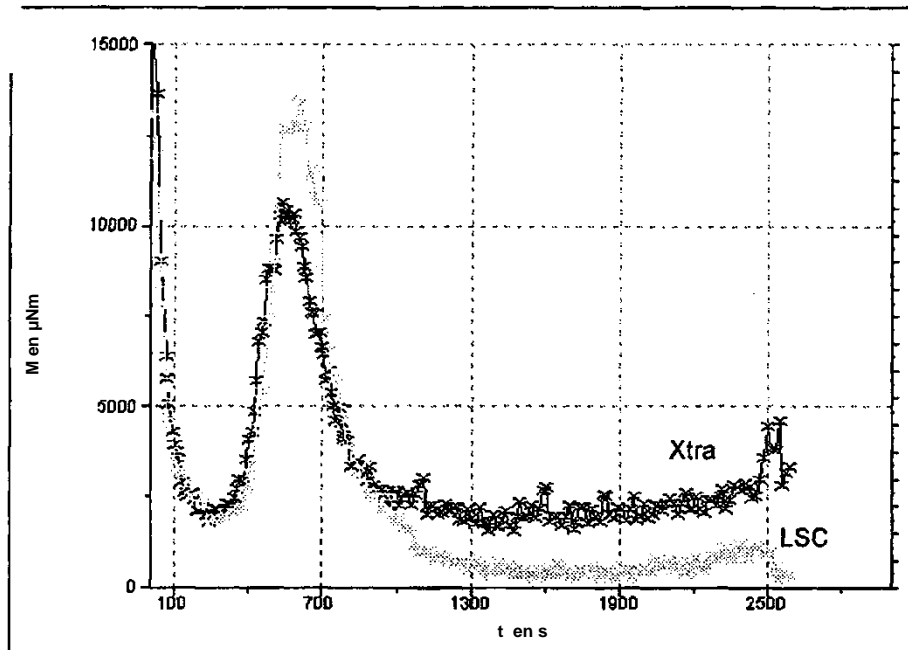


Figura 9

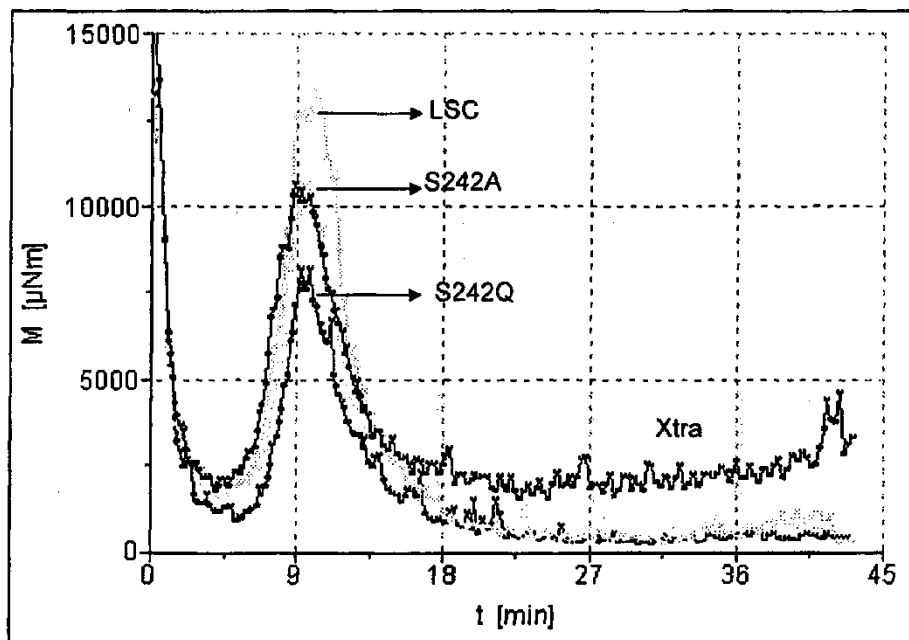


Figura 10

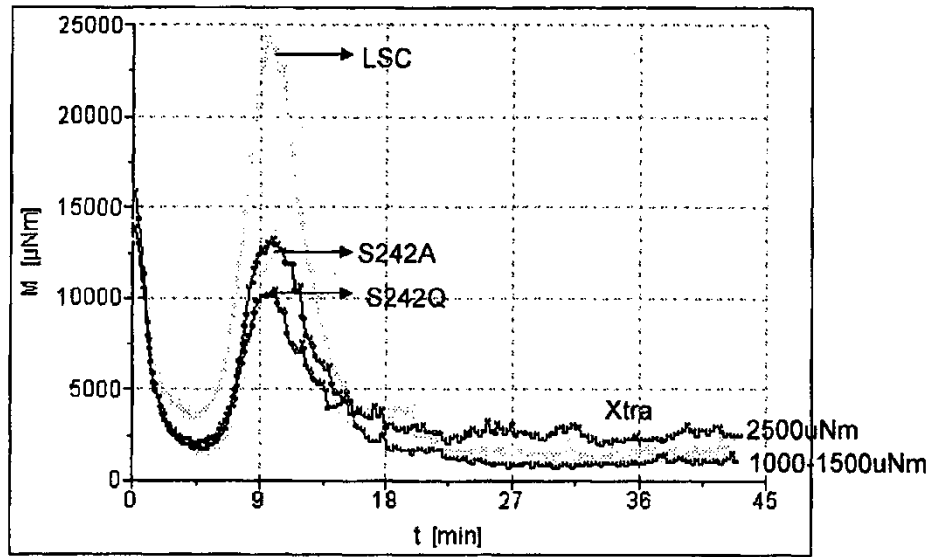


Figura 11

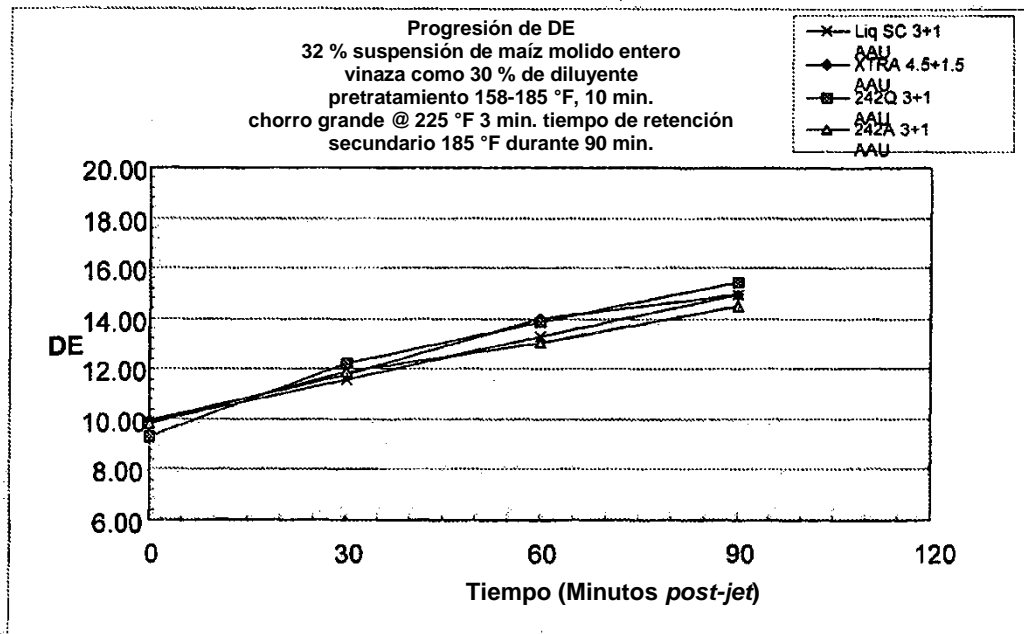


Figura 12

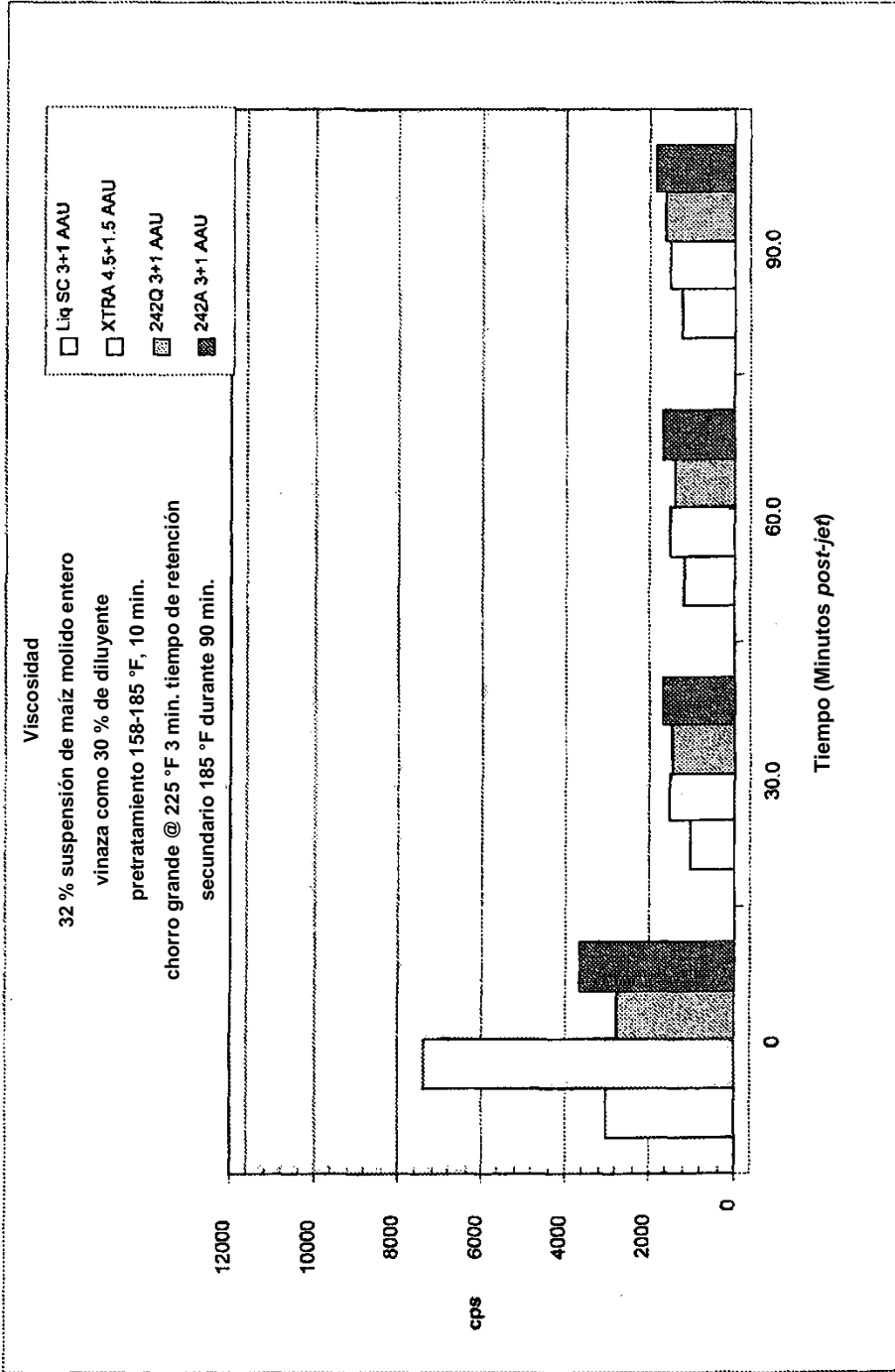


Figura 13

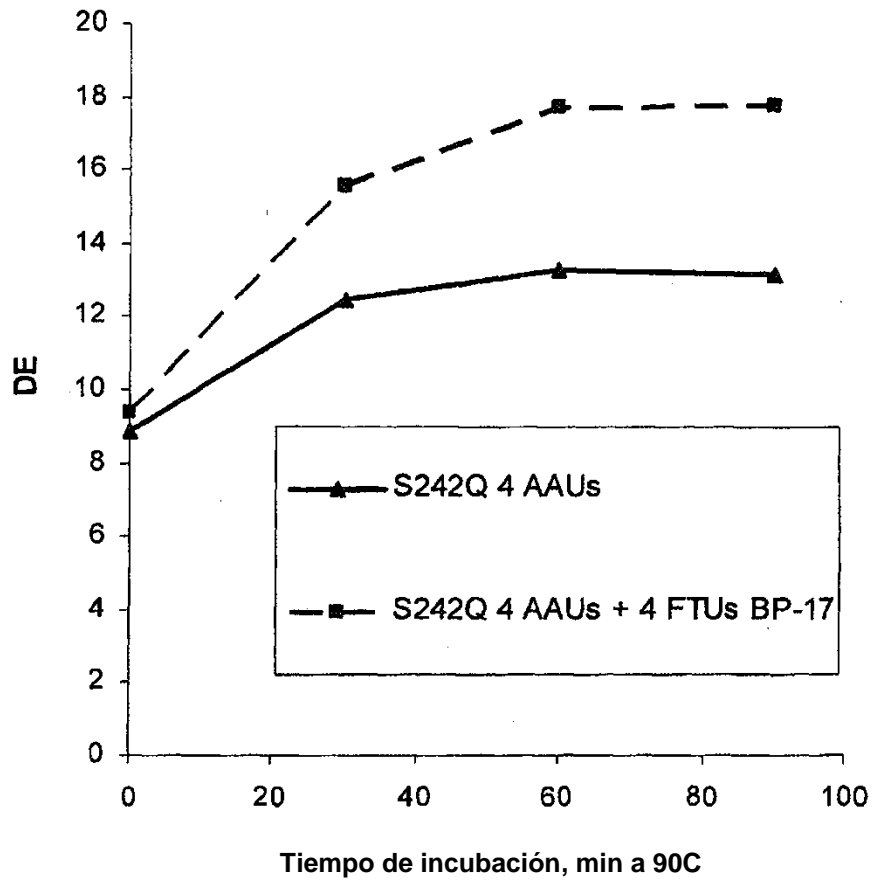


Figura 14

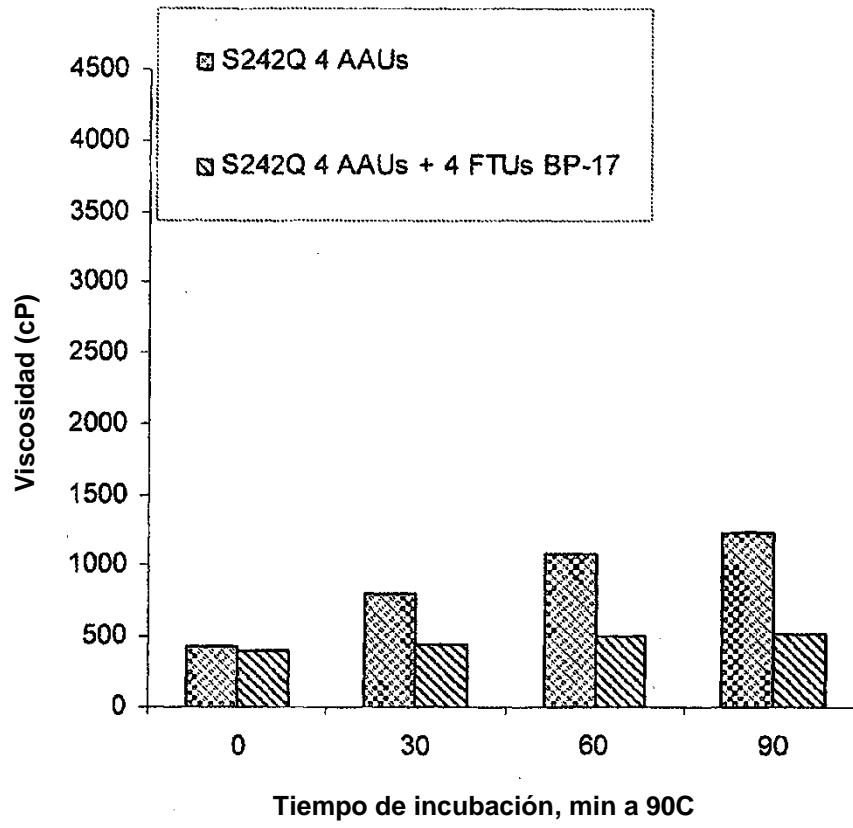


Figura 15

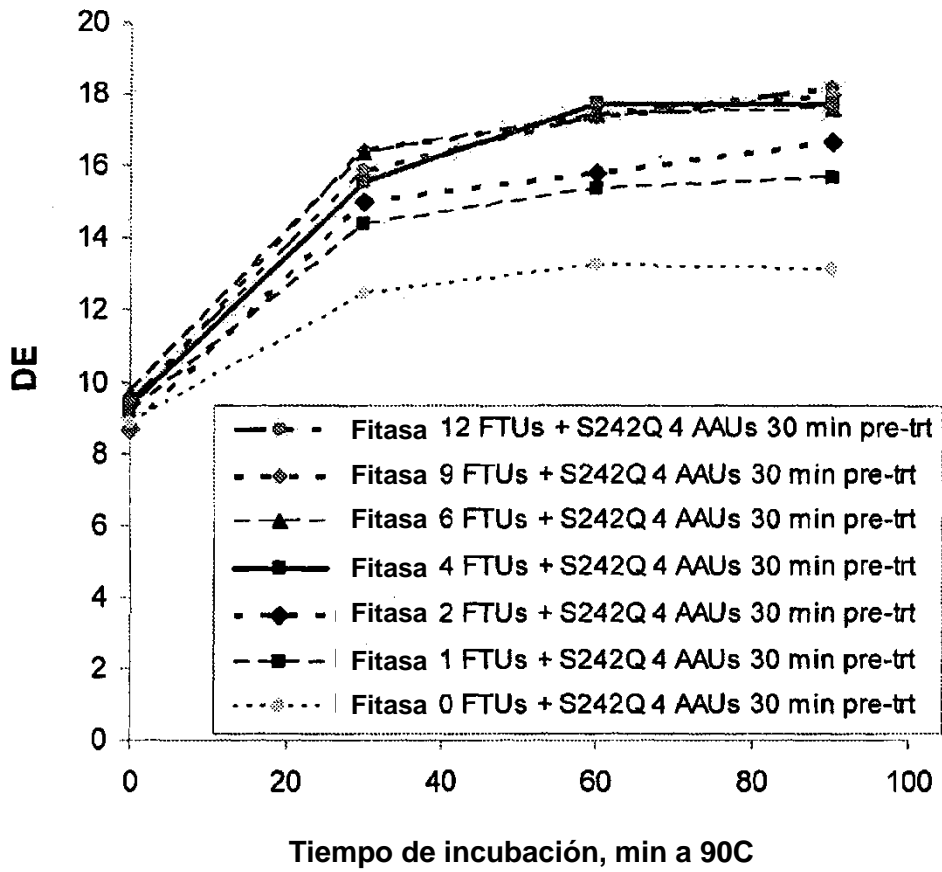


Figura 16

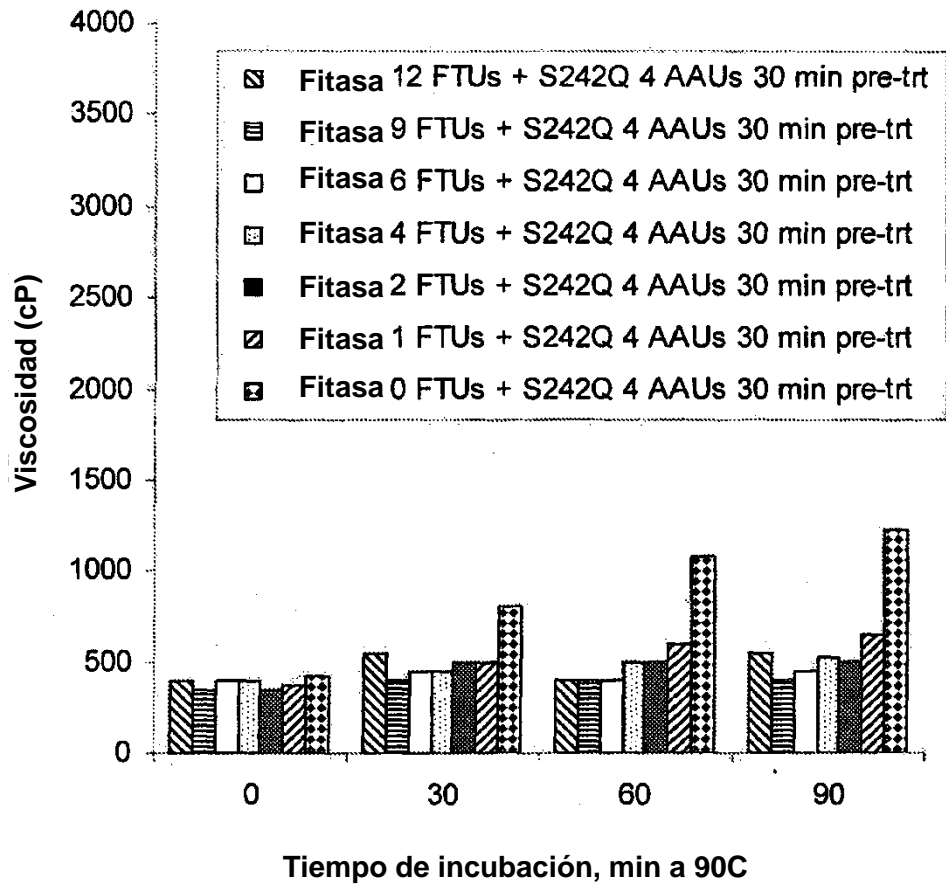


Figura 17

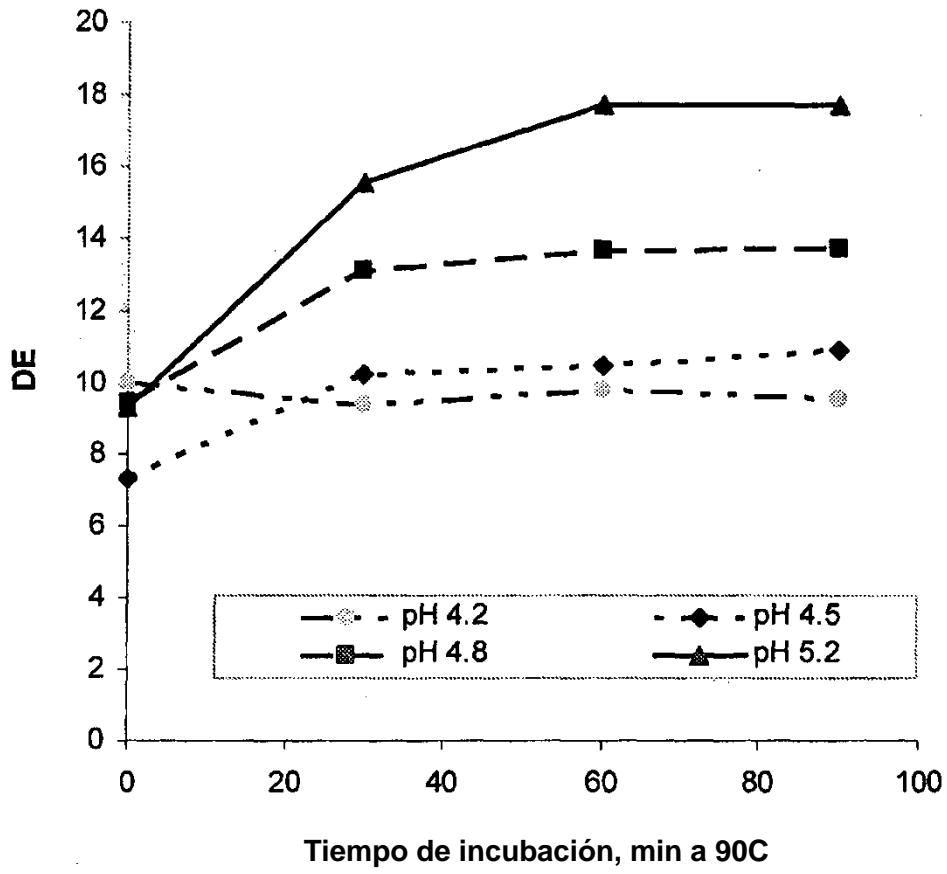


Figura 18

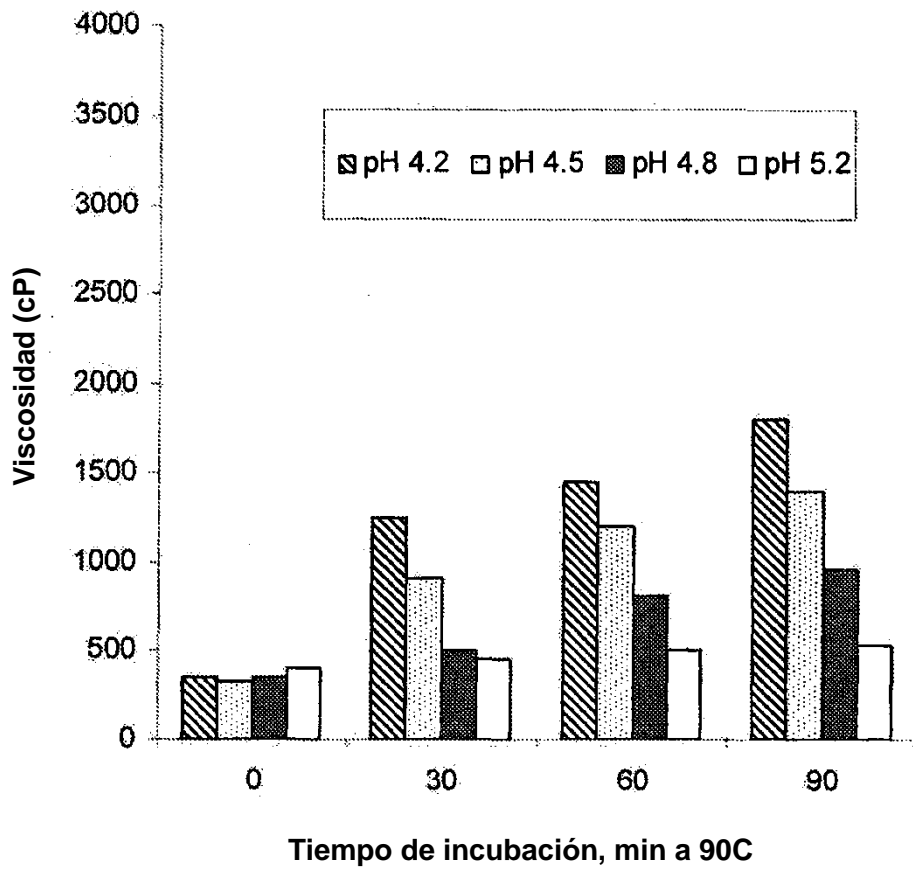


Figura 19

Condiciones de licuefacción	Producción de alcohol Galón/Bushel	DDGS, % ds			
		almidón	Ácido fítico	% IP 6	Sin fosfato Sulfato
Proceso convencional - pH 5.8 (Licuado A)	2,70	7,25	0,6	100	1,20 1,92 mg/gds
Sin proceso de ajuste de pH, pH 5.2 3+1 AAU (dosis fraccionada), 4 FTU BP-17, con jet cooking, 225 °F (Licuado B)	2,69	9,28	0,2	0	1,33 0,23 mg/gds

Figura 20

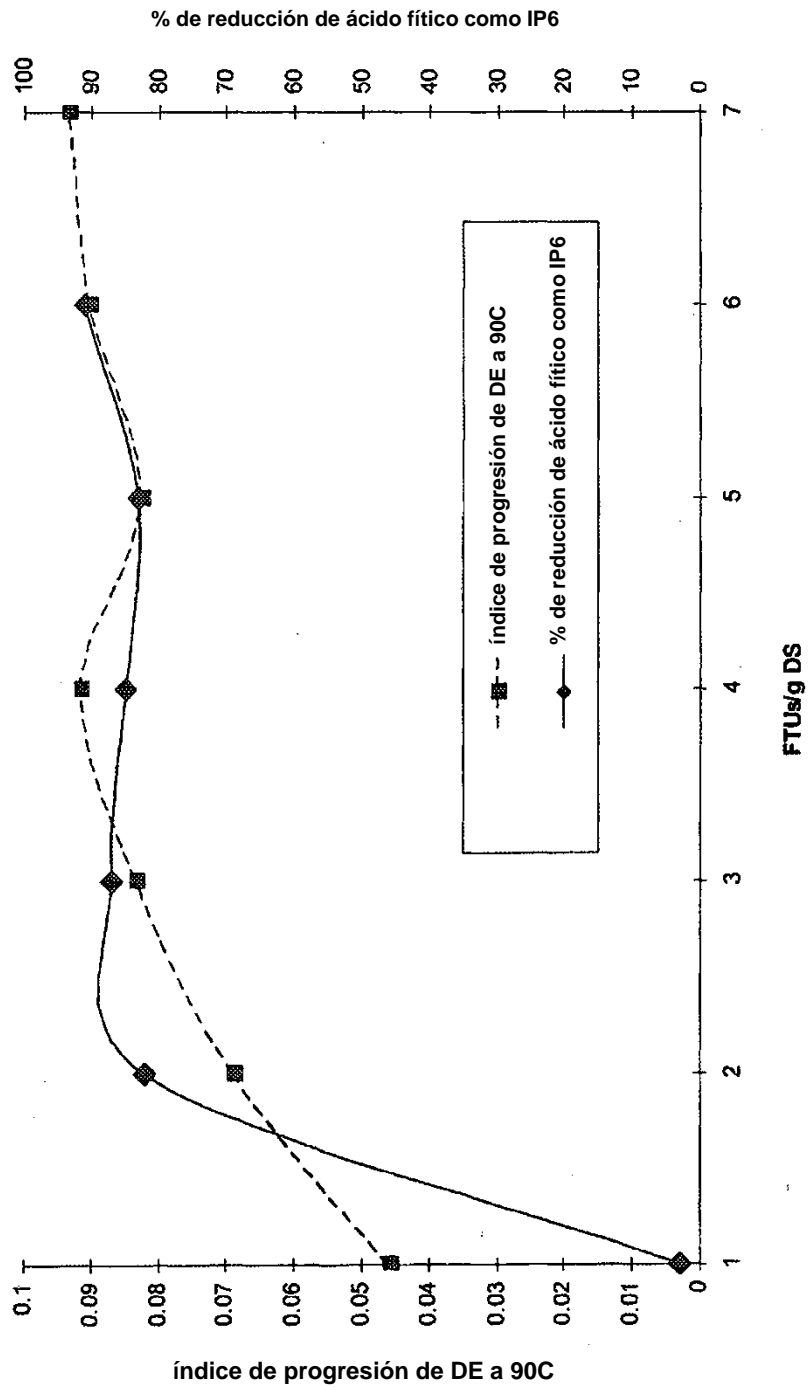


Figura 21

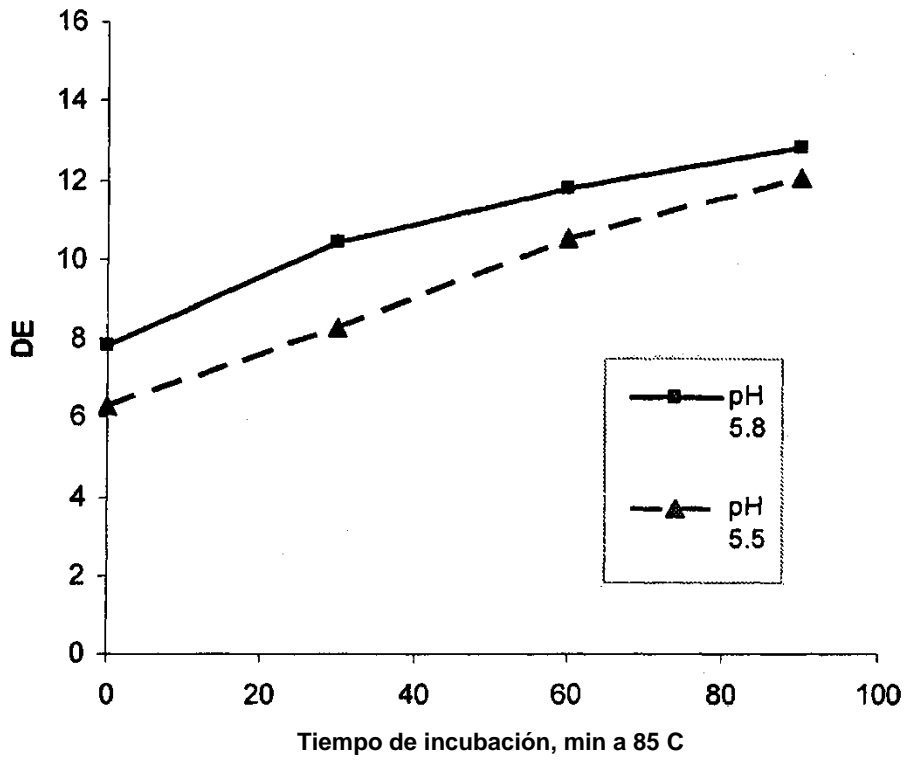


Figura 22

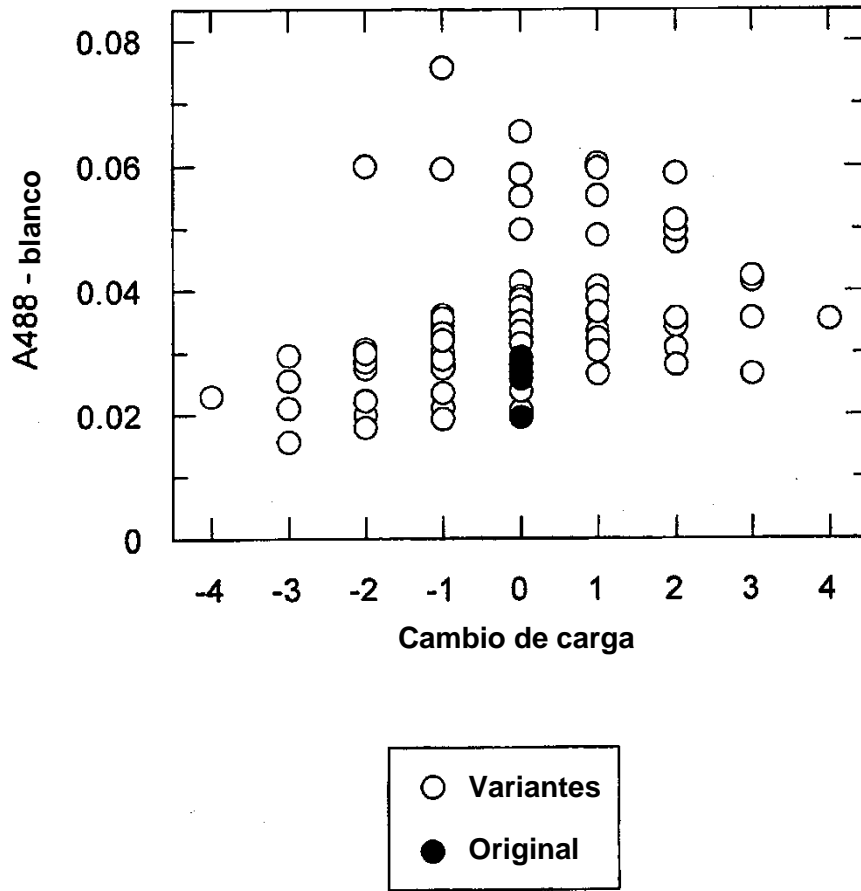


Figura 23

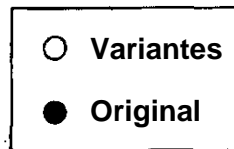
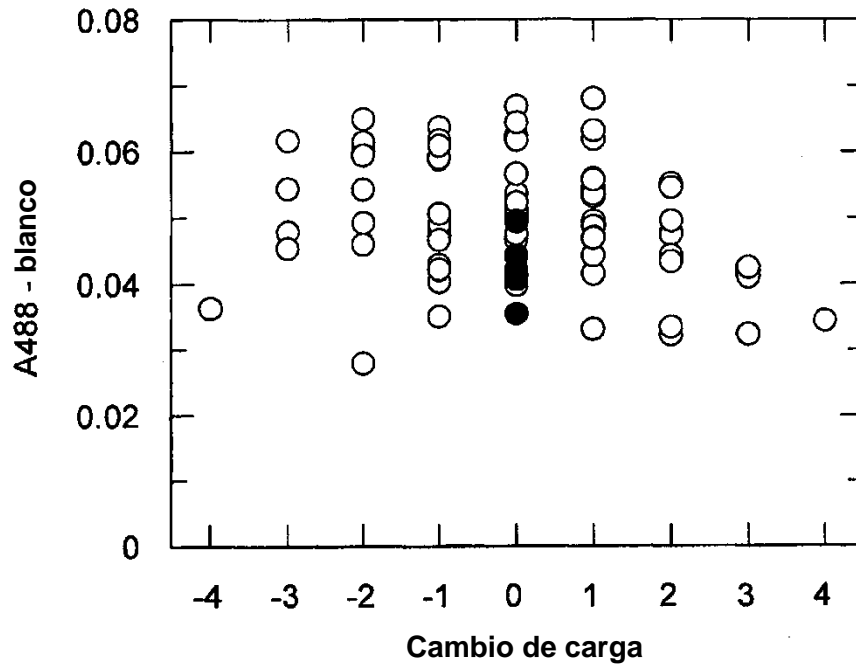


Figura 24

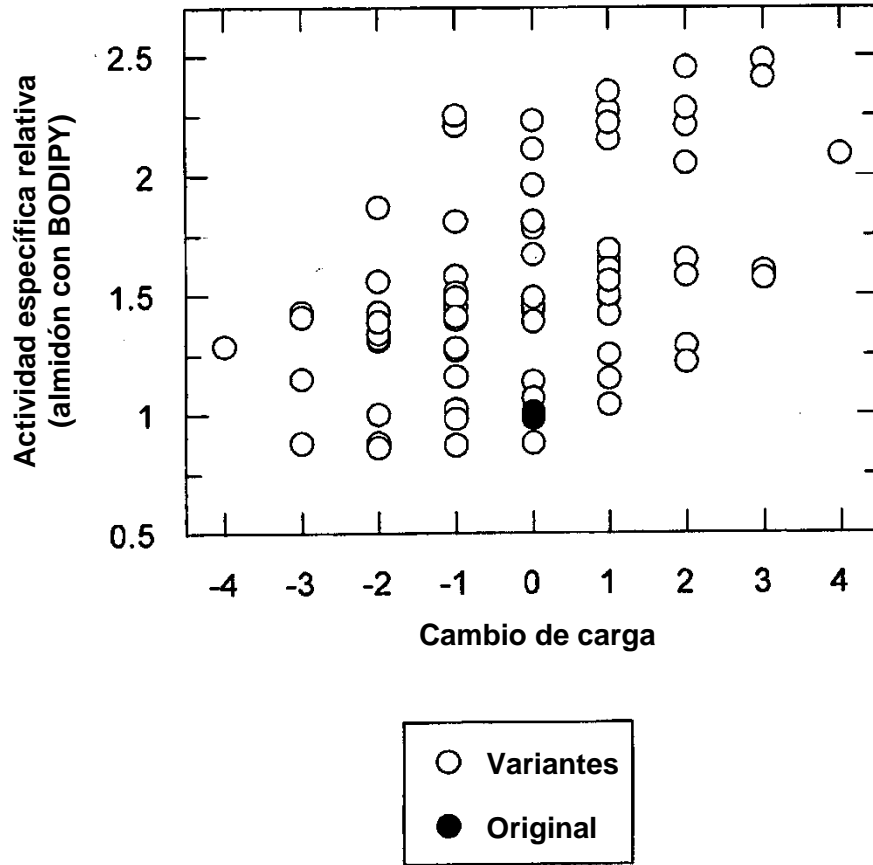
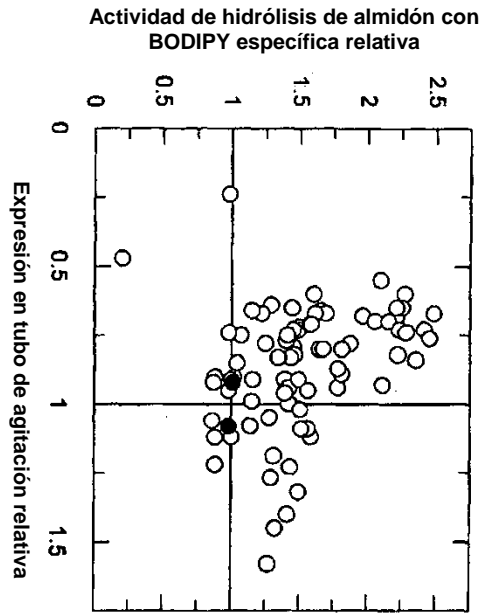


Figura 25

A



B

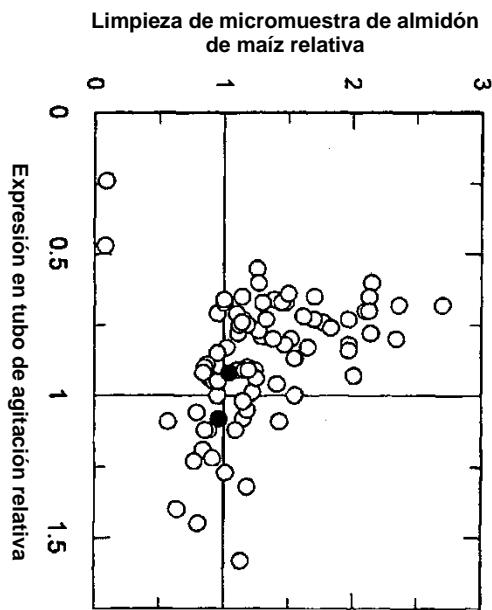


Figura 26

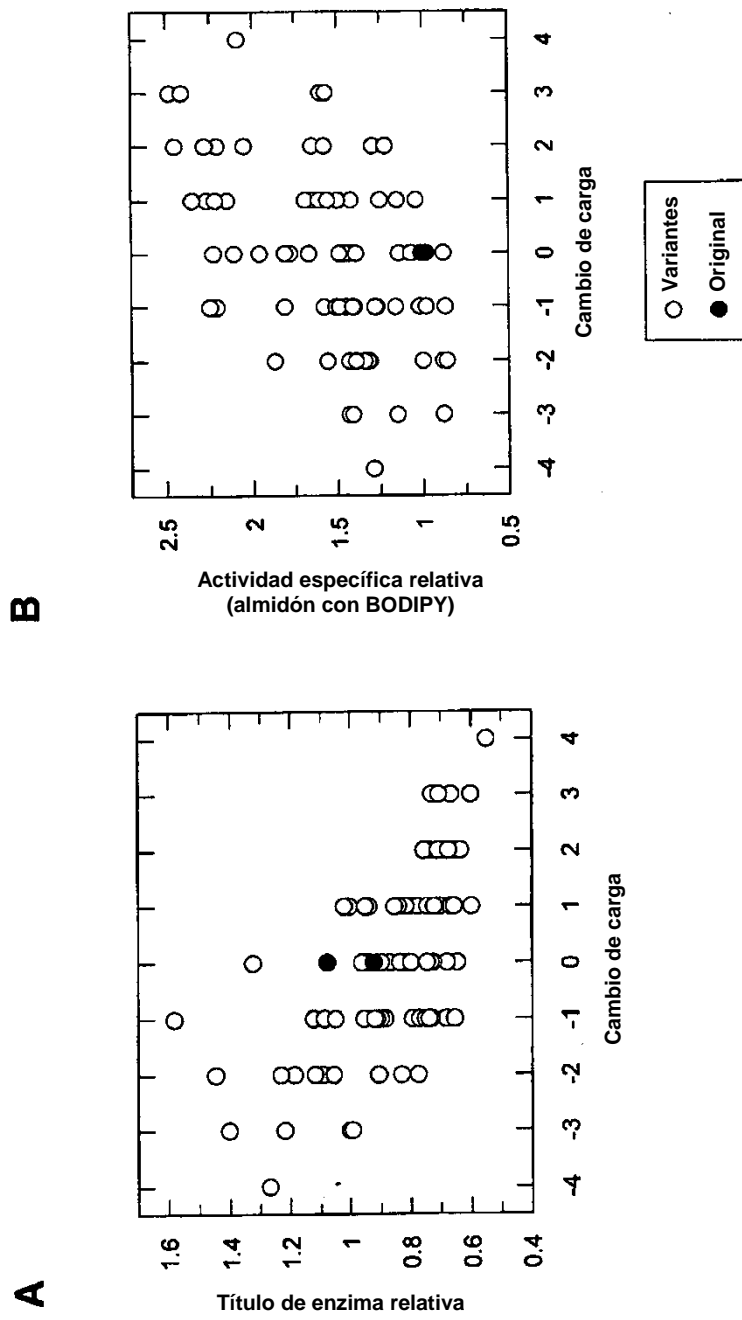


Figura 27

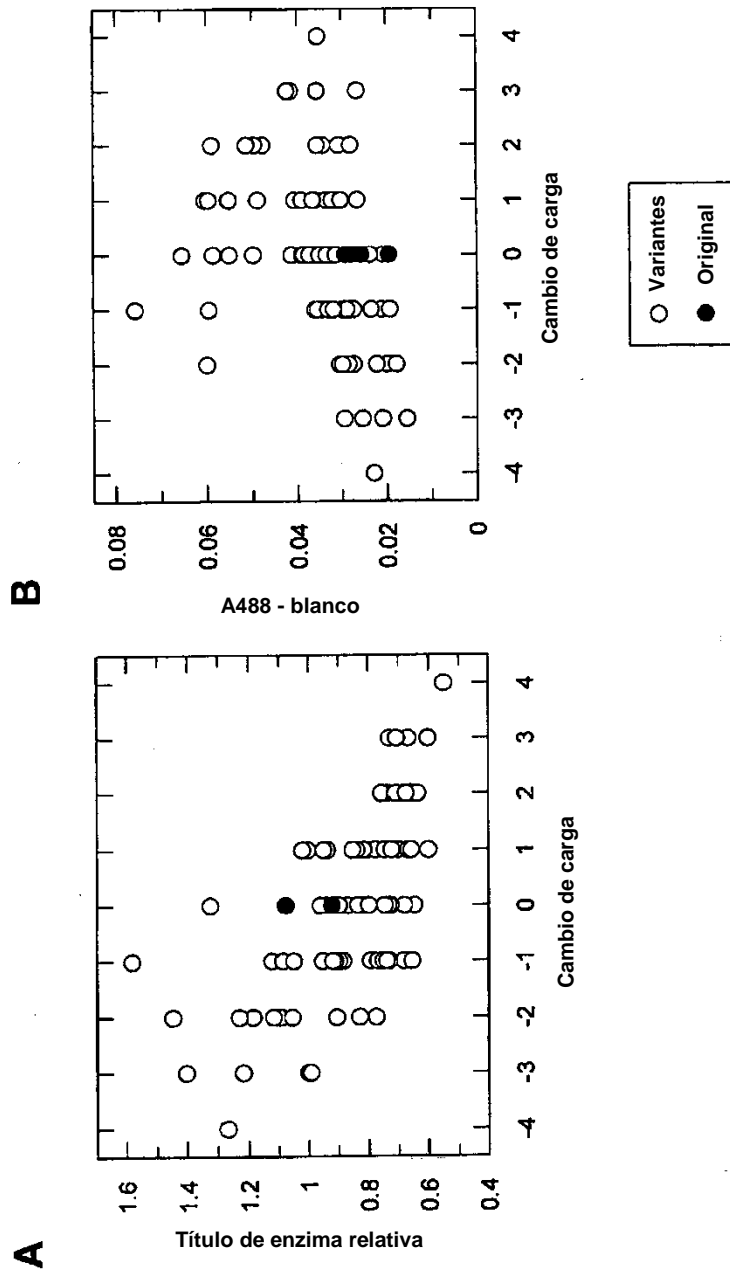


Figura 28

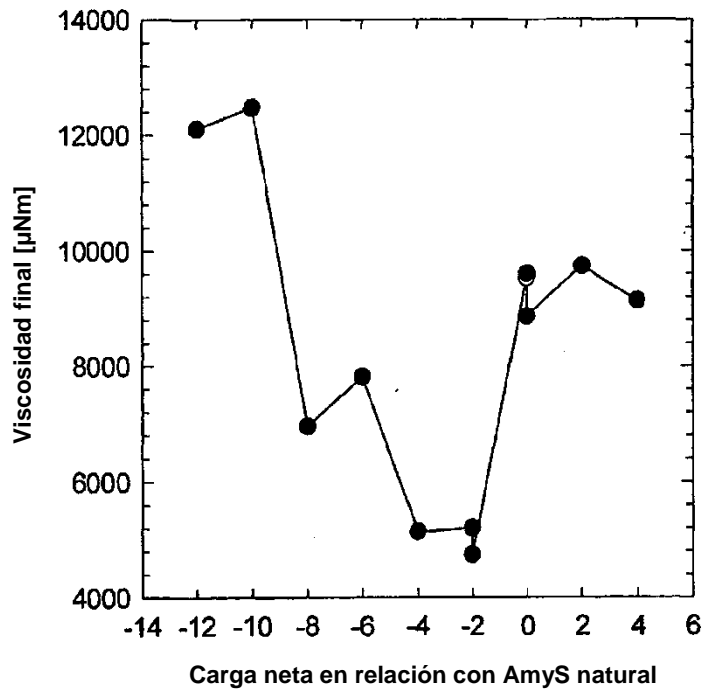


Figura 29

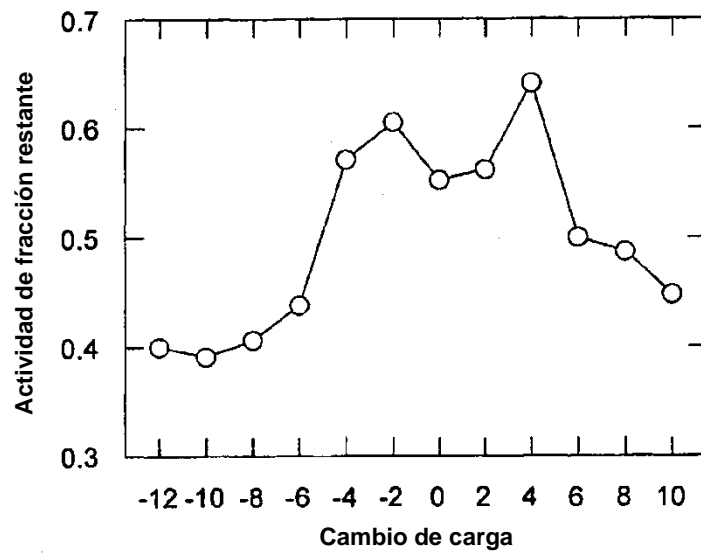


Figura 30

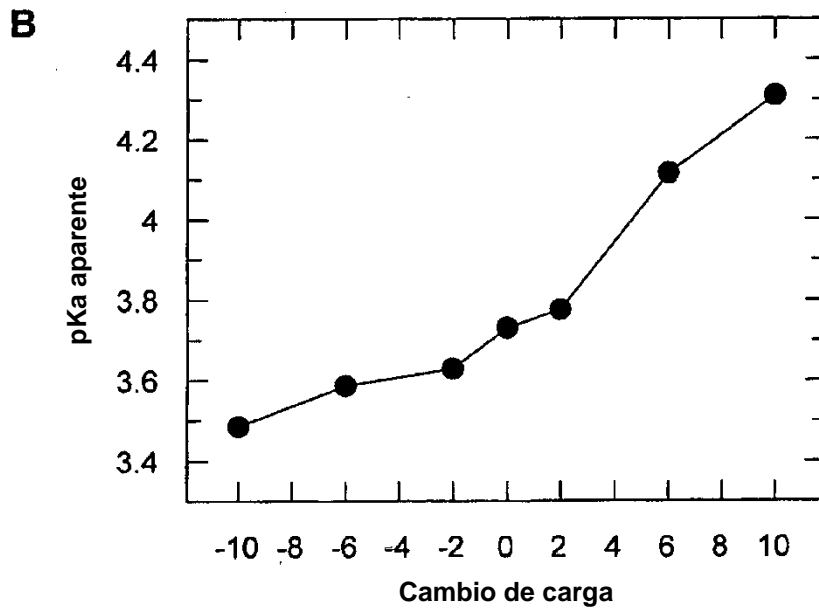
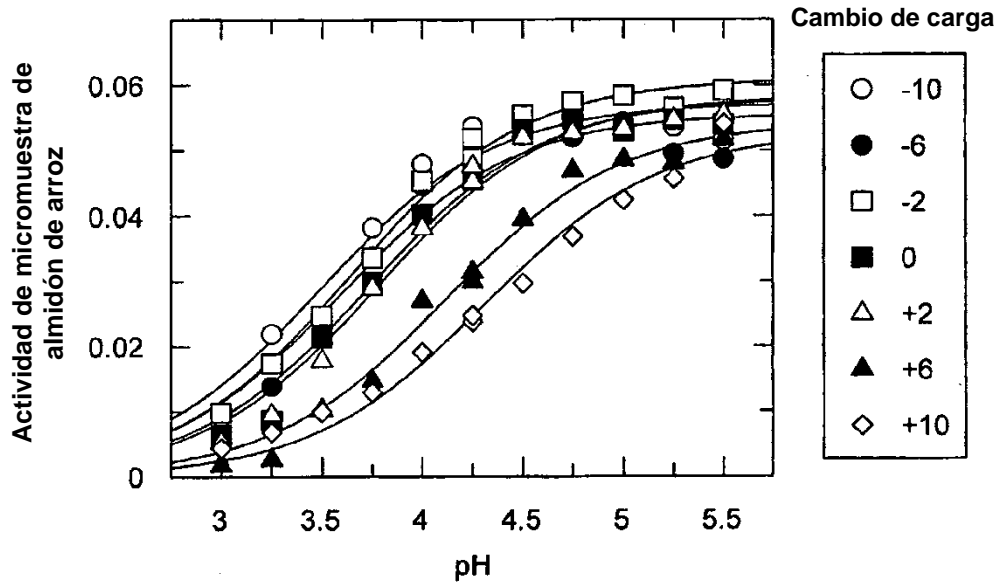


Figura 31

A

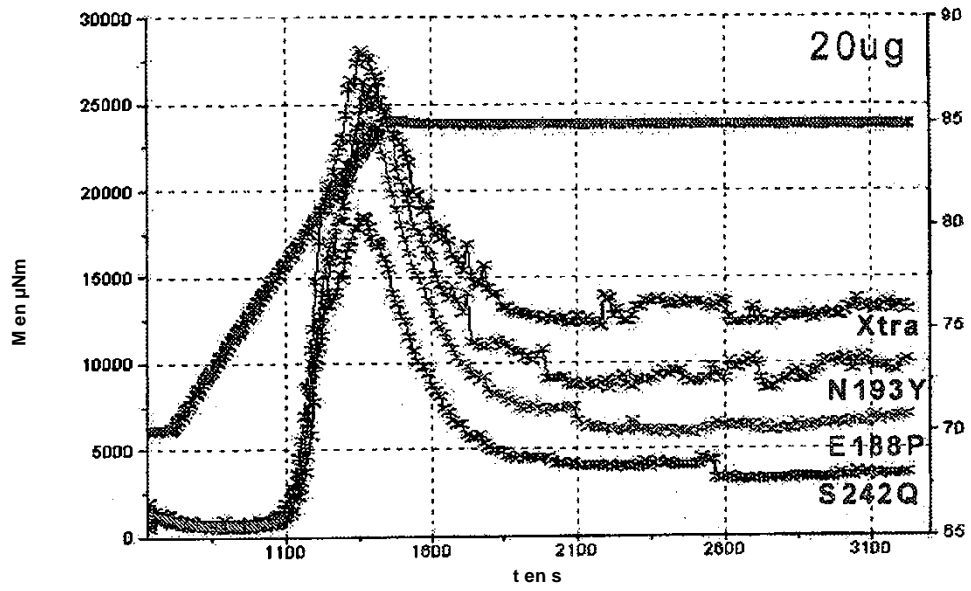
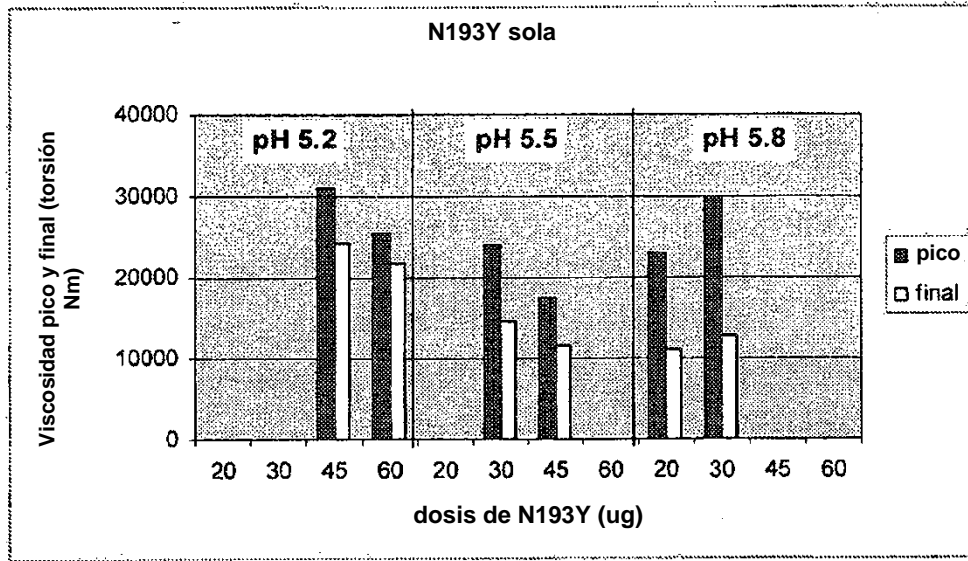


Figura 32



C

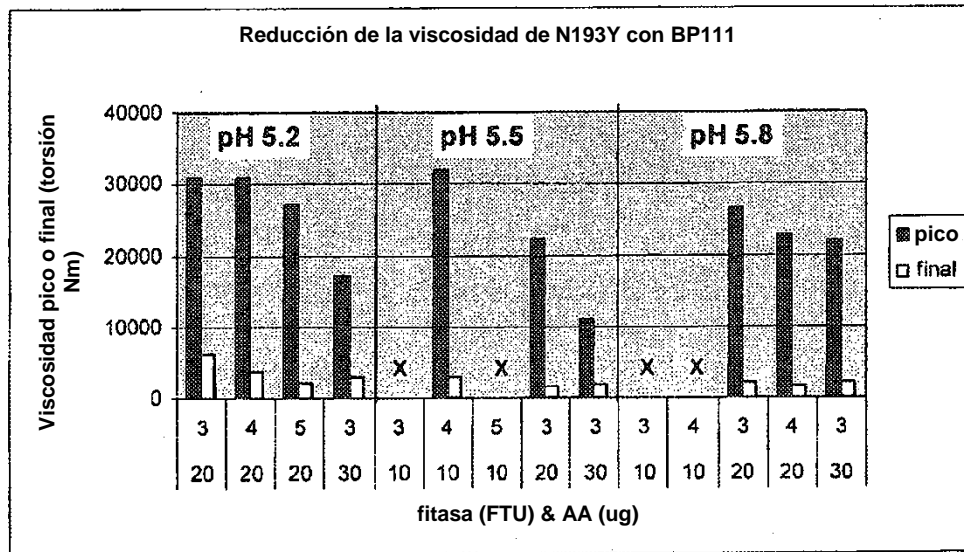


Figura 32 (cont.)