



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0309937-7 B1

(22) Data do Depósito: 14/05/2003

(45) Data de Concessão: 31/05/2016



(54) Título: VARIANTE DE UMA ENZIMA PRECURSORA, CÉLULA HOSPEDEIRA MICROBIANA, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA VARIANTE DA PECTATO LIASE, MÉTODO PARA MELHORAR A ESTABILIDADE EM DETERGENTE DE UMA PECTATO LIASE, COMPOSIÇÃO DE LIMPEZA OU DETERGENTE, USO DE UMA PECTATO LIASE VARIANTE, MÉTODO DE LIMPEZA POR ESFREGAMENTO ENZIMÁTICO, E, MÉTODO PARA A REMOÇÃO ENZIMÁTICA DO MATERIAL DA PAREDE CELULAR DE TECIDO

(51) Int.Cl.: C12N 9/88; C12N 15/60; C12N 1/21; C12N 1/15; C11D 3/386; C12P 19/00

(30) Prioridade Unionista: 14/05/2002 DK PA 2002 00746

(73) Titular(es): NOVOZYMES A/S

(72) Inventor(es): THOMAS THISTED, SANNE SCHRODER GLAD, CARSTEN ANDERSEN, TORBEN VEDEL BORCHERT, KATJA SALOMOM JOHANSEN, HENRIK FRISNER, MAD S ESKELUND BJORN VAD

“VARIANTE DE UMA ENZIMA PRECURSORA, CÉLULA HOSPEDEIRA MICROBIANA, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA VARIANTE DA PECTATO LIASE, MÉTODO PARA MELHORAR A ESTABILIDADE EM DETERGENTE DE UMA PECTATO LIASE, COMPOSIÇÃO DE LIMPEZA OU DETERGENTE, USO DE UMA PECTATO LIASE VARIANTE, MÉTODO DE LIMPEZA POR ESFREGAMENTO ENZIMÁTICO, E, MÉTODO PARA A REMOÇÃO ENZIMÁTICA DO MATERIAL DA PAREDE CELULAR DE TECIDO”

CAMPO TÉCNICO

A presente invenção diz respeito às variantes da pectato liase que exibem alterações relativas a uma enzima precursora que exibe a atividade de pectato liase como sua atividade enzimática principal; a um método de produzir tais enzimas; e aos métodos para usar tais enzimas nas indústrias que processam tecido, detergente e fibra de celulose. Comparados à enzima precursora, as variantes da pectato liase da presente invenção podem exibir estabilidade melhorada nos detergentes.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os polímeros de pectina são constituintes importantes das paredes celulares vegetais. A pectina é um heteropolissacarídeo com um suporte principal composto de homogalacturonano alternado (regiões lisas) e ramnogalacturonano (regiões pilosas). As regiões lisas são polímeros lineares de ácido alfa-D-galacturônico ligado na posição 1,4. Os resíduos de ácido galacturônico podem ser esterificados com metila no grupo carboxila a um grau variado, usualmente em uma forma não-aleatória com os blocos de ácido poligalacturônico sendo completamente esterificados com metila.

As enzimas pectolíticas (pectinases) podem ser classificadas de acordo com seu substrato preferencial, pectina altamente esterificada com metila ou pectina fracamente esterificada com metila e ácido

poligalacturônico (pectato), e seu mecanismo de reação, beta-eliminação ou hidrólise. As pectinases podem ser principalmente endo-atuantes, cortando o polímero nas posições aleatórias dentro da cadeia para fornecer uma mistura de oligômeros, ou elas podem ser exo-atuantes, atacando a partir de uma
5 extremidade do polímero e produzindo monômeros ou dímeros. Várias atividades da pectinase que age nas regiões lisas da pectina são incluídas na classificação das enzimas fornecidas pela Enzyme Nomenclature (1992) tal como pectato liase (EC 4.2.2.2), pectina liase (EC 4.2.2.10), poligalacturonase (EC 3.2.1.15), exo-poligalacturonase (EC 3.2.1.67), exo-poligalacturonato
10 liase (EC 4.2.2.9) e exo-poli-alfa-galacturonosidase (EC 3.2.1.82).

As pectato liases foram clonadas a partir de gêneros bacterianos diferentes tais como *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Xanthomonas*. Também a partir de *Bacillus subtilis* (Nasser *et al.* (1993) FEBS 335: 319 a 326) e *Bacillus sp.* A clonagem YA-14 (Kim *et al.* (1994) Biosci. Biotech. Biochem. 58: 947 a 949) de uma pectato liase foi descrita.
15

As pectato liases no geral são caracterizadas por um pH alcalino ótimo e uma exigência absoluta para os cátions bivalentes, o Ca^{2+} sendo o mais estimulador.

É um objetivo da presente invenção fornecer uma variante de
20 enzima que degrada a parede celular, especialmente uma variante da enzima pectato liase, que exhibe desempenho melhorado sobre a pectato liase precursora quando aplicado por exemplo, nos detergentes ou nos processos da indústria têxtil.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

25 Os inventores descobriram agora que certas substituições de aminoácido nas enzimas que degradam a parede celular especialmente as pectato liases tendo uma estrutura incluindo uma beta-hélice resulta nas variantes de enzima tendo desempenho melhorado na faixa de pH neutro ou alcalino comparado à enzima precursora. As variantes da pectato liase da

invenção, quando usados nas composições detergentes, têm estabilidade de conservação melhorada isto é, sensibilidade mais baixa aos detergentes.

Assim, em um primeiro aspecto a presente invenção diz respeito a uma variante da pectato liase compreendendo as alterações em uma ou mais posições seleccionadas do grupo que consiste das posições número:

5 5, 9, 11, 26, 28, 30, 31, 37, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 61, 64, 68, 69, 70, 71, 74, 75, 76, 79, 86, 87, 91, 99, 105, 106, 107, 111, 115, 116, 118, 122, 123, 134, 136, 139, 140, 141, 146, 148, 156, 158, 170, 182, 185, 186, 189, 193, 194, 196, 199, 201, 202, 204, 213, 215, 218, 224, 10 228, 229, 234, 235, 237, 251, 256, 257, 258, 272, 277, 286, 295, 298, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 314, 316, 323, 324, 326, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 349, 356, 357, 363, 366, 378, 381, 384, 386, 387, 389, 390, 391, 393 e 397,

em que a(s) alteração(ões) são independentemente

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

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

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

20 e em que cada posição corresponde a uma posição da sequência de aminoácidos da pectato liase tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, e em que a enzima precursora é a pectato liase apresentada na SEQ ID NO: 2 ou uma pectato liase tendo pelo menos 65% de identidade com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2.

25 Em um segundo aspecto a presente invenção diz respeito a uma sequência de ácido nucléico que codifica a variante da pectato liase.

Em um terceiro aspecto da invenção é fornecido um vetor de expressão.

Em um quarto aspecto da presente invenção é fornecido uma

célula hospedeira microbiana transformada com o vetor de expressão acima mencionado.

Em um quinto aspecto da presente invenção é fornecido um método para melhorar a estabilidade em detergente de uma pectato liase, compreendendo alterar um ou mais aminoácidos.

Em um sexto aspecto da invenção são fornecidos os métodos para produzir uma variante da pectato liase de acordo com a invenção compreendendo cultivar uma célula na qual foi introduzido um vetor de expressão como acima divulgado, por meio do qual a dita célula expressa a variante codificada pela sequência de ácido nucléico e recuperando a variante da pectato liase.

A variante da pectato liase da invenção é útil para o tratamento do material celulósico, especialmente fibra, fio, pano tecido ou não-tecido contendo celulose, tratamento de polpas para fabricar papel mecânico ou papel refugado reciclado, e para a maceração das fibras. O tratamento pode ser realizado durante o processamento do material celulósico em um material pronto para a fabricação de artigo de vestuário ou fabricação de tecido, por exemplo, na etapa de desencolamento ou limpeza por esfregamento; ou durante a lavagem de roupa industrial ou doméstica de tal tecido ou artigo de vestuário.

Consequentemente, em outros aspectos, a presente invenção diz respeito a uma composição detergente compreendendo uma variante da pectato liase tendo atividade degradante da parede celular substancial; e ao uso da variante da pectato liase da invenção para o tratamento por exemplo, limpeza das fibras, fio, pano tecido ou não-tecido que contêm celulose.

Além disso, os aspectos adicionais da invenção dizem respeito a uma composição enzimática compreendendo a variante da pectato liase da invenção em combinação com outras enzimas, e a uma composição de limpeza ou detergente, preferivelmente uma composição de lavar roupa ou

lavar louça, compreendendo a variante da pectato liase da invenção.

A variante da pectato liase da invenção é muito eficaz para o uso em um processo de limpeza por esfregamento enzimática na preparação do material celulósico por exemplo, para a resposta própria nas operações de tingir subsequentes.

Um outro aspecto da invenção diz respeito ao processamento de vinho e suco. A enzima ou a preparação enzimática podem ser usadas no tratamento de pasta das frutas e vegetais de modo a melhorar a extractabilidade ou degradabilidade da pasta.

Além disso, um aspecto da invenção é a aplicação como um aditivo de alimentação animal. Quando adicionado à alimentação contendo o material vegetal de soja, semente de colza, tremço etc, a variante da pectato liase melhora significativamente a decomposição *in vivo* do material da parede celular vegetal, por meio do qual uma melhor utilização dos nutrientes vegetais pelo animal é obtida.

DEFINIÇÕES

Antes de debater esta invenção em mais detalhe, os termos e convenções seguintes primeiro serão definidos.

O termo “enzima do tipo selvagem” denota uma enzima, que é endógena a um microorganismo que ocorre naturalmente tal como um fungo ou uma bactéria encontrados na natureza.

O termo “enzima precursora” como aqui usado significa uma enzima em que as modificações estão sendo feitas para produzir as variantes de enzima da invenção. Uma enzima precursora pode ser uma enzima isolada a partir de uma fonte natural, ou uma enzima em que a(s) modificação(ões) prévia(s) foram feitas enquanto mantendo a atividade característica da enzima em questão. A pectato liase precursora da invenção pode ser uma pectato liase do tipo selvagem.

O termo “variante de enzima” significa uma enzima

compreendendo as diferenças em sua sequência de aminoácidos a partir daquela da enzima precursora. As diferenças compreendem substituições, supressões e/ou inserções quando comparado à enzima precursora.

5 O termo “ortólogo” (ou “espécie homóloga”) denota um polipeptídeo ou proteína obtidos a partir de uma espécie que tem homologia a um polipeptídeo ou proteína análogos de uma espécie diferente.

O termo “parálogo” denota um polipeptídeo ou proteína obtidos a partir de uma espécie dada que tem homologia a um polipeptídeo ou proteína diferentes daquela mesma espécie.

10 O termo “vetor de expressão” denota uma molécula de DNA, linear ou circular, que compreende um segmento que codifica um polipeptídeo de interesse operavelmente ligado aos segmentos adicionais que fornecem a sua transcrição. Tais segmentos adicionais podem incluir

15 ou mais origens de duplicação, um ou mais marcadores selecionáveis, um realçador, um sinal de poliadenilação, e outros. Os vetores de expressão no geral são derivados de plasmídeo ou DNA viral, ou podem conter elementos de ambos. O vetor de expressão da invenção pode ser qualquer vetor de expressão que é convenientemente submetido aos procedimentos do DNA

20 recombinante, e a escolha do vetor freqüentemente dependerá da célula hospedeira em que o vetor deve ser introduzido. Assim, o vetor pode ser um vetor autonomamente duplicante, isto é, um vetor que existe como uma entidade extracromossômica, a duplicação do qual é independente da duplicação cromossômica, por exemplo, um plasmídeo. Alternativamente, o

25 vetor pode ser um que, quando introduzido em uma célula hospedeira, é integrado no genoma da célula hospedeira e duplicado junto com o(s) cromossomo(s) no(s) qual(is) ele foi integrado.

O termo “recombinante expressado” ou “recombinantemente expressado” aqui usado relativo à expressão de um polipeptídeo ou proteína é

definido de acordo com a definição padrão na técnica. A expressão do recombinante de uma proteína no geral é realizada usando-se um vetor de expressão como descrito imediatamente acima.

O termo “isolada”, quando aplicado a uma molécula de polinucleotídeo, denota que o polinucleotídeo foi removido de seu ambiente genético natural e assim, é isento de outras seqüências de codificação estranhas ou indesejadas, e está em uma forma adequada para o uso dentro de sistemas de produção de proteína geneticamente construídos. Tais moléculas isoladas são aquelas que são separadas de seu ambiente natural e incluem o cDNA e clones genômicos. As moléculas de DNA isoladas da presente invenção são isentas de outros genes com os quais elas são ordinariamente associadas, mas podem incluir as regiões não traduzidas 5’ e 3’ que ocorrem naturalmente tais como as promotoras e terminadoras. A identificação das regiões associadas estarão evidentes a uma pessoa de habilidade ordinária na técnica (ver por exemplo, Dynan e Tijan, Nature 316: 774 a 778, 1985). O termo “um polinucleotídeo isolado” alternativamente pode ser denominado “um polinucleotídeo clonado”.

Quando aplicado a uma proteína/polipeptídeo, o termo “isolado” indica que a proteína é encontrada em uma condição outra que não seu ambiente natural. Em uma forma preferida, a proteína isolada é substancialmente isenta de outras proteínas, particularmente outras proteínas homólogas (isto é, “impurezas homólogas” (ver abaixo)). É preferido fornecer a proteína em uma forma pura maior do que 40%, mais preferivelmente uma forma pura maior do que 60%. Ainda mais preferivelmente é preferido fornecer a proteína em uma forma altamente purificada, isto é, maior do que 80% de pureza, mais preferivelmente maior do que 95% de pureza, e ainda mais preferivelmente maior do que 99% de pureza, como determinado por SDS-PAGE.

O termo “proteína/polipeptídeo isolados” pode ser

alternativamente denominado “proteína/polipeptídeo purificados”.

O termo “impurezas homólogas” significa qualquer impureza, por exemplo, um outro polipeptídeo que não o polipeptídeo da invenção, que origina da célula homóloga onde o polipeptídeo da invenção é originalmente
5 obtido.

O termo “obtido a partir de” como aqui usado com relação a uma fonte microbiana específica, significa que o polinucleotídeo e/ou o polipeptídeo são produzidos pela fonte específica, ou por uma célula em que um gene da fonte foi inserido.

10 O termo “operavelmente ligado”, quando referindo-se os segmentos de DNA, denota que os segmentos estão arranjados de modo que eles agem de comum acordo para seus propósitos intencionados, por exemplo, a transcrição inicia no promotor e procede através do segmento de codificação ao terminador.

15 O termo “polinucleotídeo” denota um polímero de filamento único ou duplo das bases de desoxirribonucleotídeo ou ribonucleotídeo lidas da extremidade 5’ a 3’. Os polinucleotídeos incluem o RNA e DNA, e podem ser isolados a partir de fontes naturais, sintetizados *in vitro*, ou preparados a partir de uma combinação de moléculas naturais e sintéticas.

20 O termo “complementos de moléculas de polinucleotídeo” denota as moléculas de polinucleotídeo tendo uma seqüência de base complementar e orientação reversa quando comparado a uma seqüência de referência. Por exemplo, a seqüência 5’ ATGCACGGG 3’ é complementar a 5’ CCCGTGCAT 3’.

25 O termo “seqüência de nucleotídeos degenerada” denota uma seqüência de nucleotídeos que inclui um ou mais códons degenerados (quando comparado a uma molécula de polinucleotídeo de referência que codifica um polipeptídeo). Os códons degenerados contêm tripletos diferentes de nucleotídeos, mas codificam o mesmo resíduo de aminoácido (isto é, cada

um dos tripletos GAU e GAC codificam Asp).

O termo “promotor” denota uma porção de um gene contendo seqüências de DNA que fornecem para a ligação da RNA polimerase e iniciação da transcrição. As seqüências promotoras são comumente, mas não
5 sempre, encontradas das regiões não codificadoras 5’ dos genes.

O termo “seqüência de sinal secretora” denota uma seqüência de DNA que codifica um polipeptídeo (um “peptídeo secretor”) que, como um componente de um polipeptídeo maior, conduz o polipeptídeo maior através de um caminho secretor de uma célula na qual ele é sintetizado. O
10 peptídeo maior é comumente clivado para remover o peptídeo secretor durante a passagem através do caminho secretor.

O termo “pectina” denota o pectato, o ácido poligalacturônico, e a pectina que podem ser esterificados a um grau superior ou inferior.

O termo “pectinase” denota uma enzima pectinase definida de acordo com a técnica onde as pectinases são um grupo de enzimas que clivam
15 as ligações glicosídicas de substâncias pécticas principalmente poli(1,4-alfa-D-galacturonida e seus derivados (ver a referência Sakai *et al.*, Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications, páginas 213 a 294 em: Advances in Applied Microbiology vol: 39, 1993).

Preferivelmente, uma pectinase da invenção é uma enzima pectinase que catalisa a clivagem aleatória das ligações alfa-1,4-glicosídicas no ácido péctico também chamado ácido poligalacturônico por transeliminação tal como a enzima da classe poligalacturonato liase (EC
20 4.2.2.2) (PGL) também conhecida como poli(1,4-alfa-D-galacturonida) liase
25 também conhecida como pectato liase.

O termo “termoestabilidade” ou “estabilidade térmica” significa a estabilidade da proteína à influência térmica. Todas as proteínas enzimáticas desestabilizam e eventualmente degradam com a temperatura crescente, cada proteína enzimática tendo uma certa faixa de temperatura em

que a proteína é estável e mantém sua atividade enzimática. A termoestabilidade aumentada significa que a proteína enzimática pode manter sua atividade enzimática e/ou exibir uma atividade relativa mais alta nas temperaturas aumentadas.

5 O termo “estabilidade em detergente” ou “estabilidade de conservação” significa a estabilidade da proteína em uma formulação contendo detergentes por exemplo, tensoativos aniônicos. Os tensoativos aniônicos são caracterizados pela combinação de um grupo aniônico e uma cauda hidrofóbica. Quando ligando à proteína, um resíduo positivamente
10 carregado como a Lisina ou Arginina, e uma área hidrofóbica são assim pontos de interação prováveis. Similarmente, a dinâmica das regiões particularmente flexíveis é a abertura para a acessibilidade dos aminoácidos normalmente isolados no âmago da proteína. Estes resíduos são tipicamente hidrofóbicos e desse modo são atrativos para a cauda do tensoativo. Uma
15 interação química entre a enzima e o tensoativo com alta certeza deixará a enzima inativa. Assim, a estabilidade em detergente ou de conservação melhorada significa que em uma certa concentração de detergente e temperatura, uma atividade enzimática maior será mantida depois de um certo período de tempo (atividade residual maior).

20 Consequentemente, a termoestabilidade e a estabilidade em detergente são duas características independentes de uma proteína ou uma enzima.

 As variantes da pectato liase da invenção tendo estabilidade em detergente melhorada podem exibir pelo menos 120% (preferivelmente
25 pelo menos 140%, mais preferivelmente pelo menos 160%, ainda mais preferivelmente pelo menos 180%, ainda mais preferivelmente pelo menos 200%, o mais preferivelmente pelo menos 250% e em particular pelo menos 300%) de atividade residual comparado à pectato liase precursora, quando submetidas ao método de análise descrito no Exemplo 1.

Contagem de proteína

No contexto desta invenção, uma contagem específica das posições do resíduo de aminoácido nas enzimas que degradam a parede celular, especialmente as enzimas pectato liase, é utilizada. Por exemplo, alinhando-se as seqüências de aminoácido das pectato liases conhecidas é possível de modo não ambíguo dividir um número da posição do aminoácido a qualquer resíduo de aminoácido em qualquer enzima pectato liase, se sua seqüência de aminoácidos for conhecida.

Usando o sistema de contagem que origina da seqüência de aminoácidos da pectato liase codificada pelo polinucleotídeo presente no plasmídeo da cepa *Bacillus subtilis* DSM 14218, divulgado na SEQ ID NO: 2, alinhada com a seqüência de aminoácidos de várias outras pectato liases, é possível indicar a posição de um resíduo de aminoácido em uma enzima pectato liase de modo não ambíguo.

Em descrever as várias variantes de enzima que degradam a parede celular produzidas ou consideradas de acordo com esta invenção, as nomenclaturas seguintes são adaptadas para a facilidade de referência:

Substituições:

[Aminoácido original; Posição; Aminoácido substituído]

Consequentemente, a substituição da serina com isoleucina na posição 72 é designada como S72I.

As mutações múltiplas são a separação pelos sinais de adição (“+”), por exemplo, M169I + F198V, representando as mutações nas posições 169 e 198 substituindo a metionina (M) com isoleucina (I), e fenilalanina (F) com valina (V), respectivamente.

Supressões:

Uma supressão de glicina na posição 195 será indicada por:

Gly195* ou G195*

Correspondentemente, a supressão de mais do que um resíduo

de aminoácido, tal como a supressão da glicina e leucina nas posições 195 e 196 será designada

Gly195* + Leu196* ou G195* + L196*

Inserções:

- 5 A inserção de um resíduo de aminoácido adicional tal como por exemplo, uma lisina depois de G195 é indicada por:

Gly195GlyLys ou G195GK;

ou, quando mais do que um resíduo de aminoácido é inserido, tal como por exemplo, uma Lys e Ala depois de G195 desse modo será indicado como:

- 10 Gly195GlyLysAla ou G195GKA

Em tais casos o(s) resíduo(s) de aminoácido inserido(s) são numerados pela adição de *case letters* inferiores ao número da posição do resíduo de aminoácido que precede o(s) resíduo(s) de aminoácido inserido(s). No exemplo acima as seqüências 194 a 196 deste modo devem ser alteradas de:

194 195 196

A - G - L

Para

194 195 195a 195b 196

- 20 A - G - K - A - L

Nos casos onde um resíduo de aminoácido idêntico ao resíduo de aminoácido existente é inserido está claro que a degeneração na nomenclatura eleva-se. Se por exemplo uma glicina é inserida depois da glicina no exemplo acima esta poderia ser indicada por G195GG. A mesma mudança real também poderia ser indicada como A194AG para a alteração de:

194 195 196

A - G - L

Para

194 195 195a 196

A - G - G - L

Ou

194 194a 195 196

5 Tais exemplos estarão evidentes à pessoa habilitada e a indicação G195GG e as indicações correspondentes para este tipo de inserções são deste modo intencionados a compreender tais indicações degeneradas equivalentes.

10 Todas as posições referidas aqui pela contagem da pectato liase referem-se, a menos que de outro modo declarado, à contagem descrita acima, e são determinadas com relação à seqüência de aminoácidos da pectato liase codificada pelo polinucleotídeo presente no plasmídeo da cepa *Bacillus subtilis* DSM 14218, divulgado na SEQ ID NO: 2.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

15 A presente invenção é relativa às variantes de uma pectato liase precursora (EC 4.2.2.2). As variantes têm propriedades melhoradas em comparação à enzima precursora, especialmente a estabilidade em detergente ou a estabilidade de conservação nas composições detergentes são melhoradas.

20 No processo para melhorar as propriedades da pectato liase precursora, os inventores descobriram que as alterações dos aminoácidos específicos no suporte principal do polipeptídeo precursor alteraria significativamente a estabilidade em detergente da enzima.

Polinucleotídeos

25 Dentro de formas de realização preferidas da invenção é considerado que um polinucleotídeo que codifica a enzima precursora da variante da pectato liase da invenção hibridizará às regiões de tamanho similar do polinucleotídeo correspondente da SEQ ID NO: 1, ou uma seqüência complementar à esta, pelo menos sob condições de severidade

média, preferivelmente condições de severidade alta.

Em particular os polinucleotídeos da invenção hibridizarão a uma sonda de DNA de filamento duplo desnaturado compreendendo a seqüência de variante total que corresponde às posições 1 a 1200 da SEQ ID NO: 1 com as alterações da seqüência apropriadas correspondendo às substituições de aminoácido reais feitas ou qualquer sonda compreendendo uma subseqüência de variante deste tendo um comprimento de pelo menos cerca de 100 pares de base pelo menos sob condições de severidade média, mas preferivelmente em condições de severidade alta como descrito em detalhe abaixo. As condições experimentais adequadas para determinar a hibridização na severidade média, ou alta entre uma sonda de nucleotídeo e uma seqüência de DNA ou RNA homóloga envolvem o pré umidecimento do filtro contendo os fragmentos de DNA ou RNA para hibridizar em 5 x SSC (Cloreto de sódio/Citrato de sódio, Sambrook *et al.* 1989) durante 10 min, e a pré hibridização do filtro em uma solução de 5 x SSC, 5 x solução de Denhardt (Sambrook *et al.* 1989), 0,5% de SDS e 100 microgramas/ml de DNA de esperma de salmão sonificado desnaturado (Sambrook *et al.* 1989), seguido pela hibridização na mesma solução contendo uma concentração de 10 ng/ml de um preparador aleatório (Feinberg, A. P. e Vogelstein, B. (1983) Anal. Biochem. 132: 6 a 13), sonda rotulada por ^{32}P -dCTP (atividade específica maior do que 1×10^9 cpm/micrograma) durante 12 horas a cerca de 45 graus Celsius. O filtro depois é lavado duas vezes durante 30 minutos em 2 x SSC, 0,5% de SDS pelo menos a 60 graus Celsius (severidade média), ainda mais preferivelmente pelo menos 65 graus Celsius (severidade média/alta), ainda mais preferivelmente pelo menos 70 graus Celsius (severidade alta), e ainda mais preferivelmente pelo menos 75 graus Celsius (severidade muito alta).

As moléculas às quais a sonda de oligonucleotídeo hibridiza sob estas condições são detectadas usando uma película de raio X.

Como previamente declarado, os polinucleotídeos que codificam as variantes da pectato liase da presente invenção incluem DNA e RNA. Os métodos para isolar o DNA e o RNA são bem conhecidos na técnica. O DNA e o RNA que codificam os genes de interesse podem ser clonados em Bancos de Gene ou bibliotecas de DNA por meios de métodos conhecidos na técnica.

Os polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos tendo atividade de pectato liase da invenção depois são identificados e isolados, por exemplo, por hibridização ou PCR.

As espécies homólogas da pectato liase precursora usadas na preparação das variantes da pectato liase da invenção podem ser clonadas usando informação e composições fornecidas pela presente invenção em combinação com técnicas de clonagem convencionais. Por exemplo, o DNA pode ser clonado usando o DNA cromossômico obtido a partir de um tipo de célula que expressa a proteína. As fontes adequadas de DNA podem ser identificadas sondando-se os Northern blots com as sondas designadas das seqüências aqui divulgadas. Uma biblioteca depois é preparada a partir do DNA cromossômico de uma linha de célula positiva. Um DNA que codifica um polipeptídeo tendo atividade de pectato liase da invenção depois pode ser isolado por uma variedade de métodos, tais como sondando-se com um DNA completo ou parcial ou com uma ou mais séries de sondas degeneradas com base nas seqüências divulgadas. Um DNA também pode ser clonado usando a reação de cadeia da polimerase, ou PCR (Mullis, Patente U.S. 4.683.202), usando iniciadores designados das seqüências aqui divulgadas. Dentro de um método adicional, a biblioteca de DNA pode ser usada para transformar ou transfectar as células hospedeiras, e a expressão do DNA de interesse pode ser detectada com um anticorpo (mono-clonal ou policlonal) incitado contra a pectato liase clonada da cepa de *B. subtilis* depositada como IFO 3134, ou por um teste de atividade relativo a um polipeptídeo tendo atividade de pectato

liase. As Técnicas similares também podem ser aplicadas ao isolamento dos clones genômicos.

O polipeptídeo que codifica parte da sequência de DNA clonou um plasmídeo presente em *Bacillus subtilis* DSM 14218 e/ou uma
5 sequência de DNA análogo da invenção pode ser clonada de uma cepa da espécie bacteriana *Bacillus subtilis*, preferivelmente a cepa depositada como IFO 3134, produzindo a enzima com atividade degradante de pectina, ou outro ou organismo relacionado como aqui descrito.

Alternativamente, a sequência análoga pode ser construída na
10 base da sequência de DNA obtível de um plasmídeo presente em *Bacillus subtilis* DSM 14218 por exemplo, ser uma subsequência deste, e/ou por introdução de substituições de nucleotídeo que não origina uma outra sequência de aminoácidos da pectato liase codificada pela sequência de DNA, mas que corresponde ao uso do códon do organismo hospedeiro pretendido
15 para a produção da enzima, ou por introdução de substituições de nucleotídeo que pode originar uma sequência de aminoácidos diferente (isto é, uma variante da enzima que degrada a pectina da invenção).

Polipeptídeos

A sequência de aminoácidos Nº 1-399 da SEQ ID No 2 é uma
20 sequência de pectato liase madura correspondendo a uma pectato liase do tipo selvagem da espécie *Bacillus subtilis* depositada como IFO 3134 (Institute for Fermentation, Osaka, 17 a 85, Jusohonmachi 2-chome, Yodagawa-ku, Osaka 532 a 8686, Japão).

A presente invenção também fornece variantes da pectato liase
25 de polipeptídeos que são substancialmente homólogos aos polipeptídeos da SEQ ID NO: 2 e suas espécies homólogas (parálogos ou ortólogos). O termo “substancialmente homólogos” é aqui usado para denotar os polipeptídeos tendo 70%, mais preferivelmente pelo menos 85%, e ainda mais preferivelmente pelo menos 90%, de identidade de sequência com a sequência

apresentada na SEQ ID NO: 2 ou seus ortólogos ou parálogos. Tais polipeptídeos mais preferivelmente serão pelo menos 95% idênticos, e o mais preferivelmente 98% ou mais idênticos à sequência apresentada na SEQ ID NO: 2 ou seus ortólogos ou parálogos. A porcentagem de identidade de
5 sequência é determinada por métodos convencionais, por meios de programas de computador conhecidos na técnica tais como GAP fornecido no pacote de programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Versão 8, Agosto de 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) como divulgado em Needleman, S. B. e Wunsch, C.
10 D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443 a 453, que por meio deste é incorporado por referência em sua totalidade. O GAP é usado com os ajustes seguintes para a comparação da sequência polipeptídeo: penalidade de criação do GAP de 3,0 e penalidade de extensão do GAP de 0,1.

A identidade da sequência das moléculas de polinucleotídeo é
15 determinada por métodos similares usando o GAP com os ajustes seguintes para a comparação da sequência de DNA: penalidade de criação do GAP de 5,0 e penalidade de extensão do GAP de 0,3.

A pectato liase precursora preferivelmente é derivada de um microorganismo, preferivelmente de uma bactéria, um *archaea* ou um fungo,
20 especialmente de uma bactéria tal como uma bactéria pertencente ao *Bacillus*, preferivelmente a uma cepa de *Bacillus alcalofilica* que pode ser selecionada do grupo que consiste da espécie *Bacillus subtilis* e espécie *Bacillus* altamente relacionada em que cada espécie preferivelmente é pelo menos 95%, ainda mais preferivelmente pelo menos 98%, homóloga ao *Bacillus subtilis* com
25 base nas sequências de rDNA 16S alinhadas. As pectato liases precursoras da invenção são substancialmente homólogas aos polipeptídeos da SEQ ID NO: 2 e suas espécies homólogas (parálogos ou ortólogos). O termo “substancialmente homólogas” é aqui usado para denotar os polipeptídeos tendo 70%, mais preferivelmente pelo menos 85%, e ainda mais

preferivelmente pelo menos 90%, de identidade de seqüência com a seqüência apresentada na SEQ ID NO: 2 ou seus ortólogos ou parálogos. Tais polipeptídeos mais preferivelmente serão pelo menos 95% idênticos, e o mais preferivelmente 98% ou mais idênticos com a seqüência apresentada na SEQ ID NO: 2 ou seus ortólogos ou parálogos.

As proteínas e polipeptídeos precursores substancialmente homólogos são caracterizados como tendo uma ou mais substituições, supressões ou adições de aminoácido. Estas mudanças são preferivelmente de uma natureza inferior, que são substituições de aminoácido conservativas (ver Tabela 1) e outras substituições que não afetam significativamente a dobra ou a atividade da proteína ou polipeptídeo; supressões pequenas, tipicamente de um a cerca de 30 aminoácidos; e extensões de terminal amino ou carboxila pequenas, tais como um resíduo de metionina de terminal amino, um peptídeo ligador pequeno de até cerca de 20 a 25 resíduos, ou uma extensão pequena que facilita a purificação (uma rótulo de afinidade), tal como um trato de polihistidina, proteína A (Nilsson *et al.*, EMBO J. 4: 1075, 1985; Nilsson *et al.*, Methods Enzymol. 198: 3, 1991. Ver, no geral, Ford *et al.*, Protein Expression and Purification 2: 95 a 107, 1991, que é aqui incorporado por referência. Os DNAs que codificam os rótulos de afinidade estão disponíveis dos fornecedores comerciais (por exemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; New England Biolabs, Beverly, MA).

Entretanto, ainda que as mudanças descritas acima preferivelmente sejam de uma natureza menor, tais mudanças também podem ser de uma natureza maior tal como fusão dos polipeptídeos maiores de até 300 aminoácidos ou mais como extensões terminais tanto amino quanto carboxila.

Tabela 1

Substituições de aminoácido conservativas

Básico: arginina

		lisina
	Ácido:	ácido glutâmico
		ácido aspártico
	Polar:	glutamina
5		asparaginas
		serina
		treonina
		cisteína
	Hidrofóbico:	leucina
10		isoleucina
		valina
		prolina
		metionina
	Aromático/	
15	Heteroaromático:	fenilalanina
		triptofano
		tirosina
		histidina
	Pequeno:	glicina
20		alanina

Além dos 20 aminoácidos padrão, os aminoácidos não padrão (tais como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina e α-metil serina) podem ser substituídos no lugar dos resíduos de aminoácido de um polipeptídeo do tipo selvagem. Um número limitado de aminoácidos não conservativos, os aminoácidos que não são codificados pelo código genético, e aminoácidos artificiais podem ser substituídos no lugar dos resíduos de aminoácido. Os “aminoácidos artificiais” foram modificados depois da síntese de proteína, e/ou têm uma estrutura química em sua(s) cadeia(s) lateral(is) diferentes daquelas dos aminoácidos padrão. Os

aminoácidos artificiais podem ser sintetizados quimicamente, ou preferivelmente, estão comercialmente disponíveis, e incluem ácido piperídico, ácido tiazolidino carboxílico, desidroprolina, 3- e 4-metilprolina, e 3,3-dimetilprolina. Os aminoácidos essenciais nos polipeptídeos da pectato

5 liase da presente invenção podem ser identificados de acordo com os procedimentos conhecidos na técnica, tais como mutagênese direcionada ao sítio ou mutagênese de varredura de alanina (Cunningham e Wells, *Science* 244: 1081 a 1085, 1989). Na última técnica, as mutações de alanina simples são introduzidas em cada resíduo na molécula, e as moléculas mutantes

10 resultantes são testadas quanto a atividade biológica (isto é, atividade da pectato liase) para identificar os resíduos de aminoácido que são críticos à atividade da molécula. Ver também, Hilton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 4699 a 4708, 1996. O sítio ativo da enzima ou outra interação biológica também podem ser determinados pela análise física da estrutura, como determinado

15 por técnicas tais como ressonância magnética nuclear, cristalografia, difração de elétron ou rotulação por fotoafinidade, em conjunção com a mutação dos aminoácidos de sítio de contato putativos. Ver, por exemplo, de Vos *et al.*, *Science* 255: 306 a 312, 1992; Smith *et al.*, *J. Mol. Biol.* 224: 899 a 904, 1992; Wlodaver *et al.*, *FEBS Lett.* 309: 59 a 64, 1992. As identidades dos

20 aminoácidos essenciais também podem ser deduzidas a partir da análise das homologias com polipeptídeos que estão relacionados a um polipeptídeo de acordo com a invenção.

As substituições de aminoácido múltiplas podem ser feitas e testadas usando métodos conhecidos de mutagênese, recombinação e/ou

25 embaralhamento seguido por um procedimento de triagem relevante, tal como aquele divulgado por Reidhaar-Olson e Sauer (*Science* 241: 53 a 57, 1988), Bowie e Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152 a 2156, 1989), WO95/17413, ou WO95/22625. Em resumo, estes autores divulgam métodos para tornar aleatórias simultaneamente duas ou mais posições em um

polipeptídeo, ou recombinação/embaralhamento de mutações diferentes (WO95/17413, WO95/22625), seguido pela seleção funcional de um polipeptídeo, e depois seqüenciando os polipeptídeos que sofreram mutagênese para determinar o espectro de substituições permissíveis em cada
5 posição. Outros métodos que podem ser usados incluem demonstração de fago (por exemplo, Lowman *et al.*, Biochem. 30: 10832 a 10837, 1991; Ladner *et al.*, Patente U.S. 5.223.409; Huse, Publicação WIPO WO 92/06204) e mutagênese direcionada à região (Derbyshire *et al.*, Gene 46: 145, 1986; Ner *et al.*, DNA 7: 127, 1988).

10 Os métodos de mutagênese/embaralhamento como acima divulgados podem ser combinados com métodos de triagem automatizados de alto rendimento, para detectar a atividade dos polipeptídeos que sofreram mutagênese, clonados nas células hospedeiras. As moléculas de DNA que sofreram mutagênese que codificam os polipeptídeos ativos podem ser
15 recuperadas a partir de células hospedeiras e rapidamente seqüenciadas usando equipamento moderno. Estes métodos permitem a determinação rápida da importância de resíduos de aminoácido individuais em um polipeptídeo de interesse, e podem ser aplicados aos polipeptídeos de estrutura desconhecida.

20 Usando os métodos debatidos acima, uma pessoa de habilidade ordinária na técnica pode identificar e/ou preparar uma variedade de polipeptídeos que são substancialmente homólogos aos resíduos 1 a 399 da SEQ ID NO: 2 e manter a atividade de pectato liase da enzima precursora.

Entretanto, exatamente os mesmos métodos também são úteis
25 para fornecer as variantes da pectato liase da invenção tendo propriedades mais vantajosas do que a proteína do tipo selvagem. Usando estes métodos, os presentes inventores identificaram várias posições em que a pectato liase do tipo selvagem da SEQ ID NO: 2 pode ser substituída vantajosamente de modo a preparar as variantes com propriedades melhoradas.

As variantes da pectato liase preferidas das invenções são substituídas em uma ou mais das posições seguintes (contagem relativa à SEQ ID NO: 2): 5, 9, 11, 26, 28, 30, 31, 37, 40, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 61, 64, 68, 69, 70, 71, 74, 75, 76, 79, 86, 87, 91, 99, 105, 106, 107, 111, 115, 116, 118, 122, 123, 134, 136, 139, 140, 141, 146, 148, 156, 158, 170, 182, 185, 186, 189, 193, 194, 196, 199, 201, 202, 204, 213, 215, 218, 224, 228, 229, 234, 235, 237, 251, 256, 257, 258, 272, 277, 286, 295, 298, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 314, 316, 323, 324, 326, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 349, 356, 357, 363, 366, 378, 381, 384, 386, 387, 389, 390, 391, 393 e 397.

As variantes preferidas da presente invenção compreendem ainda as variantes em que a carga global da enzima foi feita mais negativa. Em tais variantes, os aminoácidos positivamente carregados podem ter sido substituídos e/ou os aminoácidos, que são negativamente carregados sob as condições de aplicação, foram introduzidos.

Assim, de acordo com isto, as variantes preferidas podem ter tido substituído um resíduo de aminoácido sendo de modo parcial ou completo positivamente carregado sob condições de aplicação, isto é, um His, Lys ou um Arg. Além disso, as variantes preferidas podem ter substituído qualquer resíduo por um resíduo de aminoácido com uma carga negativa sob condições de aplicação, isto é, Asp, Glu, e Tyr.

As variantes especialmente preferidas são aquelas em que um resíduo de lisina em uma ou mais das posições seguintes (contagem relativa à SEQ ID NO: 2): 26, 47, 54, 59, 71, 79, 87, 90, 99, 100, 115, 118, 139, 148, 213, 218, 247, 257, 263, 265, 274, 314, 317, 334, 386 e 397, foi substituído.

Do mesmo modo, as variantes especialmente preferidas são aquelas em que um resíduo de arginina em uma ou mais das posições seguintes (contagem relativa à SEQ ID NO: 2): 38, 110, 112, 120, 155, 206, 217, 272, 279, 282 e 284, foi substituído.

Além disso, as variantes preferidas também são aquelas em que um resíduo de histidina em uma ou mais das posições seguintes (contagem relativa à SEQ ID NO: 2): 5, 31, 193, 198, 221, 222, 243, 245, 269, 270, 289, 376 e 384, foi substituído.

5 As enzimas pectato liase variante preferidas foram modificadas de modo a alterar a constante de ligação para Ca^{2+} , e desse modo, melhorar a estabilidade de supressão de cálcio. Em uma pectato liase da presente invenção, os três resíduos de aminoácido D184, D223 e D227 coordenam a ligação de Ca^{2+} ao sítio de ligação de cálcio primário.
10 Recrutando-se um quarto resíduo de aminoácido nesta coordenação é possível alterar a constante de ligação para o Ca^{2+} . A presença de Ca^{2+} no sítio de ligação de cálcio primário pode influenciar o evento catalítico (reduzindo-se o pK_a do resíduo catalítico), o alinhamento de substrato ou determinar se as funções enzimáticas como uma hidrolase ou uma liase (a presença de Ca^{2+}
15 sendo um pré-requisito para a atividade da liase). Tais variantes com estabilidade de supressão de cálcio melhorada podem compreender uma das substituições Q182D e Q182E.

Outros exemplos das variantes preferidas são aquelas com estabilidade de oxidação melhorada em que um resíduo de aminoácido
20 instável em oxidação foi substituído. Por “instável em oxidação” é intencionado os aminoácidos que mantêm um grupo de enxofre ou um de hidroxila, por exemplo, metionina, cisteína, treonina, serina e tirosina. As variantes preferidas são aquelas em que um resíduo de aminoácido instável em oxidação em uma ou mais das posições seguintes (contagem relativa a
25 SEQ ID NO: 2): 64, 122, 199 e 237 foi substituído.

Outros exemplos de variantes preferidas são aquelas que mantêm uma substituição de aminoácido em um resíduo flexível, em que um resíduo de aminoácido menos flexível foi introduzido. No presente contexto o termo “flexível” refere-se ao número dos ângulos phi e psi possíveis do átomo

C-alfa no aminoácido. A flexibilidade do suporte principal de peptídeo é limitada por impedimento estérico dos átomos ligados ao átomo C-alfa. No geral apenas a cadeia lateral do aminoácido difere de um resíduo ao outro, assim o tamanho da cadeia lateral (o raio de Van der Waals) determina a flexibilidade. Uma glicina tem a menor cadeia lateral, um átomo de hidrogênio; portanto um resíduo de glicina introduz mais flexibilidade. A situação oposta se aplica para a prolina, onde as conformações possíveis são limitadas não apenas por uma cadeia lateral grande mas também devido à estrutura do anel. Assim, um resíduo de prolina é menos flexível do que a média, e fornece dureza e estabilidade ao peptídeo.

Tais variantes menos flexíveis incluem em particular, mas não são limitados aos, variantes em que um resíduo de glicina foi substituído com qualquer um dos outros 19 aminoácidos ou variantes que ocorrem naturalmente em que qualquer aminoácido foi substituído com um resíduo de prolina. Nas variantes especialmente preferidas um resíduo de aminoácido menos flexível foi introduzido em uma ou mais das regiões seguintes (contagem das posições relativas à SEQ ID NO: 2): 26 a 31, 45 a 50, 66 a 72, 81 a 89, 90 a 106, 134 a 137, 169 a 178, 210 a 217, 263 a 262, 275 a 286, 297 a 308, 328 a 343, 354 a 356, 361 a 365, 368 a 372 e 376 a 379.

Em uma forma de realização preferida da presente invenção, a variante da pectato liase de *Bacillus subtilis* compreende pelo menos um resíduo de aminoácido substituído selecionado do grupo que consiste de: H5R, E9G, N11Y, K26Q, S28T, S30F, S30P, S30T, H31N, N37D, Q40E, L45V, G46D, K47N, K47R, D48E, D48P, T49P, N50D, N50L, N50Y, N51Y, T52M, K54V, T61A, M64F, D68*, N69*, L70*, K71*, K71E, G74D, L75A, L75P, N76D, K79A, D86N, K87A, K87E, A91E, K99I, K99N, K99R, T105A, T105P, L106Q, E107K, A111E, K115A, K115I, K115N, K115Q, N116D, K118A, K118E, M122E, M122K, M122N, M122Q, V123I, S134L, T136S, K139E, K139F, K139I, K139M, K139N, K139S, I140V, V141G,

V141E, V141L, V141N, Q146F, Q146H, Q146I, Q146V, K148E, K148Q, N156S, E158N, D170N, Q182D, Q182E, N185H, N186H, N189D, H193Y, I194V, I196V, C199N, C199S, F201L, N202K, G204R, K213E, K213N, K213T, F215Y, K218E, K218L, K218P, G224S, A228I, S229T, Y234H,
 5 I235V, M237I, F251I, S256C, K257E, K257N, T258I, L286Y, R272C, R272H, R272Y, V277D, G286A, Y295H, S298N, S301Y, S302A, D303S, A305P, S307R, Y308S, K314N, S316F, N323M, V324A, D326N, S331P, S331T, A332P, A333E, K334E, T335S, T335R, I336S, S337C, S337K, S337L, S337R, V338E, V338Y, F339I, S340A, S340K, S340N, S340P,
 10 S340Q, G341S, G349R, Q356H, I357V, N363S, S366N, T378G, T378S, A381D, H384N, K386P, K386R, S387A, V389I, I390N, I390T, S391N, A393V e K397D.

No momento, é considerado que uma ou mais destas substituições sozinhas ou em combinação aumentam a estabilidade em
 15 detergente da variante da pectato liase quando comparado à enzima precursora.

As substituições múltiplas preferidas que aumentam a estabilidade em detergente incluem:

A228I + F251I,
 20 S134L + K257E,
 K115I + K213E,
 K139I + K213N,
 H5R + K257N + S302A,
 K99I + I196V,
 25 K115A + K118A,
 K115A + K118A + M122N,
 V141E + C199S + K213E,
 K115I + Q146H,
 K71E + K118E,

- T49P + N156S,
 K314N + S340P,
 V141E + I235V,
 G46D + K257N,
- 5 S28T + S30F + K334E + N363S,
 D48E + L106Q + I140V + F215Y + K218E,
 H193Y + S256C + V389I + A393V,
 E9G + H31N + N50D + L106Q + A111E + T136S + V141L + F201L +
 N202K + F215Y + G286A + A381D + H384N,
- 10 K213N + T258I,
 E9G + H31N + L106Q + D303S + A305P + T335S + H384N + S391N,
 E9G + H31N + D48E + L106Q + A111E + S301Y + D303S + A305P +
 T378S + H384N + S391N,
 L45V + N50Y + N185H,
- 15 N11Y + K87E + K99N,
 E9G + D48E + L106Q + S316F + A381D,
 S30P + K115I + K139I + Q146H + S337C,
 E9G + H31N + D48E + L106Q + I140V + F215Y + D303S + A305P +
 T378S + H384N + S391N,
- 20 H31N + T105A + L106Q + A111E + V141L + K218E + D303S + A305P +
 D326N + T335S + H384N + S391N,
 K26Q + K47N + L106Q + I140V + F215Y + D303S + A305P + T378S +
 H384N + S391N,
 D48E + L106Q + I140V + F215Y + D303S + A305P + T378S + H384N +
- 25 S391N,
 K213T + K218L + A305P,
 M64F + K213T + K218L + A305P,
 M64F + M122K + K118E + K213T + K218L + A305P,
 K139I + Q146H + K257N + S337C,

M64F + K139I + Q146H + S337C,

K139I + Q146H + S337C e

D48P + M64F + T105P + K139I + Q146H + K213T + K218P + T258I +
A305P + S331P + S337K.

5 PRODUÇÃO DE PROTEÍNA

Os polipeptídeos da presente invenção, incluindo proteínas de tamanho natural, fragmentos destas e proteínas de fusão, podem ser produzidos em células hospedeiras geneticamente construídas de acordo com técnicas convencionais. As células hospedeiras adequadas são aqueles tipos de célula que podem ser transformados ou transfectados com DNA exógeno e desenvolvem em cultura, e incluem bactérias, células fúngicas, e células eucarióticas superiores cultivadas. As células bacterianas, particularmente as células cultivadas de organismos gram-positivos, são preferidas. As células gram-positivas do gênero *Bacillus* são especialmente preferidas, tais como *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. thuringiensis*, *B. agaradherens*, ou em particular *B. subtilis*.

As técnicas para manipular as moléculas de DNA clonadas e introduzir o DNA exógeno em uma variedade de células hospedeiras são divulgadas por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987; e (*Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria, Sonensheim *et al.*, 1993, American Society for Microbiology, Washington D. C.), que aqui são incorporados por referência.

No geral, uma seqüência de DNA que codifica uma pectato liase da presente invenção é operavelmente ligada a outros elementos genéticos necessários para sua expressão, no geral incluindo um promotor e terminador de transcrição dentro de um vetor de expressão. O vetor também

comumente conterá um ou mais marcadores selecionáveis e uma ou mais origens de duplicação, embora aqueles habilitados na técnica reconhecerão que dentro de certos sistemas, os marcadores selecionáveis podem ser fornecidos em vetores separados, e a duplicação do DNA exógeno pode ser
5 fornecida pela integração no genoma da célula hospedeira. A seleção dos promotores, terminadores, marcadores selecionáveis, vetores e outros elementos é uma questão de projeto de rotina dentro do nível da habilidade ordinária na técnica. Muitos de tais elementos são descritos na literatura e estão disponíveis através de fornecedores comerciais.

10 Para conduzir um polipeptídeo no caminho secretor de uma célula hospedeira, uma sequência de sinal secretora (também conhecida como uma sequência condutora, sequência pré-pró ou sequência pré) é fornecida no vetor de expressão. A sequência de sinal secretora pode ser aquela do polipeptídeo, ou pode ser derivada de uma outra proteína secretada ou
15 sintetizada de novo. As sequências de sinal secretoras adequadas numerosas são conhecidas na técnica e a referência é feita ao *Bacillus subtilis* e outras Bactérias Gram-Positivas, Sonenshein *et al.*, 1993, (American Society for Microbiology, Washington D. C.); e Cutting, S. M.(eds.) “Molecular Biological Methods for *Bacillus*”, (John Wiley and Sons, 1990) para outra
20 descrição das sequências de sinal secretoras adequadas especialmente para a secreção em uma célula hospedeira de *Bacillus*. A sequência de sinal secretora é ligada à sequência de DNA na matriz de leitura correta. As sequências de sinal secretoras são comumente posicionadas 5’ em relação à sequência de DNA que codifica o polipeptídeo de interesse, embora certas
25 sequências de sinal possam ser posicionadas em outra parte na sequência de DNA de interesse (ver, por exemplo, Welch *et al.*, Patente U.S. 5.037.743; Holland *et al.*, Patente U.S. 5.143.830). As células hospedeiras transformadas ou transfectadas são cultivadas de acordo com procedimentos convencionais em um meio de cultura contendo nutrientes e outros componentes necessários

para o desenvolvimento das células hospedeiras escolhidas. Uma variedade de meios adequados, incluindo meios definidos e meios complexos, são conhecidos na técnica e no geral incluem uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais. Os meios também
5 podem conter tais componentes como fatores de desenvolvimento ou soro, conforme necessário. O meio de desenvolvimento no geral selecionará quanto às células contendo o DNA adicionado de forma exógena, por exemplo, pela seleção de medicamento ou deficiência em um nutriente essencial que é complementado pelo marcador selecionável carregado no vetor de expressão
10 ou co-transfectado na célula hospedeira.

A fermentação pode ser realizada por cultura da célula hospedeira sob condições aeróbicas em um meio nutriente contendo fontes de carbono e nitrogênio junto com outros nutrientes essenciais, o meio sendo composto de acordo com os princípios da técnica conhecida. O meio pode ser
15 um meio rico em complexo ou um meio mínimo. A fonte de nitrogênio pode ser de natureza inorgânica e/ou orgânica. As fontes de nitrogênio inorgânico adequadas são os nitratos e os sais de amônio. Dentre as muitas fontes de nitrogênio orgânico várias são usadas regularmente nas fermentações. Os exemplos são farinha de soja, caseína, milho, líquido da maceração de milho,
20 extrato de levedura, uréia e albumina. As fontes de carbono adequadas são carboidratos ou materiais contendo carboidrato. Preferivelmente o meio nutriente contém pectato, ácido poligalacturônico e/ou pectina esterificada a um grau superior ou inferior quanto a fonte de carbono e/ou indutor da produção de pectinase. Alternativamente, o meio contém um material rico em
25 pectina tal como farinha de soja, polpa de maçã ou casca de cítricos.

O cultivo preferivelmente pode ser conduzido nos valores de pH alcalino tais como pelo menos pH 8 ou pelo menos pH 9, que podem ser obtidos pela adição de tampões adequados tais como carbonato de sódio ou misturas de carbonato de sódio e bicarbonato de sódio depois da esterilização

do meio de desenvolvimento.

Isolamento da proteína

Quando o polipeptídeo recombinante expressado é secretado o polipeptídeo pode ser purificado a partir dos meios de desenvolvimento.

- 5 Preferivelmente as células hospedeiras de expressão são removidas dos meios antes da purificação do polipeptídeo (por exemplo, por centrifugação).

- Quando o polipeptídeo recombinante expressado não é secretado a partir da célula hospedeira, a célula hospedeira preferivelmente é rompida e o polipeptídeo liberado em um “extrato” aquoso que é o primeiro
10 estágio de tais técnicas de purificação. Preferivelmente as células hospedeiras de expressão são removidas a partir dos meios antes do rompimento da célula (por exemplo, por centrifugação).

- O rompimento da célula pode ser realizado por técnicas convencionais tais como por digestão de lisozima ou forçando-se as células
15 através de pressão alta. Ver (Robert K. Scobes, Protein Purification, Segunda edição, Springer-Verlag) para outra descrição de tais técnicas de rompimento da célula.

- De qualquer forma, os polipeptídeos recombinantes expressados (ou polipeptídeos quiméricos) sejam secretados ou não podem
20 ser purificados usando fracionamento e/ou métodos e meios de purificação convencionais.

- A precipitação do sulfato de amônio e a extração do ácido ou caótropro podem ser usadas para o fracionamento das amostras. As etapas de purificação exemplares podem incluir hidroxipatita, exclusão de tamanho,
25 FPLC e cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa. Os meios de troca de ânion adequados incluem dextranos derivatizados, agarose, celulose, poliacrilamida, sílicas de especialização, e outros. Os derivados de PEI, DEAE, QAE e Q são preferidos, com a Fast-Flow Sepharose (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) sendo particularmente preferida. Os meios

cromatográficos exemplares incluem aqueles meios derivatizados com grupos fenila, butila, ou octila, tais como Fenil-Sepharose FF (Pharmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octyl-Sepharose (Pharmacia) e outros; ou resinas poliacrílicas, tais como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) e outros. Os suportes sólidos adequados incluem pérolas de vidro, resinas com base em sílica, resinas celulósicas, pérolas de agarose, pérolas de agarose reticuladas, pérolas de poliestireno, resinas de poliacrilamida reticuladas e outras que são insolúveis sob as condições em que elas devem ser usadas. Estes suportes podem ser modificados com grupos reativos que permitem a fixação das proteínas pelos grupos amino, grupos carboxila, grupos sulfidril, grupos hidroxila e/ou porções de carboidrato. Os exemplos de químicas de ligação incluem ativação do brometo de cianogênio, ativação da N-hidroxissuccinimida, ativação do epóxido, ativação da sulfidril, ativação da hidrazida, e derivados de carboxila e amino para as químicas de ligação da carbodiimida. Estes e outros meios sólidos são bem conhecidos e amplamente usados na técnica, e estão disponíveis de fornecedores comerciais.

A seleção de um método particular é uma questão de projeto de rotina e é determinada em parte pelas propriedades do suporte escolhido. Ver, por exemplo, *Affinity Chromatography: Principles & Methods*, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988.

Os polipeptídeos da invenção ou os fragmentos destes também podem ser preparados através de síntese química. Os polipeptídeos da invenção podem ser monômeros ou multímeros; glicosilados ou não-glicosilados; peguilados ou não-peguilados; e podem ou não incluir um resíduo de aminoácido de metionina inicial.

Consequentemente, em um outro aspecto, a presente invenção também diz respeito a um método de produzir a preparação enzimática da invenção, o método compreendendo cultivar um microorganismo capaz de produzir a variante da pectato liase sob condições que permitem a produção

da enzima, e recuperando a enzima da cultura. O cultivo pode ser realizado usando técnicas de fermentação convencionais, por exemplo, cultivo em frascos com agitação ou fermentadores com agitação para garantir aeração suficiente em um meio de desenvolvimento que induz a produção da variante da pectato liase. O meio de desenvolvimento pode conter uma fonte de N convencional tal como peptona, extrato de levedura ou ácidos de casamino, uma quantidade reduzida de uma fonte de C convencional tal como dextrose ou sacarose, e um indutor tal como pectato ou pectina ou substratos de planta compósitos tais como farelos de cereal (por exemplo, farelo de trigo ou casca de arroz). A recuperação pode ser realizada usando técnicas convencionais, por exemplo, separação da biomassa e sobrenadante por centrifugação ou filtração, recuperação do sobrenadante ou rompimento de células se a enzima de interesse for intracelular, talvez seguido por outra purificação como descrito na EP 0 406 314 ou por cristalização como descrito na WO 97/15660.

Ainda em um outro aspecto, a presente invenção diz respeito a uma variante da pectato liase isolada tendo as propriedades descritas acima e que é isenta de impurezas homólogas, e é produzida usando técnicas recombinantes convencionais.

MÉTODOS E USOS

20 Ensaio microtitulador para a quantificação da atividade da pectato liase

A pectato liase cliva o ácido poligalacturônico através de um mecanismo de eliminação trans. Isto significa que ela deixa uma ligação C-C dupla para cada divisão de substrato. Esta ligação absorve em 235 nm permitindo a detecção direta da ação da pectato liase no ácido poligalacturônico solúvel medindo-se a absorbância neste comprimento de onda.

Uma amostra de enzima é diluída em tampão de ensaio (100 mM de Tris-HCl, 0,68 mM de CaCl_2 , pH 8,0) a uma concentração entre 5 e 100 ng/ml. Se a amostra de enzima contém o detergente ela deve ser diluída

pelo menos umas 1000 vezes com respeito ao detergente.

100 µl da diluição do tampão de enzima são misturados com 100 µl de substrato (ácido poligalacturônico a 1% (p/v) da Sigma, P-3850, agitado em tampão de ensaio durante pelo menos 15 min e centrifugado durante 5 min a 2300 g, o sobrenadante é usado) em um placa de aquecimento e aquecidos a 40° C durante 10 min. em um bloco de aquecimento, preferivelmente uma máquina ou equipamento de PCR de precisão e velocidades de aquecimento equivalentes.

100 µl de solução de enzima/substrato são misturados com 100 µl de reagente de interrupção (50 mM de H₃PO₄) em uma placa microtituladora transparente de UV. A placa de UV é agitada breve e suavemente, e a absorbância em 235 nm é medida em um espectrômetro microtitulador (Molecular Devices, Spectra-MAX 190). As leituras de absorbância são corrigidas quanto a absorbância de fundo subtraindo-se a absorbância de uma amostra de controle, conduzida sem a enzima adicionada, para todos os valores medidos.

Uma curva padrão com base na atividade da pectato liase da SEQ ID NO: 2 (do *Bacillus subtilis* depositado como IFO 3134) foi linear entre 2,5 e 100 ng/ml de enzima na mistura de reação:

Dose de enzima (ng/ml)	Absorbância em 235 nm (AU), subtraído o fundo
0	0,00
2,5	0,03
5	0,07
10	0,16
15	0,26
25	0,42
50	0,85
100	1,83

Alternativamente, a atividade catalítica da pectato liase pode ser determinada pelo ensaio de viscosidade, APSU.

Ensaio de viscosidade, APSU

Unidades de APSU: O ensaio APSU mede a mudança na viscosidade de uma solução de ácido poligalacturônico na ausência de íons

cálcio adicionados.

Uma solução a 5% p/v de poligalacturonato de sódio (Sigma P-1879) é solubilizada em tampão de glicina 0,1 M, pH 10. 4 ml desta solução são pré incubados durante 5 min a 40 graus Celsius. Depois, 250 microlitros da enzima (ou diluição da enzima) são adicionados, depois do que a reação é misturada durante 10 segundos em um misturador na velocidade mais alta e incubada durante 20 min a 40 graus Celsius ou em uma outra temperatura.

A viscosidade é medida usando um viscosímetro MIVI 600 (Sofraser, 45700 Villemandeur, França). A viscosidade é medida como mV depois de 10 segundos. Para o cálculo das unidades de APSU a curva padrão seguinte é usada:

APSU/ml	0,00	4,00	9,00	14,00	19,00	24,00	34,00	49,00	99,00
mV	300	276	249	227	206	188	177	163	168

Uso na indústria de detergente

Em outros aspectos, a presente invenção diz respeito a uma composição detergente compreendendo a variante da pectato liase ou a preparação da variante da pectato liase da invenção, e a um processo para o tratamento em máquina dos tecidos compreendendo tratar o tecido durante um ciclo de lavagem de um processo de lavagem à máquina com uma solução de lavagem contendo a variante da pectato liase ou a preparação da variante da pectato liase da invenção.

Tipicamente, a composição detergente da invenção compreende os ingredientes convencionais tais como tensoativos (aniônicos, não iônicos, zwitteriônicos, anfóteros), construtores, e outros ingredientes, por exemplo, como descrito na WO 97/01629 que por meio desta é incorporada por referência em sua totalidade.

25 Uso nas indústrias de processamento de fibra têxtil e celulósica

A variante da pectato liase da presente invenção pode ser usada em combinação com outras enzimas que degradam o carboidrato (por exemplo hemicelulases, tais como arabinanase, xiloglicanase, mananase e

pectinase) para a biopreparação de fibras ou para a limpeza das fibras em combinação com os detergentes. As fibras de algodão consistem de uma camada da parede celular primária contendo pectina e uma camada secundária contendo principalmente celulose. Sob a preparação do algodão ou refinamento do algodão parte da parede celular primária será removida. A presente invenção diz respeito à ajuda durante o refinamento do algodão pela remoção da parede celular primária, ou durante a limpeza do algodão para remover as substâncias pécicas residuais e impedir o acinzentamento do tecido.

10 No presente contexto, o termo “material celulósico” significa as fibras, tecidos costurados e não costurados, incluindo tricôs, tecidos, sarjas de Nimes, fios, e pano para toalhas, fabricados de algodão, combinações de algodão ou celulósicos naturais ou sintéticos (por exemplo, que origina das fibras de celulose contendo xilano tais como da polpa de madeira) ou
15 combinações destes. Os exemplos de combinações são combinações de algodão ou rayon/viscose com um ou mais materiais acompanhantes tais como lã, fibras sintéticas (por exemplo, fibras de poliamida, fibras acrílicas, fibras de poliéster, fibras de álcool polivinílico, fibras de cloreto de polivinila, fibras de cloreto de polivinilideno, fibras de poliuretano, fibras de poliuréia,
20 fibras de aramida), e fibras contendo celulose (por exemplo, rayon/viscose, rami, cânhamo, fibra do linho/linho, juta, fibras de acetato de celulose, *lyocell*).

A preparação da presente invenção é útil na indústria do processamento de fibra celulósica para o pré tratamento ou maceração das
25 fibras de cânhamo, fibra do linho ou linho.

O processamento do material celulósico para a indústria têxtil, como por exemplo fibra de algodão, em um material pronto para a fabricação de artigo de vestuário envolve várias etapas: fiação da fibra em um fio; construção do tecido ou tecido de malha a partir do fio e preparação

subsequente, tintura e operações de acabamento. Os vestuários tecidos são
construídos tecendo-se um fio enchedor entre uma série de fios de urdidura;
os fios podem ser de dois tipos diferentes. Os vestuários tricotados são
construídos formando-se uma rede de laços interligados de um comprimento
5 contínuo do fio. As fibras celulósicas também podem ser usadas para o pano
não-tecido.

O processo de preparação prepara o tecido para a resposta
apropriada em operações de tingimento. As subetapas envolvidas na
preparação são

10 a. Desencolamento (para vestuários tecidos) usando goma
polimérica como por exemplo, amido, CMC ou PVA é adicionada antes da
tecelagem de modo a aumentar a velocidade de urdidura; Este material deve
ser removido antes de outro processamento.

b. Limpeza por esfregamento, o objetivo da qual é remover o
15 material não-celulósico da fibra de algodão, especialmente a cutícula
(principalmente consistindo de ceras) e a parede celular primária
(principalmente consistindo de pectina, proteína e xiloglicano). Uma remoção
de cera apropriada é necessária para obter uma umectabilidade alta, sendo
uma medida para se obter uma tintura boa. A remoção da parede celular
20 primária - especialmente as pectinas - melhora a remoção de cera e garante
uma tintura mais uniforme. Além disso, isto melhora a brancura no processo
de alveamento. A substância química principal usada na limpeza por
esfregamento é o hidróxido de sódio em concentrações altas, até 70 g/kg de
algodão e em temperaturas altas, 80 a 95 graus Celsius; e

25 c. Alveamento; normalmente a limpeza por esfregamento é
seguida por um alveamento usando peróxido de hidrogênio como o agente
oxidante de modo a obter um tecido completamente alvejado (branco) ou para
garantir uma tonalidade clara do pigmento.

Um processo de esfregar/alvejar combinado de etapa única

também é usado pela indústria. Embora os processos de preparação sejam mais comumente utilizados no estado de tecido; a limpeza por esfregamento, o alvejamento e as operações de tingir também podem ser feitos no estágio de fibra ou fio.

5 O regime de processamento pode ser por lote ou contínuo com o tecido que é contatado pelo fluxo de processamento líquido em largura aberta ou forma de corda. As operações contínuas no geral usam um saturador com o qual um peso igual aproximado de banho químico por peso de tecido é aplicado ao tecido, seguido por uma câmara de interrupção aquecida onde a
10 reação química ocorre. Uma seção de lavagem depois prepara o tecido para a próxima etapa de processamento. O processamento por lote no geral ocorre em um banho de processamento com o qual o tecido é contatado com aproximadamente 8 a 15 vezes o seu peso em banho químico. Depois de um período de reação, os produtos químicos são drenados, o tecido enxaguado e o
15 próximo produto químico é aplicado. O processamento por lote descontínuo envolve um saturador com o qual um peso igual aproximado de banho químico por peso do tecido é aplicado ao tecido, seguido por um período de interrupção, que, no caso de lote frio, pode ser de um ou mais dias.

Os vestuários tecidos são a forma prevalecente da construção
20 de tecido têxtil. O processo de tecelagem exige uma “encolamento” do fio de urdidura para protegê-lo da abrasão. Amido, álcool polivinílico (PVA), carboximetil celulose, ceras e aglutinantes acrílicos são exemplos de produtos químicos de encolamento típicos usados por causa de disponibilidade e custo. A goma deve ser removida depois do processo de tecelagem como a primeira
25 etapa na preparação dos vestuários tecidos. O tecido encolado na forma de corda ou largura aberta é levado em contato com o líquido de processamento contendo os agentes de desencolamento. O agente de desencolamento utilizado depende do tipo de goma a ser removida. Para as gomas de PVA, a água quente ou os processos oxidativos são freqüentemente usados. O agente

de encolamento mais comum para o tecido de algodão é fundamentado no amido. Portanto o mais freqüentemente, os panos de algodão tecidos são desencolados por uma combinação de água quente, a enzima alfa-amilase para hidrolisar o amido e um agente umectante ou tensoativo. O material
5 celulósico é deixado repousar com os produtos químicos de desencolamento durante um “período de contenção” suficientemente longo para realizar a desencolamento. O período de contenção é dependente do tipo de regime de processamento e da temperatura e pode variar de 15 minutos a 2 horas, ou em alguns casos, vários dias. Tipicamente, os produtos químicos de
10 desencolamento são aplicados em um banho de saturador que no geral varia de cerca de 15 graus Celsius a cerca de 55 graus Celsius. O tecido depois é mantido em equipamento tal como um “J-box” que fornece calor suficiente, usualmente entre cerca de 55 graus Celsius e cerca de 100 graus Celsius, para realçar a atividade dos agentes de desencolamento. Os produtos químicos,
15 incluindo os agentes de encolamento removidos, são lavados fora do tecido depois do término do período de contenção. De modo a garantir uma brancura alta ou uma umectabilidade boa e capacidade de retenção de pigmento resultante, os produtos químicos de goma e outros produtos químicos aplicados devem ser completamente removidos. No geral acredita-se que uma
20 desencolamento eficiente é de importância crucial para os processos de preparação seguintes: limpeza por esfregamento e alvejamento.

O processo de limpeza por esfregamento remove muitos dos compostos não celulósicos naturalmente encontrados no algodão. Além das impurezas não celulósicas naturais, a limpeza por esfregamento pode remover
25 sujeira, manchas e materiais introduzidos pela produção de resíduo tais como fiação, formação de cone ou lubrificantes de alisadeira de pano. O processo de limpeza por esfregamento utiliza hidróxido de sódio ou agentes causticizantes relacionados tais como carbonato de sódio, hidróxido de potássio ou misturas destes. No geral um tensoativo estável alcalino é adicionado ao processo para

realçar a solubilização dos compostos hidrofóbicos e/ou impedir sua redeposição de volta no tecido. O tratamento no geral é em uma temperatura alta, 80 a 100 graus Celsius, utilizando soluções fortemente alcalinas, pH 13 a 14, do agente de limpeza por esfregamento. Devido à natureza não específica dos processos químicos não apenas as impurezas mas a própria celulose é atacada, levando a danos na durabilidade ou outras propriedades do tecido desejáveis. A maciez do tecido celulósico é uma função das ceras de algodão natural residuais. A natureza não específica do processo de limpeza por esfregamento fortemente alcalino de temperatura alta não pode discriminar entre os lubrificantes de algodão natural desejáveis e os lubrificantes introduzidos pela fabricação. Além disso, o processo de limpeza por esfregamento convencional pode causar problemas ambientais devido ao efluente altamente alcalino destes processos. O estágio de limpeza por esfregamento prepara o tecido para a resposta ótima no alvejamento. Um tecido inadequadamente lavado com água corrente precisará de um nível mais alto de produto químico de alvejante nos estágios de alvejamento subsequentes. A etapa de alvejamento descolore os pigmentos de algodão natural e remove quaisquer componentes de refugo de algodão lenhoso natural residuais não removidos completamente durante o descaroçamento do algodão, cardagem ou limpeza por esfregamento. O processo principal no uso hoje é um alvejante de peróxido de hidrogênio alcalino. Em muitos casos, especialmente quando uma brancura muito alta não é necessária, o alvejamento pode ser combinado com a limpeza por esfregamento.

Nos exemplos abaixo é apresentado que a etapa de limpeza por esfregamento pode ser realizada usando a pectato liase ou a preparação da pectato liase da presente invenção em uma temperatura de cerca de 50 a 80 graus Celsius e um pH de cerca de 7 a 11, assim substituindo ou suplementando os agentes altamente causticizantes. Um processo enzimático otimizado garante uma remoção de pectina alta e umectabilidade total.

Degradação ou modificação do material vegetal

A enzima ou a preparação enzimática de acordo com a invenção preferivelmente é usada como um agente para a degradação ou modificação das paredes celulares vegetais ou qualquer material contendo pectina que origina de paredes celulares vegetais devido à atividade degradante da parede celular vegetal alta da variante da pectato liase da invenção.

A variante da pectato liase da presente invenção pode ser usada sozinha ou junto com outras enzimas como glicanases, pectinases e/ou hemicelulases para melhorar a extração de óleo a partir de material vegetal rico em óleo, como óleo de soja a partir de feijões de soja, óleo de oliva a partir de olivas ou óleo de semente de colza a partir de semente de colza ou óleo de girassol a partir de girassol.

A variante da pectato liase da presente invenção pode ser usada para a separação dos componentes dos materiais da célula vegetal. De interesse particular é a separação do material vegetal rico em açúcar ou amido em componentes de interesse comercial considerável (como sacarose a partir da beterraba ou amido a partir da batata) e em componentes de interesse baixo (como frações de polpa ou casca). Também, de interesse particular é a separação das safras ricas em proteína ou ricas em óleo em proteína e óleo valiosos e frações de casca não valiosos. O processo de separação pode ser realizado pelo uso de métodos conhecidos na técnica.

A variante da pectato liase da invenção também pode ser usada na preparação de suco de fruta ou vegetal de modo a aumentar o rendimento, e na hidrólise enzimática de vários materiais derivados da parede celular vegetal ou materiais inaproveitados, por exemplo, a partir da produção de vinho ou suco, ou resíduos agrícolas tais como cascas de vegetal, cascas de feijão, polpa de beterraba, polpa de oliva, polpa de batata, e outros.

O material vegetal pode ser degradado de modo a melhorar

tipos diferentes de processamento, facilitar a purificação ou extração de outro componente que não os galactanos como a purificação de pectinas a partir de cítricos, melhorar o valor de alimentação, diminuir a capacidade de ligação à água, melhorar a degradabilidade em plantas aquáticas inaproveitadas, 5 melhorar a conversão do material vegetal à ensilagem, etc.

Por meios de uma preparação enzimática da invenção é possível regular a consistência e a aparência da fruta ou vegetais processados. A consistência e a aparência foram apresentadas ser um produto da combinação real das enzimas usadas para o processamento, isto é, a 10 especificidade das enzimas com as quais a variante da pectato liase da invenção é combinada. Os exemplos incluem a produção de suco claro por exemplo, a partir de maçãs, pêras ou bagas; suco estável turvo por exemplo, a partir de maçãs, pêras, bagas, cítricos ou tomates; e purês por exemplo, a partir de cenouras e tomates.

15 A variante da pectato liase da invenção pode ser usada na modificação da viscosidade do material derivado da parede celular vegetal. Por exemplo, a variante da pectato liase pode ser usada para reduzir a viscosidade da alimentação contendo galactano e para promover o processamento de material contendo galactano viscoso. A redução da 20 viscosidade pode ser obtida tratando-se o material vegetal contendo galactano com uma preparação enzimática da invenção sob condições adequadas para a degradação total ou parcial do material contendo galactano.

A variante da pectato liase pode ser usada por exemplo, em combinação com outras enzimas para a remoção de substâncias pécticas a 25 partir de fibras vegetais. Esta remoção é essencial por exemplo, na produção de fibras têxteis ou outros materiais celulósicos. Para este propósito o material de fibra vegetal é tratado com uma quantidade adequada da pectato liase da invenção sob condições adequadas para obter degradação total ou parcial de substâncias pécticas associadas com o material de fibra vegetal.

Aditivo de alimentação animal

As variantes da pectato liase da presente invenção podem ser usadas para a modificação da alimentação animal e pode exercer seu efeito *in vitro* (modificando-se os componentes da alimentação) ou *in vivo*. A variante da pectato liase é particularmente apropriada para a adição às composições de alimentação animal contendo quantidades altas de arabinogalactanos ou galactanos, por exemplo, alimentação contendo material vegetal a partir de soja, semente de colza, tremoço etc. Quando adicionada à alimentação a variante da pectato liase melhora significativamente a decomposição *in vivo* do material da parede celular vegetal, com o qual uma melhor utilização dos nutrientes vegetais pelo animal é obtida. Por meio disso, a taxa de desenvolvimento e/ou razão de conversão de alimentação (isto é, o peso da alimentação ingerida relativo ao ganho de peso) do animal são melhoradas. Por exemplo o galactano indigerível é degradado pela pectato liase, por exemplo, em combinação com a beta-galactosidase, à galactose ou galactooligômeros que são digeríveis pelo animal e assim contribuem para a energia disponível da alimentação. Também, pela degradação do galactano, a pectato liase pode melhorar a digestibilidade e captação dos constituintes da alimentação que não o carboidrato tais como proteína, gordura e minerais.

Para outra descrição, a referência é feita para PCT/DK 96/00443 e um exemplo de trabalho neste.

Processamento de vinho e suco

A enzima ou a preparação enzimática da invenção podem ser usadas para a des-pectinização e redução da viscosidade em suco de vegetal ou fruta, especialmente em suco de maçã ou pêra. Isto pode ser efetuado tratando-se o suco de fruta ou vegetal com uma preparação enzimática da invenção em uma quantidade eficaz para degradar o material contendo pectina contido no suco de fruta ou vegetal.

A enzima ou a preparação enzimática podem ser usadas no

tratamento de mingau a partir de frutas e vegetais de modo a melhorar a extractabilidade ou a degradabilidade do mingau. Por exemplo, a preparação enzimática pode ser usada no tratamento de mingau a partir de maçãs e pêras para a produção de suco, e no tratamento do mingau de uvas para a produção de vinho.

A aplicabilidade das variantes da pectato liase com estabilidade em detergente melhorada é avaliada quando as variantes são usadas em um ambiente que compreende tensoativos.

DIVULGAÇÃO DO DETERGENTE E EXEMPLOS

10 **Sistema de tensoativo**

As composições detergentes de acordo com a presente invenção compreendem um sistema de tensoativo, em que o tensoativo pode ser seleccionado de tensoativos não iônicos e/ou aniônicos e/ou catiônicos e/ou anfóliticos e/ou zwitteriônicos e/ou semi-polares.

15 O tensoativo está presente tipicamente em um nível de 0,1% a 60% em peso.

O tensoativo preferivelmente é formulado para ser compatível com os componentes enzimáticos presentes na composição. Em composições líquidas ou em gel o tensoativo o mais preferivelmente é formulado de um tal modo que ele promove, ou pelo menos não degrada, a estabilidade de qualquer enzima nestas composições.

Os sistemas preferidos para serem usados de acordo com a presente invenção compreendem como um tensoativo um ou mais dos tensoativos não iônicos e/ou aniônicos descritos aqui.

25 Os condensados de óxido de polietileno, polipropileno, e polibutileno de alquil fenóis são adequados para o uso como o tensoativo não iônico dos sistemas de tensoativo da presente invenção, com os condensados de óxido de polietileno sendo preferidos. Estes compostos incluem os produtos de condensação dos alquil fenóis tendo um grupo alquila contendo

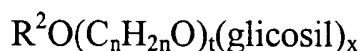
de cerca de 6 a cerca de 14 átomos de carbono, preferivelmente de cerca de 8 a cerca de 14 átomos de carbono, em uma configuração de cadeia reta ou cadeia ramificada com o óxido de alquilenos. Em uma forma de realização preferida, o óxido de etileno está presente em uma quantidade igual a cerca de 2 a cerca de 25 moles, mais preferivelmente de cerca de 3 a cerca de 15 moles, de óxido de etileno por mol de alquil fenol. Os tensoativos não iônicos comercialmente disponíveis deste tipo incluem Igepal[®] CO-630, comercializado pela GAF Corporation; e Triton[®] X-45, X-114, X-100 e X-102, todos comercializados pela Rohm & Haas Company. Estes tensoativos são comumente referidos como alcóxilatos de alquifenol (por exemplo, etóxilatos de alquil fenol).

Os produtos de condensação dos álcoois alifáticos primários e secundários com cerca de 1 a cerca de 25 moles de óxido de etileno são adequados para o uso como o tensoativo não iônico dos sistemas de tensoativo não iônico da presente invenção. A cadeia de alquila do álcool alifático pode ser reta ou ramificada, primária ou secundária, e no geral contém de cerca de 8 a cerca de 22 átomos de carbono. Preferidos são os produtos de condensação de álcoois tendo um grupo alquila contendo de cerca de 8 a cerca de 20 átomos de carbono, mais preferivelmente de cerca de 10 a cerca de 18 átomos de carbono, com de cerca de 2 a cerca de 10 moles de óxido de etileno por mol de álcool. Cerca de 2 a cerca de 7 moles de óxido de etileno e o mais preferivelmente de 2 a 5 moles de óxido de etileno por mol de álcool estão presentes nos ditos produtos de condensação. Os exemplos de tensoativos não iônicos comercialmente disponíveis deste tipo incluem Tergitol[®] 15-S-9 (o produto de condensação do álcool linear C₁₁-C₁₅ com 9 moles de óxido de etileno), Tergitol[®] 24-L-6 NMW (o produto de condensação do álcool primário C₁₂-C₁₄ com 6 moles de óxido de etileno com uma distribuição de peso molecular limitada), ambos comercializados pela Union Carbide Corporation; Neodol[®] 45-9 (o produto de condensação do

álcool linear C₁₄-C₁₅ com 9 moles de óxido de etileno), Neodol[®] 23-3 (o produto de condensação do álcool linear C₁₂-C₁₃ com 3,0 moles de óxido de etileno), Neodol[®] 45-7 (o produto de condensação do álcool linear C₁₄-C₁₅ com 7 moles de óxido de etileno), Neodol[®] 45-5 (o produto de condensação do álcool linear C₁₄-C₁₅ com 5 moles de óxido de etileno) comercializados pela Shell Chemical Company, Kyro[®] EOB (o produto de condensação do álcool C₁₃-C₁₅ com 9 moles óxido de etileno), comercializado pela The Procter & Gamble Company, e Genapol LA 050 (o produto de condensação do álcool C₁₂-C₁₄ com 5 moles de óxido de etileno) comercializado por Hoechst. A faixa preferida de HLB nestes produtos é de 8 a 11 e a mais preferida de 8 a 10.

Também úteis como o tensoativo não iônico dos sistemas de tensoativo da presente invenção são os alquilpolissacarídeos divulgados na US 4.565.647, tendo um grupo hidrofóbico contendo de cerca de 6 a cerca de 30 átomos de carbono, preferivelmente de cerca de 10 a cerca de 16 átomos de carbono e um polissacarídeo, por exemplo, um poliglicosídeo, grupo hidrofílico contendo de cerca de 1,3 a cerca de 10, preferivelmente de cerca de 1,3 a cerca de 3, o mais preferivelmente de cerca de 1,3 a cerca de 2,7 unidades de sacarídeo. Qualquer sacarídeo de redução contendo 5 ou 6 átomos de carbono pode ser usado, por exemplo, glicose, galactose e as porções galactosílicas podem ser substituídas no lugar das porções glicosílicas (opcionalmente o grupo hidrofóbico é ligado nas posições 2, 3, 4, etc. fornecendo assim uma glicose ou galactose como oposto a um glicosídeo ou galactosídeo). As ligações intersacarídeo podem ser, por exemplo, entre a posição um das unidades de sacarídeo adicionais e as posições 2, 3, 4, e/ou 6 nas unidades de sacarídeo precedentes.

Os alquilpoliglicosídeos preferidos têm a fórmula



em que R² é selecionado do grupo que consiste de alquila,

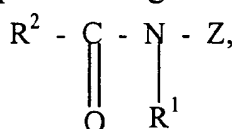
alquilfenila, hidroxialquila, hidroxialquilfenila, e misturas destes em que os grupos alquila contêm de cerca de 10 a cerca de 18, preferivelmente de cerca de 12 a cerca de 14, átomos de carbono; n é 2 ou 3, preferivelmente 2; t é de 0 a cerca de 10, preferivelmente 0; e x é de cerca de 1,3 a cerca de 10, preferivelmente de cerca de 1,3 a cerca de 3, o mais preferivelmente de cerca de 1,3 a cerca de 2,7. A glicosila preferivelmente é derivada de glicose. Para preparar estes compostos, o álcool ou álcool alquilpolietóxi é formado primeiro e depois reagido com glicose, ou uma fonte de glicose, para formar o glicosídeo (ligação na posição 1). As unidades de glicosil adicionais depois podem ser ligadas entre sua posição 1 e posição 2, 3, 4 e/ou 6 das unidades de glicosil precedentes, preferível e predominantemente a posição 2.

Os produtos de condensação de óxido de etileno com uma base hidrofóbica formada pela condensação do óxido de propileno com o propileno glicol também são adequados para o uso como os sistemas de tensoativo não iônico adicionais da presente invenção. A porção hidrofóbica destes compostos preferivelmente terá um peso molecular de cerca de 1500 a cerca de 1800 e exibirá insolubilidade em água. A adição de porções de polioxietileno a esta porção hidrofóbica tende a aumentar a solubilidade em água da molécula como um total, e o caráter líquido do produto é mantido até o ponto onde o teor de polioxietileno é cerca de 50% do peso total do produto de condensação, que corresponde à condensação com até cerca de 40 moles de óxido de etileno. Os exemplos dos compostos deste tipo incluem certos dos tensoativos de Pluronic[®] comercialmente disponíveis, comercializado pela BASF.

Também adequados para o uso como o tensoativo não iônico do sistema de tensoativo não iônico da presente invenção, são os produtos de condensação de óxido de etileno com o produto que resulta da reação do óxido de propileno e etilenodiamina. A porção hidrofóbica destes produtos consiste do produto de reação da etilenodiamina e óxido de propileno em

excesso, e no geral tem um peso molecular de cerca de 2500 a cerca de 3000. Esta porção hidrofóbica é condensada com óxido de etileno na medida em que o produto de condensação contém de cerca de 40% a cerca de 80% em peso de polioxietileno e tem um peso molecular de cerca de 5.000 a cerca de 11.000. Os exemplos deste tipo de tensoativo não iônico incluem certos dos compostos de Tetronic® comercialmente disponíveis, comercializado pela BASF.

Preferidos para o uso como o tensoativo não iônico dos sistemas de tensoativo da presente invenção são os condensados de óxido de polietileno de alquil fenóis, produtos de condensação de álcoois alifáticos primários e secundários com de cerca de 1 a cerca de 25 moles de óxido de etileno, alquilpolissacarídeos, e misturas destes. Os mais preferidos são etoxilatos de alquil fenol C₈-C₁₄ tendo de 3 a 15 grupos etóxi e etoxilatos do álcool C₈-C₁₈ (preferivelmente C₁₀ médio) tendo de 2 a 10 grupos etóxi, e misturas destes. Os tensoativos não iônicos altamente preferidos são tensoativos de amida de ácido poliidroxi graxo da fórmula:



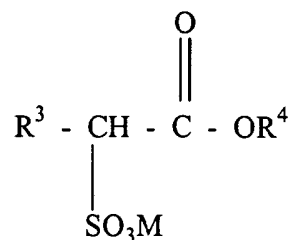
em que R¹ é H, ou R¹ é hidrocarbila C₁₋₄, 2-hidroxietila, 2-hidroxipropila ou uma mistura destes, R² é hidrocarbila C₅₋₃₁, e Z é um poliidroxiidrocarbila tendo uma cadeia hidrocarbila linear com pelo menos 3 hidroxilas diretamente conectadas à cadeia, ou um derivado alcoxlado deste. Preferivelmente, R¹ é metila, R² é cadeia de alquila C₁₁₋₁₅ ou alquila C₁₆₋₁₈ ou alquenila reta tal como alquila de coco ou misturas deste, e Z é derivado de um açúcar de redução tal como glicose, frutose, maltose ou lactose, em uma reação de aminação redutiva.

Os tensoativos aniônicos altamente preferidos incluem tensoativos de alquil sulfato alcoxlado. Os Exemplos destes são sais ou ácidos solúveis em água da fórmula RO(A)_mSO₃M em que R é um grupo

alquila ou hidroxialquila $C_{10}-C_{24}$ não substituído tendo um componente alquila $C_{10}-C_{24}$, preferivelmente alquila ou hidroxialquila $C_{12}-C_{20}$, mais preferivelmente alquila ou hidroxialquila $C_{12}-C_{18}$, A é uma unidade etóxi ou propóxi, m é maior do que zero, tipicamente entre cerca de 0,5 e cerca de 6, mais preferivelmente entre cerca de 0,5 e cerca de 3, e M é H ou um cátion que pode ser, por exemplo, um cátion de metal (por exemplo, sódio, potássio, lítio, cálcio, magnésio, etc.), amônio ou cátion de amônio substituído. Os alquil sulfatos etoxilados assim como os alquil sulfatos propoxilados são aqui considerados. Os exemplos específicos de cátions de amônio substituído incluem cátions de metil-, dimetil, trimetil-amônio e cátions de amônio quaternário tais como tetrametil-amônio e cátions de dimetil piperidínio e aqueles derivados de alquilaminas tais como etilamina, dietilamina, trietilamina, misturas destes, e outros. Os tensoativos exemplares são sulfato de polietoxilato de alquila $C_{12}-C_{18}$ (1,0) ($C_{12}-C_{18}E(1,0)M$), sulfato de polietoxilato de alquila $C_{12}-C_{18}$ (2,25) ($C_{12}-C_{18}(2,25)M$), e sulfato de polietoxilato de alquila $C_{12}-C_{18}$ (3,0) ($C_{12}-C_{18}E(3,0)M$), e sulfato de polietoxilato de alquila $C_{12}-C_{18}$ (4,0) ($C_{12}-C_{18}E(4,0)M$), em que M é convenientemente selecionado de sódio e potássio.

Os tensoativos aniônicos adequados a serem usados são tensoativos sulfonados de éster alquílico incluindo ésteres lineares de ácidos carboxílicos C_8-C_{20} (isto é, ácidos graxos) que são sulfonados com SO_3 gasoso de acordo com "The Journal of the American Oil Chemists Society", 52 (1975), páginas 323 a 329. Os materiais de partida adequados poderiam incluir substâncias graxas naturais como os derivados de sebo, óleo de palma, etc.

O tensoativo sulfonado de éster alquílico preferido, especialmente para as aplicações de lavagem de roupa, compreende os tensoativos sulfonados de éster alquílico da fórmula estrutural:



em que R^3 é um hidrocarbila $\text{C}_8\text{-C}_{20}$, preferivelmente um alquila, ou combinação deste, R^4 é um hidrocarbila $\text{C}_1\text{-C}_6$, preferivelmente um alquila, ou combinação deste, e M é um cátion que forma um sal solúvel em água com o sulfonato de éster alquílico. Os cátions que formam sal adequados incluem os metais tais como sódio, potássio, e lítio, e cátions de amônio substituído ou não substituído, tais como monoetanolamina, dietanolamina, e trietanolamina. Preferivelmente, R^3 é alquila $\text{C}_{10}\text{-C}_{16}$, e R^4 é metila, etila ou isopropila. Especialmente preferidos são os sulfonatos de éster metílico em que R^3 é alquila $\text{C}_{10}\text{-C}_{16}$.

Outros tensoativos aniônicos adequados incluem os tensoativos de sulfato de alquila que são sais ou ácidos solúveis em água da fórmula ROSO_3M em que R preferivelmente é um hidrocarbila $\text{C}_{10}\text{-C}_{24}$, preferivelmente um alquila ou hidroxialquila tendo um componente alquila $\text{C}_{10}\text{-C}_{20}$, mais preferivelmente um alquila ou hidroxialquila $\text{C}_{12}\text{-C}_{18}$, e M é H ou um cátion, por exemplo, um cátion de metal alcalino (por exemplo, sódio, potássio, lítio), ou amônio ou substituído amônio (por exemplo, cátions de metil-, dimetil-, e trimetil amônio e cátions de amônio quaternário tais como tetrametil-amônio e cátions de dimetil piperdínio e cátions de amônio quaternário derivados de alquilaminas tais como etilamina, dietilamina, trietilamina, e misturas destes, e outros). Tipicamente, cadeias de alquila de $\text{C}_{12}\text{-C}_{16}$ são preferidas para as temperaturas de lavagem mais baixas (por exemplo, abaixo cerca de 50 graus Celsius) e as cadeias de alquila $\text{C}_{16}\text{-C}_{18}$ são preferidas para as temperaturas de lavagem mais altas (por exemplo, acima cerca de 50 graus Celsius).

Outros tensoativos aniônicos úteis para propósitos detergentes

também podem ser incluídos nas composições detergentes de lavagem de roupa da presente invenção. Estas podem incluir sais (incluindo, por exemplo, sódio, potássio, amônio, e sais de amônio substituídos tais como sais de mono-, di- e trietanolamina) de sabão, alcanossulfonados primários ou secundários C_8-C_{22} , olefinsulfonados C_8-C_{24} , ácidos policarboxílicos sulfonados preparados pela sulfonação do produto pirolizado de citratos metal alcalino terroso, por exemplo, como descrito no Pedido de Patente Britânico Nº 1.082.179, sulfatos de éter alquilpoliglicólico C_8-C_{24} (contendo até 10 moles de óxido de etileno); sulfonatos de alquil glicerol, sulfonados de acil glicerol graxo, sulfatos de oleil glicerol graxo, sulfatos de éter de óxido de etileno alquil fenólico, sulfonados de parafina, fosfatos de alquila, isetionatos tais como os isetionatos de acila, tauratos de N-acila, succinamatos e sulfossuccinatos de alquila, monoésteres de sulfossuccinatos (especialmente monoésteres $C_{12}-C_{18}$ saturados e insaturado) e diésteres de sulfossuccinatos (especialmente diésteres C_6-C_{12} saturados e insaturados), sarcosinatos de acila, sulfatos de alquilpolissacarídeos tais como os sulfatos de alquilpoliglicosídeo (os compostos não sulfatados não iônicos sendo descritos abaixo), sulfatos de alquila primário ramificados, e carboxilatos de alquil polietóxi tais como aqueles da fórmula $RO(CH_2CH_2O)_k-CH_2COO-M^+$ em que R é um alquila C_8-C_{22} , k é um número inteiro de 1 a 10, e M é um sal solúvel que forma cátion. Os ácidos de resina e os ácidos de resina hidrogenada também são adequados, tais como colofonia de breu, colofonia de breu hidrogenada, e ácidos de resina e ácidos de resina hidrogenada presentes ou derivados de tall oil.

Os sulfonatos de alquilbenzeno são altamente preferidos. Especialmente preferidos são os sulfonatos de alquil benzeno lineares (cadeia reta) (LAS) em que o grupo alquila preferivelmente contém de 10 a 18 átomos de carbono.

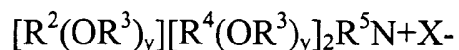
Outros exemplos são descritos em "Surface Active Agents and

Detergents” (Vol. 1 e 11 por Schwartz, Perry e Berch). Uma variedade de tais tensoativos também é no geral divulgada na US 3.929.678, (Coluna 23, linha 58 através da Coluna 29, linha 23, aqui incorporado por referência).

Quando incluídas nesta, as composições detergentes de lavagem de roupa da presente invenção tipicamente compreendem de cerca de 1% a cerca de 40%, preferivelmente de cerca de 3% a cerca de 20% em peso de tais tensoativos aniônicos.

As composições detergentes de lavagem de roupa da presente invenção também podem conter tensoativos catiônicos, anfotéricos, zwitteriônicos, e semi-polares, assim como os tensoativos não iônicos e/ou aniônicos outros que não aqueles já descritos aqui.

Os tensoativos detergentes catiônicos adequados para o uso nas composições detergentes de lavagem de roupa da presente invenção são aqueles tendo um grupo hidrocarbila de cadeia longa. Os exemplos de tais tensoativos catiônicos incluem o tensoativos de amônio tais como alquiltrimetilamônio halogenetos, e aqueles tensoativos tendo a fórmula:



em que R^2 é um grupo alquila ou alquil benzila tendo de cerca de 8 a cerca de 18 átomos de carbono na cadeia de alquila, cada R^3 é selecionado do grupo que consiste de $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)-$, $-CH_2CH(CH_2OH)-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, e misturas destes; cada R^4 é selecionado do grupo que consiste de alquila C_1-C_4 , hidroalquila C_1-C_4 , estruturas do anel benzílico formadas ligando-se os dois grupos R^4 , $-CH_2CHOHCHOHCOR^6CHOH-CH_2OH$, em que R^6 é qualquer hexose ou polímero de hexose tendo um peso molecular menor do que cerca de 1000, e hidrogênio quando y não é 0; R^5 é o mesmo como R^4 ou é uma cadeia de alquila, em que o número total de átomos de carbono ou R^2 mais R^5 não é maior do que cerca de 18; cada y é de 0 a cerca de 10, e a soma dos valores de y é de 0 a cerca de 15; e X é qualquer ânion compatível.

Os tensoativos catiônicos altamente preferidos são os compostos de amônio quaternário solúveis em água úteis na presente composição tendo a fórmula:



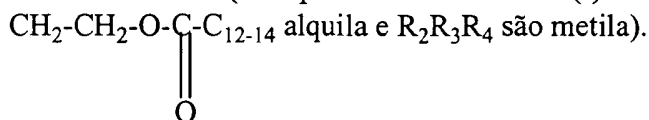
em que R_1 é alquila C_8-C_{16} , cada um de R_2 , R_3 e R_4 é independentemente alquila C_1-C_4 , hidróxi alquila C_1-C_4 , benzila, e $-(C_2H_4)_xH$ onde x tem um valor de 2 a 5, e X é um ânion. Não mais do que um de R_2 , R_3 ou R_4 devem ser benzila.

O comprimento de cadeia de alquila preferido para R_1 é $C_{12}-C_{15}$, particularmente onde o grupo alquila é uma mistura de comprimentos de cadeia derivados de gordura de coco ou dendê ou são derivados sinteticamente pela formação de olefina ou síntese de álcoois OXO.

Os grupos preferidos para R_2R_3 e R_4 são os grupos metila e hidroxietila e o ânion X pode ser selecionado de íons haleto, metossulfato, acetato e fosfato.

Os exemplos de compostos de amônio quaternário adequados da fórmula (i) para o uso aqui são:

cloreto ou brometo de coco trimetil amônio;
 cloreto ou brometo de coco metil dihidroxietil amônio;
 cloreto de decil trietil amônio;
 cloreto ou brometo de decil dimetil hidroxietil amônio;
 cloreto ou brometo de dimetil hidroxietil amônio C_{12-15} ;
 cloreto ou brometo de coco dimetil hidroxietil amônio;
 metil sulfato de miristil trimetil amônio;
 cloreto ou brometo de lauril dimetil benzil amônio;
 cloreto ou brometo de lauril dimetil (etenóxi)₄ amônio;
 ésteres colínicos (compostos da fórmula (i) em que R_1 é



di-alquil imidazolinas [compostos da fórmula (i)].

Outros tensoativos catiônicos úteis aqui também são descritos na US 4.228.044 e na EP 0 000 224.

Quando incluídas nesta, as composições detergentes de lavagem de roupa da presente invenção tipicamente compreendem de 0,2% a cerca de 25%, preferivelmente de cerca de 1% a cerca de 8% em peso de tais tensoativos catiônicos.

Os tensoativos anfolíticos também são adequados para o uso nas composições detergentes de lavagem de roupa da presente invenção. Estes tensoativos podem ser amplamente descritos como derivados alifáticos de aminas secundárias ou terciárias, ou derivados alifáticos de aminas secundárias e terciárias heterocíclicas em que o radical alifático pode ser de cadeia reta ou ramificada. Um dos substituintes alifáticos contém pelo menos cerca de 8 átomos de carbono, tipicamente de cerca de 8 a cerca de 18 átomos de carbono, e pelo menos um contém um grupo que solubiliza em água aniônico, por exemplo, carbóxi, sulfonato, sulfato. Ver a US 3.929.678 (coluna 19, linhas 18 a 35) para exemplos de tensoativos anfolíticos.

Quando incluídas nesta, as composições detergentes de lavagem de roupa da presente invenção tipicamente compreendem de 0,2% a cerca de 15%, preferivelmente de cerca de 1% a cerca de 10% em peso de tais tensoativos anfolíticos.

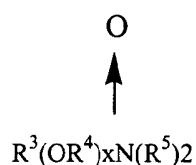
Os tensoativos zwitteriônicos também são adequados para o uso nas composições detergentes de lavagem de roupa. Estes tensoativos podem ser amplamente descritos como derivados de aminas secundárias e terciárias, derivados de aminas secundárias e terciárias heterocíclicas, ou derivados de compostos de amônio quaternário, fosfônio quaternário ou sulfônio terciário. Ver a US 3.929.678 (coluna 19, linha 38 através da coluna 22, linha 48) para exemplos de tensoativos zwitteriônicos.

Quando incluídas nesta, as composições detergentes de

lavagem de roupa da presente invenção tipicamente compreendem de 0,2% a cerca de 15%, preferivelmente de cerca de 1% a cerca de 10% em peso de tais tensoativos zwitteriônicos.

Os tensoativos não iônicos semi-polares são uma categoria especial de tensoativos não iônicos que inclui óxidos de amina solúveis em água contendo uma porção alquila de cerca de 10 a cerca de 18 átomos de carbono e 2 porções selecionadas do grupo que consiste de grupos alquila e grupos hidroxialquila contendo de cerca de 1 a cerca de 3 átomos de carbono; óxidos de fosfino solúveis em água contendo uma porção alquila de cerca de 10 a cerca de 18 átomos de carbono e 2 porções selecionadas do grupo que consiste de grupos alquila e grupos hidroxialquila contendo de cerca de 1 a cerca de 3 átomos de carbono; e sulfóxidos solúveis em água contendo uma porção alquila de cerca de 10 a cerca de 18 átomos de carbono e uma porção selecionada do grupo que consiste de porções alquila e hidroxialquila de cerca de 1 a cerca de 3 átomos de carbono.

Os tensoativos detergentes não iônicos semi-polares incluem os tensoativos de óxido de amina tendo a fórmula:



em que R^3 é um grupo alquila, hidroxialquila, ou alquil fenila ou misturas destes contendo de cerca de 8 a cerca de 22 átomos de carbono; R^4 é um grupo alquilenos ou hidroxialquilenos contendo de cerca de 2 a cerca de 3 átomos de carbono ou misturas destes; x é de 0 a cerca de 3; e cada R^5 é um grupo alquila ou hidroxialquila contendo de cerca de 1 a cerca de 3 átomos de carbono ou um grupo de óxido de polietileno contendo de cerca de 1 a cerca de 3 grupos de óxido de etileno. Os grupos R^5 podem ser ligados um ao outro, por exemplo, através de um átomo de oxigênio ou nitrogênio, para formar uma estrutura do anel.

Estes tensoativos de óxido de amina em particular incluem

óxidos de alquila C₁₀-C₁₈ dimetil amina e óxidos de alcóxi C₈-C₁₂ etil diidróxi etil amina.

Quando incluídas nesta, as composições detergentes de lavagem de roupa da presente invenção tipicamente compreendem de 0,2% a
5 cerca de 15%, preferivelmente de cerca de 1% a cerca de 10% em peso de tais tensoativo não iônicos semi-polares.

Sistema construtor

As composições de acordo com a presente invenção podem compreender ainda um sistema construtor. Qualquer sistema construtor
10 convencional é adequado para o uso aqui incluindo materiais de aluminosilicato, silicatos, policarboxilatos e ácidos graxos, materiais tais como tetraacetato de etilenodiamina, sequestradores de íon metal tais como aminopolifosfonatos, particularmente ácido etilenodiamina tetrametileno
fosfônico e ácido dietileno triamina pentametileno fosfônico. Ainda que
15 menos preferidos por razões ambientais óbvias, os construtores de fosfato também podem ser aqui usados.

Os construtores adequados podem ser um material de troca de íon inorgânico, comumente um material de aluminossilicato hidratado inorgânico, mais particularmente uma zeólito sintética hidratada tal como
20 zeolite A, X, B, HS ou MAP hidratada.

Um outro material construtor inorgânico adequado é o silicato estendido em camada, por exemplo, SKS-6 (Hoechst). O SKS-6 é um silicato estendido em camada cristalino consistindo de silicato de sódio (Na₂Si₂O₅).

Os policarboxilatos adequados contendo um grupo carbóxi
25 incluem ácido láctico, ácido glicólico e derivados de éter destes como divulgado nas Patentes Belgas N^{os} 831.368, 821.369 e 821.370. os policarboxilatos contendo dois grupos carbóxi incluem os sais solúveis em água do ácido succínico, ácido malônico, ácido (etilenodióxi) diacético, ácido maléico, ácido diglicólico, ácido tartárico, ácido tartrônico e ácido fumárico,

assim como os carboxilatos de éter descritos em *Offenle-enschrift* Alemã 2.446.686, e 2.446.487, US 3.935.257 e os carboxilatos de sulfinila descritos na Patente Belga Nº 840.623. Os policarboxilatos contendo três grupos carbóxi incluem, em particular, citratos solúveis em água, aconitratos e
5 citraconatos assim como derivados de succinato tais como os carboximetiloxissuccinatos descritos na Patente Britânica Nº 1.379.241, lactoxissuccinatos descritos no Pedido dos Países Baixos 7205873, e os materiais de oxipolicarboxilato tais como tricarboxilatos de 2-oxa-1,1,3-propano descritos na Patente Britânica Nº 1.387.447.

10 Os policarboxilatos contendo quatro grupos carbóxi incluem oxidissuccinatos divulgados na Patente Britânica Nº 1.261.829, tetracarboxilatos de 1,1,2,2-etano, tetracarboxilatos de 1,1,3,3-propano contendo substituintes de sulfo incluem os derivados de sulfossuccinato divulgados nas Patentes Britânicas Nº^{os} 1.398.421 e 1.398.422 e na US
15 3.936.448, e os citratos pirolizados de sulfonato descritos na Patente Britânica Nº 1.082.179, enquanto que os policarboxilatos contendo substituintes de fosfona são divulgados na Patente Britânica Nº 1.439.000.

Os policarboxilatos alicíclicos e heterocíclicos incluem cis,cis-cis-tetracarboxilatos de ciclopentano, pentacarboxilatos de ciclopentadienida,
20 cis,cis,cis-tetracarboxilatos de 2,3,4,5-tetraidro-furano, cis-discarboxilatos de 2,5-tetraidro-furano, tetracarboxilatos de 2,2,5,5,-tetraidrofurano, hexacarboxilatos de 1,2,3,4,5,6-hexano e derivados de carboximetila de álcoois poliídricos tais como sorbitol, manitol e xilitol. Os policarboxilatos aromáticos incluem ácido melítico, ácido piromelítico e os derivados de ácido
25 ftálico divulgados na Patente Britânica Nº 1.425.343.

Dos acima, os policarboxilatos preferidos são os hidróxi-carboxilatos contendo até três grupos carbóxi por molécula, mais particularmente citratos.

Os sistemas construtores preferidos para o uso nas presente

composições incluem uma mistura de um construtor de aluminossilicato insolúvel em água tal como zeólito A ou de um silicato estendido em camada (SKS-6), e um agente quelante de carboxilato solúvel em água tal como ácido cítrico.

5 Um quelante adequado para a inclusão nas composições detergentes de acordo com a invenção é o ácido etilenodiamina-N,N'-dissuccínico (EDDS) ou o metal alcalino, metal alcalino terroso, amônio, ou sais de amônio substituídos deste, ou misturas destes. Os compostos de EDDS preferidos são a forma de ácido livre e o sal de sódio ou magnésio deste. Os
10 exemplos de tais sais de sódio preferidos de EDDS incluem Na_2EDDS e Na_4EDDS . Os exemplos de tais sais de magnésio preferidos de EDDS incluem MgEDDS e Mg_2EDDS . Os sais de magnésio são os mais preferidos para a inclusão nas composições de acordo com a invenção.

Os sistemas construtores preferidos incluem uma mistura de
15 um construtor de aluminossilicato insolúvel em água tal como zeólito A, e um agente quelante de carboxilato solúvel em água tal como o ácido cítrico.

Outros materiais construtores que podem formar parte do sistema construtor para o uso em composições granulares incluem os materiais inorgânicos tais como carbonatos, bicarbonatos, silicatos de metal
20 alcalino, e materiais orgânicos tais como os fosfonatos orgânicos, fosfonatos de amino polialquilenos e policarboxilatos de amino.

Outros sais orgânicos solúveis em água adequados são os ácidos homo- ou co-polimérico ou seus sais, em que o ácido policarboxílico compreende pelo menos dois radicais carboxila separados um do outro por
25 não mais do que dois átomos de carbono.

Os polímeros deste tipo são divulgados na GB-A-1.596.756. Os exemplos de tais sais são os poliácridatos de PM de 2000 a 5000 e seus copolímeros com anidrido maléico, tais copolímeros tendo um peso molecular de 20.000 a 70.000, especialmente cerca de 40.000.

Os sais construtores de detergência são normalmente incluídos em quantidades de 5% a 80% em peso da composição. Os níveis preferidos de construtor para os detergentes líquidos são de 5% a 30%.

Enzimas

5 As composições detergentes preferidas, além da preparação da pectato liase da invenção, compreendem outra(s) enzima(s) que fornece(m) desempenho de limpeza e/ou benefícios de cuidado com o tecido. De acordo com a presente invenção, as enzimas adicionais podem ser modificadas de modo a melhorar a estabilidade de oxidação e supressão de cálcio.

10 Tais enzimas incluem proteases, lipases, cutinases, amilases, celulasas, peroxidases, oxidases (por exemplo, lacases), hemicelulasas, tais como mananases, xilanases, galactanases, arabinofuranosidasas, esterases, liquenases, arabinanases e outras pectato liases.

Proteases: Qualquer protease adequada para o uso em soluções
15 alcalinas pode ser usada. As proteases adequadas incluem aquelas de origem animal, vegetal ou microbiana. A origem microbiana é preferida. Os mutantes química ou geneticamente modificados são incluídos. A protease pode ser uma serina protease, preferivelmente uma protease microbiana alcalina ou uma protease do tipo tripsina. Os exemplos de proteases alcalinas são
20 subtilisinas, especialmente aquelas derivadas de *Bacillus*, por exemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 e subtilisina 168 (descrita na WO 89/06279). Os exemplos de proteases do tipo tripsina são tripsina (por exemplo, de origem suína ou bovina) e a protease de *Fusarium* descrita na WO 89/06270.

25 As enzimas protease comercialmente disponíveis preferidas incluem aquelas vendidas sob os nomes comerciais Alcalase, Savinase, Primase, Durazym, e Esperase por Novo Nordisk A/S (Dinamarca), aquelas vendidas sob o nome comercial Maxatase, Maxacal, Maxapem, Properase, Purafect e Purafect OXP por Genencor International, e aquelas vendidas sob o

nome comercial Opticlean e Optimase por Solvay Enzymes. As enzimas protease podem ser incorporadas nas composições de acordo com a invenção em um nível de 0,00001% a 2% de proteína enzimática em peso da composição, preferivelmente em um nível de 0,0001% a 1% de proteína enzimática em peso da composição, mais preferivelmente em um nível de 0,001% a 0,5% de proteína enzimática em peso da composição, ainda mais preferivelmente em um nível de 0,01% a 0,2% de proteína enzimática em peso da composição.

Lipases: Qualquer lipase adequada para o uso em soluções alcalinas pode ser usada. As lipases adequadas incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Os mutantes química ou geneticamente modificados são incluídos.

Os Exemplos de lipases úteis incluem uma lipase de *Humicola lanuginosa*, por exemplo, como descrito na EP 258 068 e EP 305 216, uma lipase de *Rhizomucor miehei*, por exemplo, como descrito na EP 238 023, uma lipase de *Candida*, tal como uma lipase de *C. antarctica*, por exemplo, a lipase A ou B de *C. antarctica* descrita na EP 214 761, uma lipase de *Pseudomonas* tal como uma lipase de *P. alcaligenes* e *P. pseudoalcaligenes*, por exemplo, como descrito na EP 218 272, uma lipase de *P. cepacia*, por exemplo, como descrito na EP 331 376, uma lipase de *P. stutzeri*, por exemplo, como divulgado na GB 1.372.034, uma lipase de *P. fluorescens*, uma lipase de *Bacillus*, por exemplo, uma lipase de *B. subtilis* (Dartois *et al.*, (1993), Biochemica et Biophysica acta 1131, 253 a 260), uma lipase de *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) e uma lipase de *B. pumilus* (WO 91/16422).

Além disso, várias lipases clonadas podem ser úteis, incluindo a lipase de *Penicillium camembertii* descrita por Yamaguchi *et al.*, (1991), Gene 103, 61 a 67), a lipase de *Geotricum candidum* (Schimada, Y. *et al.*, (1989), J. Biochem., 106, 383 a 388), e várias lipases de *Rhizopus* tais como

uma lipase de *R. delemar* (Hass, M. J. *et al.*, (1991), Gene 109, 117 a 113), uma lipase de *R. niveus* (Kugimiya *et al.*, (1992), Biosci. Biotech. Blochem. 56, 716 a 719) e uma lipase de *R. oryzae*.

Outros tipos de enzimas lipolíticas tais como as cutinases
5 também podem ser úteis, por exemplo, uma cutinase derivada de *Pseudomonas mendocina* como descrito na WO 88/09367, ou uma cutinase derivada de *Fusarium solani pisi* (por exemplo, descrito na WO 90/09446).

As lipases especialmente adequadas são lipases tais como M1 Lipase[®], Luma fast[®] e Lipo-mak[®] (Genencor), Lipolase[®] e Lipolase Ultra[®]
10 (Novo Nordisk A/S), e Lipase P “Amano” (Amano Pharmaceutical Co. Ltd.).

As lipases são normalmente incorporadas na composição detergente em um nível de 0,00001% a 2% de proteína enzimática em peso da composição, preferivelmente em um nível de 0,0001% a 1% de proteína enzimática em peso da composição, mais preferivelmente em um nível de
15 0,001% a 0,5% de proteína enzimática em peso da composição, ainda mais preferivelmente em um nível de 0,01% a 0,2% de proteína enzimática em peso da composição.

Amilases: Qualquer amilase (alfa e/ou beta) adequada para o uso em soluções alcalinas pode ser usada. As amilases adequadas incluem
20 aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Os mutantes química ou geneticamente modificados são incluídos. As amilases incluem, por exemplo, alfa-amilases obtidas de uma cepa especial de *B. licheniformis*, descrita em mais detalhe na GB 1.296.839. As amilases comercialmente disponíveis são Duramyl[®], Termamyl[®], Fungamyl[®] e BAN[®] (disponíveis da Novo Nordisk
25 A/S) e Rapidase[®], Maxamyl[®], Purastar[®] e Purastar OxAm[®] (disponíveis da Genencor). Além disso, uma amilase com mais do que 70% de homologia para SP707 (Tsukamoto, A. *et al.*, 1988. Biochem. Biophys. Res. Commun. 151: 25) ou K38 (Kao Corp. EP 1022334) é adequada”.

As amilases são normalmente incorporadas na composição

detergente em um nível de 0,00001% a 2% de proteína enzimática em peso da composição, preferivelmente em um nível de 0,0001% a 1% de proteína enzimática em peso da composição, mais preferivelmente em um nível de 0,001% a 0,5% de proteína enzimática em peso da composição, ainda mais preferivelmente em um nível de 0,01% a 0,2% de proteína enzimática em peso da composição.

Celulases: Qualquer celulase adequada para o uso em soluções alcalinas pode ser usada. As celulases adequadas incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Os mutantes química ou geneticamente modificados são incluídos. As celulases adequadas são divulgadas na US 4.435.307, que divulga celulases fúngicas produzidas a partir de *Humicola insolens*. As celulases especialmente adequadas são as celulases tendo benefícios de proteção da cor. Os exemplos de tais celulases são as celulases descritas no Pedido de Patente Europeu N° 0 495 257.

As celulases comercialmente disponíveis incluem Celluzyme® produzido por uma cepa de *Humicola insolens*, (Novo Nordisk A/S), e KAC-500(B)® (Kao Corporation).

As celulases são normalmente incorporadas na composição detergente em um nível de 0,00001% a 2% de proteína enzimática em peso da composição, preferivelmente em um nível de 0,0001% a 1% de proteína enzimática em peso da composição, mais preferivelmente em um nível de 0,001% a 0,5% de proteína enzimática em peso da composição, ainda mais preferivelmente em um nível de 0,01% a 0,2% de proteína enzimática em peso da composição.

Peroxidases/Oxidases: As enzimas peroxidase são usadas em combinação com o peróxido de hidrogênio ou uma fonte deste (por exemplo, um percarbonato, perborato ou persulfato). As enzimas oxidase são usadas em combinação com o oxigênio. Ambos os tipos de enzimas são usados para o “alveijamento da solução”, isto é, para impedir a transferência de um corante

de tecido a partir de um tecido tingido a um outro tecido quando os ditos tecidos são lavados juntos em um líquido de lavagem, preferivelmente junto com um agente realçador como descrito por exemplo, na WO 94/12621 e WO 95/01426. As peroxidases/oxidases adequadas incluem aquelas de origem
5 vegetal, bacteriana ou fúngica. Os mutantes química ou geneticamente modificados são incluídos.

As enzimas peroxidase e/ou oxidase são normalmente incorporadas na composição detergente em um nível de 0,00001% a 2% de proteína enzimática em peso da composição, preferivelmente em um nível de
10 0,0001% a 1% de proteína enzimática em peso da composição, mais preferivelmente em um nível de 0,001% a 0,5% de proteína enzimática em peso da composição, ainda mais preferivelmente em um nível de 0,01% a 0,2% de proteína enzimática em peso da composição.

Pectato liases: As pectato liases foram clonadas a partir de
15 gêneros bacterianos diferentes tais como *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Xanthomonas*. Também a partir de *Bacillus subtilis* (Nasser *et al.* (1993) FEBS 335: 319 a 326) e *Bacillus sp.* A clonagem YA-14 (Kim *et al.* (1994) Biosci. Biotech. Biochem. 58: 947 a 949) de uma pectato liase foi descrita.

As pectato liases no geral são caracterizadas por um pH
20 alcalino ótimo e uma exigência absoluta para cátions bivalentes, o Ca^{2+} sendo o mais estimulador.

As misturas das enzimas acima mencionadas são incluídas aqui, em particular uma mistura de uma protease, uma amilase, uma lipase e/ou uma celulase.

25 A pectato liase da invenção, ou qualquer outra enzima incorporada na composição detergente, é normalmente incorporada na composição detergente em um nível de 0,00001% a 2% de proteína enzimática em peso da composição, preferivelmente em um nível de 0,0001% a 1% de proteína enzimática em peso da composição, mais preferivelmente

em um nível de 0,001% a 0,5% de proteína enzimática em peso da composição, ainda mais preferivelmente em um nível de 0,01% a 0,2% de proteína enzimática em peso da composição.

Agentes de alvejamento: Os ingredientes de detergente
5 opcionais adicionais que podem ser incluídos nas composições detergentes da presente invenção incluem agentes de alvejamento tais como PB1, PB4 e percarbonato com um tamanho de partícula de 400 a 800 microns. Estes componentes do agente de alvejamento podem incluir um ou mais agentes de alvejamento de oxigênio e, dependendo do agente de alvejamento escolhido,
10 um ou mais ativadores de alvejante. Quando presentes os compostos de alvejamento de oxigênio tipicamente estarão presentes em níveis de cerca de 1% a cerca de 25%. No geral, os compostos de alvejamento são componentes adicionados opcionais em formulações não líquidas, por exemplo, detergentes granulares.

15 O componente do agente de alvejamento para o uso aqui podem ser quaisquer dos agentes de alvejamento úteis para as composições detergentes incluindo alvejantes de oxigênio assim como outros conhecidos na técnica.

O agente de alvejamento adequado para a presente invenção
20 pode ser um agente de alvejamento ativado ou não ativado.

Uma categoria de agente de alvejamento de oxigênio que pode ser usada inclui agentes de alvejamento do ácido percarboxílico e sais deste. Os exemplos adequados desta classe de agentes incluem monoperoxifalato magnésio hexaidratado, o sal de magnésio do ácido meta-cloro perbenzóico,
25 ácido 4-nonilamino-4-oxoperoxibutírico e ácido diperoxidodecanodióico. Tais agentes de alvejamento são divulgados na US 4.483.781, US 740.446, EP 0 133 354 e US 4.412.934. Os agentes de alvejamento altamente preferidos também incluem ácido 6-nonilamino-6-oxoperoxicapróico como descrito na US 4.634.551.

Uma outra categoria de agentes de alvejamento que podem ser usados inclui os agentes de alvejamento de halógeno. Os exemplos de agentes de alvejamento de hipoclorito, por exemplo, incluem ácido tricloro isocianúrico e os dicloroisocianuratos de sódio e potássio e alcano sulfonamidas de N-cloro e N-bromo. Tais materiais são normalmente adicionados a 0,5 a 10% em peso do produto acabado, preferivelmente de 1 a 5% em peso.

Os agentes de liberação de peróxido de hidrogênio podem ser usados em combinação com os ativadores de alvejante tais como tetraacetiletilenodiamina (TAED), nonanoiloxibenzenossulfonato (NOBS, descrito na US 4.412.934), 3,5-trimetil-hexsanoloxibenzenossulfonato (ISONOBS, descrito na EP 120 591) ou pentaacetilglicose (PAG), que são perhidrolizados para formar um perácido como a espécie de alvejamento ativa, levando ao efeito de alvejamento melhorado. Além disso, muito adequados são os ativadores de alvejante C8(6-octanamido-caproil) oxibenzenossulfonato, C9(6-nonanamido caproil) oxibenzenossulfonato e C10(6-decanamido caproil) oxibenzenossulfonato ou misturas destes. Os ativadores também adequados são ésteres de citrato acilados tais como divulgados no Pedido de Patente Europeu N° 91870207,7.

Os agentes de alvejamento úteis, incluindo peroxiácidos e sistemas de alvejamento compreendendo os ativadores de alvejante e compostos de alvejamento de peroxigênio para o uso em composições de limpeza de acordo com a invenção são descritos no pedido USSN 08/136.626.

O peróxido de hidrogênio também pode estar presente adicionando-se um sistema enzimático (isto é, portanto, uma enzima e um substrato) que é capaz de geração de peróxido de hidrogênio no começo ou durante o processo de lavagem e/ou de enxaguadura. Tais sistemas enzimáticos são divulgados no Pedido de Patente Europeu EP 0 537 381.

Os agentes de alvejamento outros que não os agentes de alvejamento de oxigênio também são conhecidos na técnica e podem ser

utilizados aqui. Um tipo de agente de alvejamento de não oxigênio de interesse particular inclui agentes de alvejamento fotoativados tais como as ftalocianinas de zinco e/ou alumínio sulfonadas. Estes materiais podem ser depositadas no substrato durante o processo de lavagem. Na irradiação com luz, na presença de oxigênio, tal como pendurando-se as roupas fora para secar na luz do dia, a ftalocianina de zinco sulfonada é ativada e, conseqüentemente, o substrato é alvejado. A ftalocianina de zinco preferida e um processo de alvejamento fotoativado são descritos na US 4.033.718. Tipicamente, a composição detergente conterá cerca de 0,025% a cerca de 1,25%, em peso, de ftalocianina de zinco sulfonada.

Os agentes de alvejamento também podem compreender um catalisador de manganês. O catalisador de may, por exemplo, pode ser um dos compostos descritos em “Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching”, Nature 369, 1994, páginas 637 a 639.

Supressores de espuma: Um outro ingrediente opcional é um supressor de espuma, exemplificado por siliconas, e misturas de sílica-silicona. As siliconas no geral podem ser representadas pelos materiais de polissiloxano alquilados, enquanto que a sílica é normalmente usada em formas finamente divididas exemplificadas pelos aerogéis e xerogéis de sílica e sílicas hidrofóbicas de vários tipos. Estes materiais podem ser incorporados como particulados, em que o supressor de espuma é vantajosa e liberavelmente incorporado em um carregador impermeável de detergente substancialmente não ativo de superfície solúvel em água ou dispersável em água. Alternativamente o supressor de espuma pode ser dissolvido ou dispersado em um carregador líquido e aplicado por pulverização em uma ou mais dos outros componentes.

Um agente de controle de espuma de silicona preferido é divulgado na US 3.933.672. Outros supressores de espuma particularmente úteis são os supressores de espuma de silicona auto-emulsificantes, descritos

no Pedido de Patente Alemão DTOS 2.646.126. Um exemplo de um tal composto é o DC-544, comercialmente disponível da Dow Corning, que é um copolímero de siloxano-glicol. O agente de controle de espuma especialmente preferido é o sistema supressor de espuma compreendendo uma mistura de
5 óleos de silicona e 2-alquil-alcanóis. Os 2-alquil-alcanóis adequados são 2-butil-octanóis que estão comercialmente disponíveis sob o nome comercial Isofol 12 R.

Tal sistema supressor de espuma é descrito no Pedido de Patente Europeu EP 0 593 841.

10 Especialmente agentes de controle de espuma de silicona preferidos são descritos no Pedido de Patente Europeu N° 92201649,8. As ditas composições podem compreender uma mistura de silicona/sílica em combinação com a sílica não porosa fumigada tal como Aerosil®.

Os supressores de espuma descritos acima são normalmente
15 utilizados em níveis de 0,001% a 2% em peso da composição, preferivelmente de 0,01% a 1% em peso.

Outros componentes: Outros componentes usados em composições detergentes podem ser utilizados tais como agentes de suspensão de sujeira, agentes de liberação de sujeira, abrillantadores ópticos, abrasivos,
20 bactericidas, inibidores de mancha, agentes corantes, e/ou perfumes encapsulados ou não encapsulados.

Os materiais encapsulantes especialmente adequados são cápsulas solúveis em água que consistem de uma matriz de compostos de polissacarídeo e poliidroxi tais como descrito na GB 1.464.616.

25 Outros materiais encapsulantes solúveis em água adequados compreendem as dextrinas derivadas de ésteres de ácido de amido não gelatinizados de ácidos dicarboxílicos substituídos tais como descritos na US 3.455.838. Estas dextrinas de ácido-éster, preferivelmente, são preparadas de tais amidos como milho ceroso, sorgo ceroso, sagu, tapioca e batata. Os

exemplos adequados dos ditos materiais de encapsulação incluem N-Lok fabricado pela National Starch. O material encapsulante de N-Lok consiste de um amido de milho e glicose modificados. O amido é modificado adicionando-se grupos substituídos monofuncionais tais como anidrido de ácido octenil succínico.

Os agentes de antirre deposição e de suspensão de sujeira adequados aqui incluem os derivados de celulose tais como metilcelulose, carboximetilcelulose e hidroxietilcelulose, e ácidos policarboxílicos homo- ou co-poliméricos ou seus sais. Os polímeros deste tipo incluem os poliácridatos e os copolímeros do ácido maléico-acrílico anidrido previamente mencionados como os construtores assim como os copolímeros de anidrido maléico com etileno, éter metilvinílico ou ácido metacrílico, o anidrido maléico constituindo pelo menos 20 por cento em mol do copolímero. Estes materiais são normalmente usados em níveis de 0,5% a 10% em peso, mais preferivelmente de 0,75% a 8%, o mais preferivelmente de 1% a 6% em peso da composição.

Os abrillantadores ópticos preferidos são aniônicos em caráter, os exemplos dos quais são 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2:2'-dissulfonato de dissódio, 4,4'-bis-(2-morfolino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino-estilbeno-2:2'-disulfonato de dissódio, 4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2:2'-dissulfonato de dissódio, 4',4''-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2-sulfonato de monossódio, 4,4'-bis-(2-anilino-4-(N-metil-N-2-hidroxietilamino)-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2,2'-dissulfonato de dissódio, 4,4'-bis-(4-fenil-2,1,3-triazol-2-il)estilbeno-2,2'-dissulfonato de dissódio, 4,4'-bis(2-anilino-4-(1-metil-2-hidroxietilamino)-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2,2'-dissulfonato de dissódio, 2-(estilbil-4''-(nafto-1',2':4,5)-1,2,3-triazol-2''-sulfonato de sódio e 4,4'-bis(2-sulfoestiril)bifenila.

Outros materiais poliméricos úteis são os polietileno glicóis,

particularmente aqueles de peso molecular de 1000 a 10000, mais particularmente de 2000 a 8000 e o mais preferivelmente de cerca de 4000. Estes são usados em níveis de 0,20% a 5% mais preferivelmente de 0,25% a 2,5% em peso. Estes polímeros e os sais de policarboxilato homo- ou co-

5 polimérico previamente mencionados são valiosos para melhorar manutenção da brancura, deposição de cinza no tecido e desempenho de limpeza em argila, sujeiras proteináceas e oxidizáveis na presença de impurezas de metal de transição.

Os agentes de liberação de sujeira úteis nas composições da presente invenção são convenientemente copolímeros ou terpolímeros do

10 ácido tereftálico com unidades de etileno glicol e/ou propileno glicol em vários arranjos. Os exemplos de tais polímeros são divulgados na US 4.116.885 e 4.711.730 e EP 0 272 033. Um polímero preferido particular de acordo com a EP 0 272 033 tem a fórmula:



15 onde PEG é $-(\text{OC}_2\text{H}_4)_n\text{O}-$, PO é $(\text{OC}_3\text{H}_6\text{O})$ e T é $(\text{pOOC}_6\text{H}_4\text{CO})$.

Também muito úteis são os poliésteres modificados como copolímeros aleatórios de tereftalato de dimetila, sulfoisofталato de dimetila, etileno glicol e 1,2-propanodiol, os grupos finais consistindo primariamente de sulfobenzoato e secundariamente de mono ésteres de etileno glicol e/ou

20 1,2-propanodiol. O alvo é obter um polímero completo em ambas as extremidades por grupos de sulfobenzoato, “primariamente”, no presente contexto a maioria dos ditos copolímeros aqui será completo na extremidade por grupos de sulfobenzoato. Entretanto, alguns copolímeros será menos do que totalmente completos, e portanto seus grupos finais podem consistir de

25 monoéster de etileno glicol e/ou 1,2-propanodiol, destes consistem “secundariamente” de tal espécie.

Os poliésteres selecionados aqui contêm cerca de 46% em peso de ácido dimetil tereftálico, cerca de 16% em peso de 1,2-propanodiol,

cerca de 10% em peso de etileno glicol, cerca de 13% em peso de ácido dimetil sulfobenzóico e cerca de 15% em peso de ácido sulfoisoftálico, e têm um peso molecular de cerca de 3.000. Os poliésteres e seu método de preparação são descritos em detalhe na EP 311 342.

- 5 Agentes amaciantes: Os agentes amaciantes de tecido também podem ser incorporados nas composições detergentes de lavagem de roupa de acordo com a presente invenção. Estes agentes podem ser inorgânicos ou orgânicos em tipo. Os agentes amaciantes inorgânicos são exemplificados pelas argilas esmectita divulgadas na GB-A 1 400 898 e na US 5.019.292. os
- 10 agentes amaciantes de tecido orgânicos incluem as aminas terciárias insolúveis em água como divulgado na GB-A 1 514 276 e EP 0 011 340 e sua combinação com os sais de amônio quaternário mono C_{12} - C_{14} são divulgados na EP-B-0 026 528 e as di-amidas de cadeia longa como divulgado na EP 0 242 919. Outros ingredientes orgânicos úteis de sistemas amaciantes de tecido
- 15 incluem materiais de óxido de polietileno de peso molecular alto como divulgado na EP 0 299 575 e 0 313 146.

- Os níveis de argila esmectita são normalmente na faixa de 5% a 15%, mais preferivelmente de 8% a 12% em peso, com o material sendo adicionado como um componente misto seco para o restante da formulação.
- 20 Os agentes amaciantes de tecido orgânicos tais como as aminas terciárias insolúveis em água ou os materiais de diamida de cadeia longa são incorporados em níveis de 0,5% a 5% em peso, normalmente de 1% a 3% em peso enquanto que os materiais de óxido de polietileno de peso molecular alto e os materiais catiônicos solúveis em água são adicionado em níveis de 0,1%
- 25 a 2%, normalmente de 0,15% a 1,5% em peso. Estes materiais são normalmente adicionados à porção seca por pulverização da composição, embora em alguns exemplos possa ser mais conveniente adicioná-los como um particulado misto seco, ou pulverizá-los como líquido fundido nos outros componentes sólidos da composição.

Agentes de inibição da transferência de corante poliméricos:

As composições detergentes de acordo com a presente invenção também podem compreender de 0,001% a 10%, preferivelmente de 0,01% a 2%, mais preferivelmente de 0,05% a 1% em peso de agentes de inibição da
5 transferência de corante poliméricos. Os ditos agentes de inibição da transferência de corante poliméricos são normalmente incorporados nas composições detergentes de modo a inibir a transferência de corantes dos tecidos coloridos nos tecidos lavados com estes. Estes polímeros têm a capacidade de complexar ou adsorver os corantes fugitivos lavados fora dos
10 tecidos tingidos antes dos corantes terem a oportunidade de tornarem ligados aos outros artigos na lavagem.

Os agentes de inibição da transferência de corante poliméricos especialmente adequados são polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinil-pirrolidona e N-vinilimidazol, polímeros de
15 polivinilpirrolidona, poliviniloxazolidonas e polivinilimidazóis ou misturas destes.

A adição de tais polímeros também realça o desempenho das enzimas de acordo com a invenção.

A composição detergente de acordo com a invenção pode ser
20 nas formas líquidas, de pasta, géis, barras ou granulares.

Os granulados que não causam poeira podem ser produzidos, por exemplo, como divulgado na US 4.106.991 e 4.661.452 (ambas da Novo Industri A/S) e opcionalmente podem ser revestidos por métodos conhecidos na técnica. Os exemplos de materiais de revestimento cerosos são produtos de
25 poli(óxido de etileno) (polietileno glicol, PEG) com pesos moleculares médios de 1000 a 20000; nonilfenóis etoxilados tendo de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; álcoois graxos etoxilados em que o álcool contém de 12 a 20 átomos de carbono e em que existem 15 a 80 unidades de óxido de etileno; álcoois graxos; ácidos graxos; e mono- e di- e triglicerídeos de ácidos graxos.

Os exemplos de materiais de revestimento que formam película adequados para a aplicação por técnicas de leito de fluido são fornecidos na GB 1483591.

5 As composições granulares de acordo com a presente invenção também podem estar na “forma compacta”, isto é, elas podem ter uma densidade relativamente mais alta do que os detergentes granulares convencionais, isto é, de 550 a 950 g/l; em tal caso, as composições detergentes granulares de acordo com a presente invenção conterão uma quantidade inferior de “sal enchedor inorgânico”, comparado aos detergentes
10 granulares convencionais; os sais enchedores típicos são sais de metal alcalino terroso de sulfatos e cloretos, tipicamente sulfato de sódio; O detergente “compacto” tipicamente compreende não mais do que 10% de sal enchedor. As composições líquidas de acordo com a presente invenção também podem estar na “forma concentrada”, em tal caso, as composições detergentes
15 líquidas de acordo com a presente invenção conterão uma quantidade inferior de água, comparado aos detergentes líquidos convencionais. Tipicamente, o teor de água do detergente líquido concentrado é menor do que 30%, mais preferivelmente menor do que 20%, o mais preferivelmente menor do que 10% em peso das composições detergentes.

20 As composições da invenção por exemplo, podem ser formuladas como composições detergentes de lavagem de roupa à mão e à máquina incluindo composições aditivas de lavagem de roupa e composições adequadas para o uso no pré tratamento de tecidos manchados, composições amaciantes de tecido adicionadas no enxágüe, e composições no geral para o
25 uso em operações de limpeza de superfície dura doméstica e operações de lavagem de pratos.

Os exemplos seguintes são significados a exemplificar as composições para a presente invenção, mas não são necessariamente significados a limitar ou de outro modo definir o escopo da invenção.

Nas composições detergentes, as identificações do componente abreviado têm os significados seguintes:

	LAS:	Alquil C ₁₂ benzeno sulfonato de sódio linear
	TAS:	Sebo alquil sulfato de sódio
5	XIAS:	Alquil C _{1X} -C _{1Y} sulfato de sódio
	SS:	Tensoativo de sabão secundário da fórmula ácido 2-butil octanóico
	25EY:	Um álcool primário predominantemente linear C ₁₂ -C ₁₅ condensado com uma média de Y moles de óxido de etileno
10	45EY:	Um álcool primário predominantemente linear C ₁₄ -C ₁₅ condensado com uma média de Y moles de óxido de etileno
	XYEzs:	Alquil C _{1X} -C _{1Y} sulfato de sódio condensado com uma média de Z moles de óxido de etileno por mol
15	Não iônico:	Álcool graxo etoxilado/propoxilado misto C ₁₃ -C ₁₅ com um grau médio de etoxilação de 3,8 e um grau médio de propoxilação de 4,5 vendido sob o nome comercial Plurafax LF404 pela BASF GmbH
20	CFAA:	Alquil C ₁₂ -C ₁₄ N-metil glicamida
	TFAA:	Alquil C ₁₆ -C ₁₈ N-metil glicamida
	Silicato:	Silicato de sódio amorfo (razão de SiO ₂ :Na ₂ O = 2,0)
	NaSKS-6:	Silicato disposto em camada cristalina da fórmula δ -Na ₂ Si ₂ O ₅
25	Carbonato:	Carbonato de sódio anidro
	Fosfato:	Tripolifosfato de sódio
	MA/AA:	Copolímero de ácido maléico/acrílico 1:4, peso molecular médio de cerca de 80.000
	Poliacrilato:	Homopolímero de poliacrilato com um peso

		molecular médio de 8.000 vendido sob o nome comercial PA30 pela BASF GmbH
5	Zeólito A:	Aluminossilicato de sódio hidratado da fórmula $\text{Na}_{12}(\text{AlO}_2\text{SiO}_2)_{12} \cdot 27\text{H}_2\text{O}$ tendo um tamanho de partícula primário na faixa de 1 a 10 micrômetros
	Citrato:	Citrato de tri-sódio diidratado
	Cítrico:	Ácido cítrico
	Perborato:	Alvejante de monohidrato de perborato de sódio anidro, fórmula empírica $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$
10	PB4:	Tetraidrato de perborato de sódio anidro
	Percarbonato:	Alvejante de percarbonato de sódio anidro da fórmula empírica $2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}_2$
	TAED:	Tetraacetil etileno diamina
	CMC:	Carboximetil celulose de sódio
15	DETPMP:	Dietileno triamina penta (ácido metileno fosfônico), comercializado por Monsanto sob o nome comercial Dequest 2060
	PVP:	Polímero de polivinilpirrolidona
20	EDDS:	Ácido etilenodiamina-N,N'-dissuccínico, isômero [S,S] na forma de sal de sódio
	Supressor de espuma:	25% de cera de parafina Mpt 50° C, 17% de sílica hidrofóbica, 58% de óleo de parafina
	Supressor de espuma	12% de Silicona/sílica, 18% de álcool estearílico, 70% de amido na forma granular
25	Sulfato:	Sulfato de sódio anidro
	HMWPEO:	Óxido de polietileno de peso molecular alto
	TAE 25:	Etoxilato de álcool de sebo (25)

Exemplo de Detergente I

Uma composição de limpeza de tecido granular de acordo com

a invenção pode ser preparada como segue:

	Alquil benzeno sulfonato de sódio linear a C ₁₂	6,5
	Sulfato de sódio	15,0
	Zeólito A	26,0
5	Nitrilotriacetato de sódio	5,0
	Enzima da invenção	0,1
	PVP	0,5
	TAED	3,0
	Ácido bórico	4,0
10	Perborato	18,0
	Fenol sulfonato	0,1
	Menores	Até 100

Exemplo de Detergente II

Uma composição de limpeza de tecido granular compacta

15 (densidade de 800 g/l) de acordo com a invenção pode ser preparada como segue:

	45AS	8,0
	25E3S	2,0
	25E5	3,0
20	25E3	3,0
	TFAA	2,5
	Zeólito A	17,0
	NaSKS-	12,0
	Ácido cítrico	3,0
25	Carbonato	7,0
	MA/AA	5,0
	CMC	0,4
	Enzima da invenção	0,1
	TAED	6,0

Percarbonato	22,0
EDDS	0,3
Supressor de espuma granular	3,5
água/menores	Até 100%

5 Exemplo de Detergente III

As composições de limpeza de tecido granulares de acordo com a invenção que são especialmente úteis na lavagem de roupa de tecidos coloridos foram preparadas como segue:

	LAS	10,7	-
10	TAS	2,4	-
	TFAA	-	4,0
	45AS	3,1	10,0
	45E7	4,0	-
	25E3S	-	3,0
15	68E11	1,8	-
	25E5	-	8,0
	Citrato	15,0	7,0
	Carbonato	-	10
	Ácido cítrico	2,5	3,0
20	Zeólito A	32,1	25,0
	Na-SKS-6	-	9,0
	MA/AA	5,0	5,0
	DETPMP	0,2	0,8
	Enzima da invenção	0,10	0,05
25	Silicato	2,5	-
	Sulfato	5,2	3,0
	PVP	0,5	-
	Poli (4-vinilpiridino)-N- óxido/copolímero de vinil-	-	0,2

imidazol e vinil-pirrolidona

Perborato	1,0	-
Fenol sulfonato	0,2	-
Água/Menores	Até 100%	

5 Exemplo de Detergente IV

As composições de limpeza de tecido granulares de acordo com a invenção que fornecem capacidade “Amaciante através da lavagem” podem ser preparadas como segue:

	45AS	-	10,0
10	LAS	7,6	-
	68AS	1,3	-
	45E7	4,0	-
	25E3	-	5,0
	Cloreto de coco-alquil-dimetil	1,4	1,0
15	hidróxi-etil amônio		
	Citrato	5,0	3,0
	Na-SKS-6	-	11,0
	Zeólito A	15,0	15,0
	MA/AA	4,0	4,0
20	DETPMP	0,4	0,4
	Perborato	15,0	-
	Percarbonato	-	15,0
	TAED	5,0	5,0
	Argila esmectita	10,0	10,0
25	HMWPEO	-	0,1
	Enzima da invenção	0,10	0,05
	Silicato	3,0	5,0
	Carbonato	10,0	10,0
	Supressor de água	1,0	4,0

de sabão granular

CMC 0,2 0,1

Água/Menores Até 100%

Exemplo de Detergente V

- 5 As composições de limpeza de tecido líquidas de serviço pesado de acordo com a invenção podem ser preparadas como segue:

	A	B
Forma de ácido LAS	-	25,0
Ácido cítrico	5,0	2,0
Forma de ácido 25AS	8,0	-
Forma de ácido 25AE2S	3,0	-
25AE7	8,0	-
CFAA	5	-
DETPMP	1,0	1,0
Ácido graxo	8	-
Ácido oléico	-	1,0
Etanol	4,0	6,0
Propanodiol	2,0	6,0
Enzima da invenção	0,10	0,05
Cloreto de coco-alkil-dimetil-hidróxi etil amônio	-	3,0
Argila esmectita	-	5,0
PVP	2,0	-
Água/Menores	Até 100%	

Exemplo 1: Medição da estabilidade da Pectato Liase em detergente líquido

A estabilidade em detergente das variantes da pectato liase da presente invenção é avaliada medindo-se a atividade das variantes depois da incubação de uma mistura de enzima-detergente, que é descrita abaixo.

10

Ensaio da atividade residual:

15

30 microlitros de uma solução enzimática (sobrenadante em cultura ou enzima purificada) são misturados com 1 ml de detergente líquido para o serviço pesado US ou Europeu típico em dois tubos de amostra. Um dos tubos é armazenado em gelo enquanto que o outro é incubado a 40 graus Celsius durante 90 minutos. Como referência 30 microlitros água são misturados com 1 ml de detergente e incubados em gelo. Depois da incubação, 9 ml de água gelada são adicionados às amostras, que são misturadas vigorosamente e armazenadas em gelo até a outra análise.

A atividade enzimática é medida primeiro misturando-se 50 microlitros de mistura enzima-detergente com 5 ml de tampão de ensaio (100 mM de Tris-HCl, 0,68 mM de CaCl_2 , pH 8,0), em segundo lugar desta solução, 75 microlitros são misturados com 75 microlitros de solução de substrato recentemente preparada (ácido poligalacturônico a 1% em tampão de ensaio) e incubados a 40 graus Celsius durante 10 minutos. Em terceiro lugar, 100 microlitros da mistura de incubação são adicionados em 100 microlitros tampão de interrupção (50 mM de H_3PO_4) em uma placa microtituladora transparente de UV e a absorbância a 235 nm é medida em um espectofotômetro. A amostra de água-detergente é usada para zerar o espectofotômetro.

Agora, a atividade residual é calculada como a atividade (absorbância A_{235}) na amostra incubada a 40 graus Celsius durante 90 minutos relativo à atividade na amostra armazenada em gelo:

$$\text{Atividade residual (RA)} = \frac{\text{Absorbância[amostra incubada a 40 graus Celsius]}}{\text{Absorbância[amostra incubada a 0 graus Celsius]}} \times 100$$

Assim, a atividade residual é equivalente à estabilidade em detergente da enzima. A tabela 2 lista a atividade residual melhorada de várias substituições da pectato liase da SEQ ID NO: 2 incubada em um detergente líquido Europeu típico para o serviço pesado. A maioria das substituições originam mais do que 50% de melhora da estabilidade em detergente comparado à pectato liase precursora como apresentado na SEQ ID NO: 2. De modo equivalente as substituições da pectato liase da SEQ ID NO: 2 listadas na Tabela 3 melhora significativamente a estabilidade da enzima quando incubada em um detergente líquido US típico para o serviço pesado.

Tabela 2. Substituições na pectato liase da SEQ ID NO: 2 causando atividade residual aumentada depois da incubação no detergente líquido para o serviço pesado Europeu.

Mutações	Ativ. resid. %	Ativ. res. em % da enz. prec.
Pectato liase SEQ ID NO: 2 (enzima precursora)	23	100
Q40E	28	122
F251I	30	130.4
A332P	31	134.8
L106Q	31	134.8
R272H	31	134.8
R272Y	31	134.8
A91E	33	143.5
K115I+K213E	33	143.5
K139I+K213N	33	143.5
H5R+K257N+S302A	34	147.8
K139M	34	147.8
K87A	34	147.8
D48P	35	152.2
K99I+I196V	35	152.2
T105P	35	152.2
K115A+K118A	36	156.5
K115A+K118A+M122N	36	156.5
K115Q	36	156.5
K213T	36	156.5
V141E+C199S+K213E	36	156.5
K115I+Q146H	37	160.9
K257N	37	160.9
K71E+K118E	38	165.2
S331P	38	165.2
T49P+N156S	38	165.2
K314N+S340P	39	169.6
V141E+I235V	39	169.6
G46D+K257N	40	173.9
Q146H	40	173.9
K218P	41	178
A305P	41	178
S28T+S30F+K334E+N363S	41	178
H193Y+S256C+V389I+A393V	42	183
R272C	42	183
D48E+L106Q+I140V+F215Y+K218E	42	183

K213N+T258I	43	187
E9G+H31N+N50D+L106Q+A111E+T136S+V141L+F201L+N202K+F215Y+G286A+A381D+H384N	43	187
E9G+H31N+L100Q+D303S+A305P+T335S+H384N+S391N	44	191
E9G+H31N+D48E+L106Q+A111E+S301Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391N	45	196
L45V+N50Y+N185H	46	200
N11Y+K87E+K99N	46	200
K115I+K213E	48	209
E9G+D48E+L106Q+S316F+A381D	48	209
S30P+K115I+K139I+Q146H+S337C	49	213
K213N+T258I	50	217
K47R+K257N	50	217
E9G+H31N+D48E+L106Q+I140V+F215Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391N	51	222
H31N+T105A+L106Q+A111E+V141L+K218E+D303S+A305P+D326N+T335S+H384N+S391N	51	222
E9G+L106Q+I140V+G204R+F215Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391N	52	226
K26Q+K47N+L106Q+I140V+F215Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391N	53	230
D48E+L106Q+I140V+F215Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391N	56	243
D48E+L106Q+K213T+F215Y+K218L+A305P	57	248
L106Q+S337C	57	248
K115I+K213N	57	248
E9G+H31N+T61A+G74D+L75A+N76D+K79A+D86N+E107K+T136S+V141L+F215Y+K218E+V324A+A333E+S340K+G341S+T378S+H384N+S391N	57	240
T52M+K139I+Q146H+I196V+K213N+K257N+T258I+N323M+S366N	57	248
N51Y+N186H+K213N+K257N	59	257
K213N	60	261
K139I+Q146H+K213N+T258I+S337C	60	261
E9G+D48E+G74D+L75A+N76D+K79A+D86N+L106Q+T136S+V141L+K148E+I194V+G204R+F215Y+D303S+A305P+T378S	61	265

+H384N+S391N		
H31N+D48E+L106Q+T136S+V141L+I194V+S331T+H384N+K386R+S387A+I390T	62	270
K213T+K218L+A305P	64	278
S337C	65	283
M122Q+K115Q+K118Q+K139I+Q146H+S337C	66	287
M64F+K213T+K218P+A305P	66	287
K213T+K218P+A305P+D48P+T105P+K139I+T258I	67	291
L45V+K139I+Q146H+N185H+N196V+S337C+G377E+S387I	67	291
M64F+L106Q+K213T+F215Y+K218L+A305P	68	296
M64F+K213T+K218L+A305P	70	304
M64F+M122K+K118E+K213T+K218L+A305P	71	309
K213T+K218P+A305P+D48P+T105P+K139T	71	309
D48E+M64F+L106Q+M122K+K118E+K213T+F215Y+K218L+A305P	72	313
L45V+K139N+Q146H+I196V+T258I	72	313
K139I+V141G+Q146H+S337C+I357V	72	313
K99I+K139I+Q146H+N185H+I196V+K213N+K257N+T258I	73	317
K139I+Q146H+S337C	74	322
M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S340Q	74	322
M122K+K118E+K139I+Q146H+S337C	75	326
K139N+E158N+Q146H+S337C	75	326
M64F+K118E+M122K+Q146H+K213N+K218P+A305P	75	326
K139I+Q146H+K257N+S337C	75	326
K99I+I196V+K213N	75	326
K139I+Q146H+R272C	75	326
K139I+Q146H+N323M+S337C	75,5	328
M64F+M122K+K118E+Q146H+I196V+K218L+A305P	76	330
L45V+N116D+N185H+K257N+T258I+S337C+Q356H	76	330
M64F+M237I+K139I+Q146H+S337C	77	335
D48P+M64F+K213T+K218L+A305P+S331P	77	335
M64F+K139N+Q146H+E158N+S337C	77	335
K139I+Q146H+S337C	77	335
M64F+M122E+K139I+Q146H+S337C	78	339
M64F+M122K+K118E+K139I+Q146H+S337C	78	339

D48P+T105P+K139N+K213N+K218P+T258N+A305P+S331P	78	339
M64F+K139S+Q146H+S337C	78	339
M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P	79	343
K139I+Q146H+K213N+S331P+S337C	80	348
Q146H+V338E	81	352
K139I+Q146H+N189D+S337R	81	352
M64F+K139H+Q146H+S337C	81	352
K139I+S337C+S340N	81,5	354
M64F+L106Q+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C	82	357
N76D+K139I+Q146I+S337C	82	357
M64F+K139F+Q146V+S337C	82	357
M64F+K139I+Q146H+Y308S+T335R+I336S+S337L+V338Y+F339I+S340A	82	357
D48P+M64F+T105P+K139N+Q146H+K213N+K218P+T258N+A305P+S331P	83	361
M64F+V123I+K139I+Q146H+S337C	84	365
M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C	84	365
K139I+Q146H+S256C	84	365
N37D+K139I+Q146H+K213E+S307R+S337C	84	365
K139I+Q146H+S229T+S337C	84	365
M64F+K139S+Q146V+S337C	84	365
M64F+M122V+K139Q+Q146L+S337C+K397D	84	365
M64F+K139I+Q146V+S337C	84	365
D48P+M64F+K118E+M122K+Q146H+D170N+K213N+K218P+A305P+S331P	85	370
L45V+K213N+K257N+S337C+T378G+H384N+S391N	85	370
M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S340P	86	374
K139I+V141G+Q146H+V277D	86	374
M64F+K139L+Q146F+S337C	86	374
M64F+K99I+T105P+M122K+K118E+Q146H+K213N+K218P+A305P+S331P	86,5	376
K213T+K218P+A305P+D48P+T105P+K139I+T258I+S331P	87	378
D48P+M64F+T105P+K139N+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P	89	387
M64F+K139I+Q146H+S337C	90	391

D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P	90,5	393
M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C	91	396
D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P	91	396
M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337K	91	396
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P	91	396
V141E+C199S+K213E+Y295H	91	396
D48P+M64F+T105P+M122K+K118E+K213T+K218P+A305P+S331P	92	400
D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337K	92	400
D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R	92	400
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K	92	400
D48P+M64F+L106Q+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C	93	404
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K148E+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R	93	404
M64F+L75P+K139E+Q146V+G224S+S337C+G349R+V389I	93	404
M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+T258P+S331P+S337C	94	409
D48P+M64F+L106Q+K139I+Q146H+K213T+K218L+Y234H+A305P+S331P+S337C	94	409
M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337R	97	422
D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K	97	422
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S340P	97	422
M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S331P+S337C	98	426
D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C	98	426
D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337R	98	426
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R	99	430
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+N189D+K213T+K218P+T258I+S290N+A305P+S331P+S337R	100	435

D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+ A305P+S331P+S337K+S340P	100	435
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+ A305P+S331P+K334E+S337K+S340P	100	435

Tabela 3. Substituições na pectato liase da SEQ ID NO: 2 causando atividade residual aumentada depois da incubação em detergente líquido para o serviço pesado US.

Mutações	Ativid residual %	Ativ. res. em % da enzima precursora
Pectato liase de SEQ ID NO: 2 (enzima precursora)	45	100
D68*+N69*+L70*+K71*	46	102
N50L+K54V	46	102
I390N	46	102
V141N	47	104
L75P	47	104
K115N	47	104
L268Y+F251I	48	107
A91E	48	107
T105P	48	107
L106Q	49	109
K87A	49	109
S30T+K99I	49	109
K139I+K213N	49	109
R272Y	50	111
M237I	51	113
C199N	51	113
F215Y	52	116
K213T	52	116
A228I+F251I	53	118
K115I+Q146H	57	127
K257N	59	131
K213N+T258I	60	133
M122Q	61	136

K386P	61	136
K218P	61	136
A332P	62	138
F251I	64	142
A305P	64	142
D48P	64	142
S134L+K257E	66	147
M64F+K213T+K218L+A305P	73	162
S331P	75	167
M64F+M122K+K118E+K213T+K218L+A305P	78	173
M64F+K139I+Q146H+S337C	91	202
M64F+V123I+K139I+Q146H+S337C	91	202
K139I+Q146H+S337C	100	222

Exemplo 2: Estabilidade das pectato liases em detergente líquido depois da incubação prolongada

A estabilidade em detergente das variantes da pectato liase da presente invenção é avaliada medindo-se a atividade das variantes depois da incubação de uma mistura enzima-detergente, que é descrita abaixo.

Ensaio da atividade residual:

30 microlitros de uma solução enzimática (sobrenadante em cultura ou enzima purificada) são misturados com 1 ml de detergente líquido para o serviço pesado Europeu típico em dois tubos de amostra. Um dos tubos é armazenado em gelo enquanto que o outro é incubado a 40 graus Celsius durante 18 ou 24 horas. Como referência 30 microlitros água são misturados com 1 ml de detergente e incubados em gelo.

Depois da incubação, 9 ml de água gelada são adicionados às amostras, que são misturadas vigorosamente e armazenadas em gelo até outra análise.

A atividade enzimática é medida primeiro misturando-se 50 microlitros de mistura enzima-detergente com 5 ml de tampão de ensaio (100 mM de Tris-HCl, 0,68 mM de CaCl₂, pH 8,0), em segundo lugar desta solução, 75 microlitros são misturados com 75 microlitros de solução de

substrato recentemente preparada (ácido poligalacturônico a 1% em tampão de ensaio) e incubados a 40 graus Celsius durante 10 minutos. Em terceiro lugar, 100 microlitros da mistura de incubação são adicionados em 100 microlitros de tampão de interrupção (50 mM de H_3PO_4) em uma placa microtituladora transparente de UV e a absorbância a 235 nm é medida em um espectrofotômetro. A amostra de água-detergente é usada para zerar o espectrofotômetro.

Agora a atividade residual é calculada como a atividade (absorbância A_{235}) na amostra incubada a 40 graus Celsius durante 90 minutos relativo à atividade na amostra armazenada em gelo:

$$\text{Atividade residual (RA)} = \frac{\text{Absorbância[amostra incubada a 40 graus Celsius]}}{\text{Absorbância[amostra incubada a 0 graus Celsius]}} \times 100$$

Assim a atividade residual é equivalente à estabilidade em detergente da enzima. A tabela 4 lista a atividade residual melhorada de várias substituições da pectato liase da SEQ ID NO: 2 incubadas em um detergente líquido para o serviço pesado Europeu típico durante 18 horas. Do mesmo modo a Tabela 5 lista a atividade residual das variantes da pectato liase incubados durante 24 horas.

Tabela 4. Substituições na pectato liase da SEQ ID NO: 2 causando atividade residual aumentada, que é medida depois da incubação em detergente líquido para o serviço pesado Europeu durante 18 horas.

Mutações	Ativ. residual %
Pectato liase de SEQ ID NO: 2 (enzima precursora)	<5%
K139I+Q146H+S337C	22
D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C	53
D48P+M64F+T105P+M122K+K118E+K213T+K218P+A305P+S331P	41
M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S340P	38
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P	37
D48P+M64F+K99I+K118E+M122K+Q146H+K213N+K218P+A305P+S331P	24
D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P	23
D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337K	56
D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337R	46
M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337K	49
M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337R	59
D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K	60
D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R	57
D48P+M64F+T105P+K139N+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P	32
D48P+K99I+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P	44
D48P+M64F+L106Q+K139I+Q146H+K213T+K218L+Y234H+A305P+S331P+S337C	52
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R	80
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S340P	64

D48P+M64F+T105P+K139N+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P	30
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+N189D+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R	80
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P	32

Tabela 5. Substituições na pectato liase da SEQ ID NO: 2 causando atividade residual aumentada, que é medida depois da incubação em detergente líquido para o serviço pesado Europeu durante 24 horas.

Mutações	Ativ. residual %
Pectato liase de SEQ ID NO: 2 (enzima precursora)	<5
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R	67
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K+S340P	85
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+N189D+K213T+K218P+T258I+S298N+A305P+S331P+S337R	77
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K148E+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R	77
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+K334E+S340P	60
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+K334E+S337K+S340P	90
D48P+M64F+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K	69
D48P+M64F+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R	63
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K	80
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K148Q+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K	83
D48P+M64F+T105P+K139I+V141E+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K	88
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+C199S+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K	82
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+Y295H+A305P+S331P+S337K	84

D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+K334E+S337K	86
D48P+M64F+K99R+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K	82

Exemplo 3. DSC nos tipos selvagens e variantes da pectato liase

A estabilidade térmica das variantes da pectato liase da invenção foi medida com calorimetria de varredura diferencial (DSC). Os experimentos foram conduzidos em tampão (como oposto ao detergente). As amostras de enzima purificadas foram dialisadas duas vezes contra 5 L 20 mM de tampão HEPES, 0,68 mM de CaCl₂, pH 8,0 em corte de 10 kDa Slide-A-Lyzers (Pierce, USA) e concentradas a aproximadamente 10 mg/ml por 2.400 g de centrifugação em um Biofuge Stratos (Kendro, Alemanha) em YM 10 kDa de células Centricon (Amicon). A DSC foi conduzida em um MCS 4100 (Calorimetry Sciences Corporation, USA) com um gradiente de 1° C/min de 5 a 110° C e os dados analisados pela CpCalc 2.1 software (Applied Thermodynamics, USA).

Tabela 6. Temperaturas de transição (T_t) para as enzimas pectato liase testadas.

Mutações	$T_t(^{\circ}\text{C})$
Precursor	67.6
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+ T258I+A305P+S331P	71.5
K139I+Q146H+S337C	72.4
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S340P	74.1
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+K334E+S337K+S340P	74.2
M64F+K139I+Q146H+S337C	74.5
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+N189D+K213T+K218P+T258I+S298N+A305P+S331P+S337R	74.7
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K	75.0
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R	75.6
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K148E+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R	76.6
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K+S340P	77.7

É declarado que todas estas variantes são estabilizadas termicamente comparadas com os precursores.

REIVINDICAÇÕES

1. Variante de uma enzima precursora que tem atividade da pectato liase (EC 4.2.2.2), caracterizada pelo fato de que compreende uma ou mais substituições selecionadas do grupo que consiste em:

- 5 H5R, N11Y, K26Q, S28T, S30F, S30P, S30T, N37D, Q40E, L45V, G46D, K47N, K47R, D48P, T49P, N50D, N50L, N50Y, T52M, K54V, T61A, M64F, D68*, N69*, L70*, K71*, K71E, G74D, L75A, L75P, N76D, K79A, D86N, K87A, K87E, A91E, K99I, K99N, K99R, T105A, T105P, E107K, A111E, K115A, K115I, K115N, K115Q, N116D, K118A, K118E, M122E,
- 10 M122K, M122N, M122Q, V123I, S134L, T136S, K139E, K139F, K139I, K139M, K139N, K139S, V141G, V141E, V141L, V141N, Q146F, Q146H, Q146I, Q146V, K148E, K148Q, N156S, E158N, D170N, Q182D, Q182E, N185H, N189D, H193Y, I194V, I196V, C199N, C199S, F201L, N202K, G204R, K213E, K213N, K213T, K218E, K218L, K218P, G224S, A228I,
- 15 S229T, Y234H, I235V, M237I, F251I, S256C, K257E, K257N, T258I, L286Y, R272C, R272H, R272Y, V277D, G286A, Y295H, S298N, S301Y, S302A, S307R, Y308S, K314N, S316F, N323M, V324A, D326N, S331P, S331T, A332P, A333E, K334E, T335S, T335R, I336S, S337C, S337K, S337L, S337R, V338E, V338Y, F339I, S340A, S340K, S340N, S340P,
- 20 S340Q, G341S, G349R, Q356H, I357V, N363S, S366N, T378G, A381D, K386P, K386R, S387A, V389I, I390N, I390T, A393V e K397D,

e em que cada posição corresponde a uma posição da sequência de aminoácidos da pectato liase tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, em que a pectato liase precursora tem uma sequência de

25 aminoácidos da SEQ ID NO: 2.

2. Variante de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de compreender uma das combinações de substituições selecionadas do grupo consistindo em

A228I+F251I,

- D48E+L106Q+I140V+F215Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391N,
D48E+L106Q+I140V+F215Y+K218E,
D48E+L106Q+K213T+F215Y+K218L+A305P,
D48E+M64F+L106Q+M122K+K118E+K213T+F215Y+K218L+A305P,
5 D48P+K99I+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P,
D48P+M64F+K118E+M122K+Q146H+D170N+K213N+K218P+A305P+S331P,
D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C,
D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337K,
10 D48P+M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337R,
D48P+M64F+K213T+K218L+A305P+S331P,
D48P+M64F+K99I+K118E+M122K+Q146H+K213N+K218P+A305P+S331P,
D48P+M64F+K99R+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P
15 +S331P+S337K,
D48P+M64F+L106Q+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C,
D48P+M64F+L106Q+K139I+Q146H+K213T+K218L+Y234H+A305P+S331P+S337C,
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+C199S+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K,
20 D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K148E+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R,
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K148Q+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K,
25 D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P,
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+K334E+S337K+S340P,
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+

- S331P+K334E+S340P,
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+
S331P+K334E+S337K+S340P,
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+
5 S331P+K334E+S337K,
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+
S331P+K334E+S337K+S340P,
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+
S331P+S337K,
10 D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+
S331P+S337K+S340P,
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+
S331P+S337R,
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+
15 S331P+S340P,
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+K213T+K218P+T258I+Y295H+
A305P+S331P+S337K,
D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+N189D+K213T+K218P+T258I+
A305P+S331P+S337R,
20 D48P+M64F+T105P+K139I+Q146H+N189D+K213T+K218P+T258I+
S298N+A305P+S331P+S337R,
D48P+M64F+T105P+K139I+V141E+Q146H+K213T+K218P+T258I+
A305P+S331P+S337K,
D48P+M64F+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+
25 S337K,
D48P+M64F+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+
S337R,
D48P+M64F+T105P+K139N+Q146H+K213N+K218P+T258N+A305P+
S331P,

- D48P+M64F+T105P+K139N+Q146H+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P,
- D48P+M64F+T105P+M122K+K118E+K213T+K218P+A305P+S331P,
- D48P+T105P+K139N+K213N+K218P+T258N+A305P+S331P,
- 5 D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P,
- D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337K,
- D48P+T105P+K139N+K213T+K218P+T258I+A305P+S331P+S337R,
- D68*+N69*+L70*+K71*,
- E9G+D48E+G74D+L75A+N76D+K79A+D86N+L106Q+T136S+V141L+
- 10 K148E +I194V+G204,R+F215Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391N,
- E9G+D48E+L106Q+S316F+A381D,
- E9G+H31N+D48E+L106Q+A111E+S301Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391N,
- E9G+H31N+D48E+L106Q+I140V+F215Y+D303S+A305P+T378S+H384N
- 15 +S391N,
- E9G+H31N+L106Q+D303S+A305P+T335S+H384N+S391N,
- E9G+H31N+N50D+L106Q+A111E+T136S+V141L+F201L+N202K+F215Y+G286A+A381D+H384N,
- E9G+H31N+T61A+G74D+L75A+N76D+K79A+D86N+E107K+T136S+
- 20 V141L+F215Y+K218E+V324A+A333E+S340K+G341S+T378S+H384N+S391N,
- E9G+L106Q+I140V+G204R+F215Y+D303S+A305P+T378S+H384N+S391N,
- G46D+K257N,
- 25 H193Y+S256C+V389I+A393V,
- H31N+D48E+L106Q+T136S+V141L+I194V+S331T+H384N+K386R+S387A+I390T,
- H31N+T105A+L106Q+A111E+V141L+K218E+D303S+A305P+D326N+T335S+H384N+S391N,

- H5R+K257N+S302A,
 K115A+K118A,
 K115A+K118A+M122N,
 K115I+K213E,
 5 K115I+Q146H,
 K139I,
 Q146H+K257N+S337C,
 K139I+K213N,
 K139I+Q146H+K213N+S331P+S337C,
 10 K139I+Q146H+K213N+T258I+S337C,
 K139I+Q146H+N189D+S337R,
 K139I+Q146H+N323M+S337C,
 K139I+Q146H+R272C,
 K139I+Q146H+S229T+S337C,
 15 K139I+Q146H+S256C,
 K139I+Q146H+S337C,
 K139I+S337C+S340N,
 K139I+V141G+Q146H+S337C+I357V,
 K139I+V141G+Q146H+V277D,
 20 K139N+E158N+Q146H+S337C,
 K213N+T258I,
 K213T+K218L+A305P,
 K213T+K218P+A305P+D48P+T105P+K139I+T258I,
 K213T+K218P+A305P+D48P+T105P+K139I+T258I+S331P,
 25 K213T+K218P+A305P+D48P+T105P+K139T,
 K26Q+K47N+L106Q+I140V+F215Y+D303S+A305P+T378S+H384N+
 S391N,
 K314N+S340P,
 K47R+K257N,

- K71E+K118E,
 K99I+I196V,
 K99I+I196V+K213N,
 K99I+K139I+Q146H+N185H+I196V+K213N+K257N+T258I
- 5 L106Q+S337C,
 L268Y+F251I,
 L45V+K139I+Q146H+N185H+N196V+S337C+G377E+S387I,
 L45V+K139N+Q146H+I196V+T258I,
 L45V+K213N+K257N+S337C+T378G+H384N+S391N,
- 10 L45V+N116D+N185H+K257N+T258I+S337C+Q356H,
 L45V+N50Y+N185H,
 M122K+K118E+K139I+Q146H+S337C,
 M122Q+K115Q+K118Q+K139I+Q146H+S337C,
 M64F+K118E+M122K+Q146H+K213N+K218P+A305P,
- 15 M64F+K139F+Q146V+S337C,
 M64F+K139H+Q146H+S337C,
 M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S331P+S337C,
 M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C,
 M64F+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+T258P+S331P+S337C,
- 20 M64F+K139I+Q146H+S337C,
 M64F+K139I+Q146H+Y308S+T335R+I336S+S337L+V338Y+F339I+
 S340A,
 M64F+K139I+Q146V+S337C,
 M64F+K139L+Q146F+S337C,
- 25 M64F+K139N+Q146H+E158N+S337C,
 M64F+K139S+Q146H+S337C,
 M64F+K139S+Q146V+S337C,
 M64F+K213T+K218L+A305P,
 M64F+K213T+K218P+A305P,

- M64F+K99I+T105P+M122K+K118E+Q146H+K213N+K218P+A305P+S331P,
M64F+L106Q+K139I+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C,
M64F+L106Q+K213T+F215Y+K218L+A305P,
5 M64F+L75P+K139E+Q146V+G224S+S337C+G349R+V389I,
M64F+M122E+K139I+Q146H+S337C,
M64F+M122K+K118E+K139I+Q146H+S337C,
M64F+M122K+K118E+K213T+K218L+A305P,
M64F+M122K+K118E+Q146H++I196V+K218L+A305P,
10 M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P,
M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337C,
M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S337R,
M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S340P,
M64F+M122K+K118E+Q146H+K213T+K218L+A305P+S340Q,
15 M64F+M122V+K139Q+Q146L+S337C+K397D,
M64F+M237I+K139I+Q146H+S337C,
M64F+V123I+K139I+Q146H+S337C,
M64F+V123I+K139I+Q146H+S337C,
N11Y+K87E+K99N,
20 N37D+K139I+Q146H+K213E+S307R+S337C,
N50L+K54V,
N76D+K139I+Q146I+S337C,
Q146H+V338E,
S134L+K257E,
25 S28T+S30F+K334E+N363S,
S30P+K115I+K139I+Q146H+S337C,
S30T+K99I,
T49P+N156S,
T52M+K139I+Q146H+I196V+K213N+K257N+T258I+N323M+V141E+

C199S+K213E,
V141E+C199S+K213E+Y295H, e
V141E+I235V.

3. Variante de acordo com qualquer uma das reivindicações
5 precedentes, caracterizada pelo fato de que a pectato liase precursora é uma pectato liase de *Bacillus*.

4. Célula hospedeira microbiana, caracterizada pelo fato de que compreende uma variante como definida em qualquer uma das reivindicações precedentes.

10 5. Célula hospedeira microbiana de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a célula é uma bactéria, preferivelmente, um *Bacillus*, mais preferivelmente, um *Bacillus subtilis*.

6. Célula hospedeira microbiana de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a célula é um fungo ou
15 levedura, preferivelmente, um fungo filamentoso, o mais preferível, um *Aspergillus*.

7. Método para produzir uma variante de pectato liase como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que uma célula hospedeira microbiana como definida em qualquer uma das
20 reivindicações de 4 a 6 é cultivada sob condições condutivas para a expressão e secreção da variante, e em que a variante é recuperada.

8. Método para melhorar a estabilidade em detergente de uma pectato liase, caracterizado pelo fato de que compreende alterar uma ou mais posições em que a(s) alteração(ões) compreende(m) uma ou mais
25 substituições selecionadas do grupo que consiste em:

H5R, E9G, N11Y, K26Q, S28T, S30F, S30P, S30T, H31N, N37D, Q40E, L45V, G46D, K47N, K47R, D48E, D48P, T49P, N50D, N50L, N50Y, T52M, K54V, T61A, M64F, D68*, N69*, L70*, K71*, K71E, G74D, L75A, L75P, N76D, K79A, D86N, K87A, K87E, A91E, K99I, K99N, K99R, T105A,

T105P, L106Q, E107K, A111E, K115A, K115I, K115N, K115Q, N116D, K118A, K118E, M122E, M122K, M122N, M122Q, V123I, S134L, T136S, K139E, K139F, K139I, K139M, K139N, K139S, I140V, V141G, V141E, V141L, V141N, Q146F, Q146H, Q146I, Q146V, K148E, K148Q, N156S, E158N, D170N, Q182D, Q182E, N185H, N189D, H193Y, I194V, I196V, C199N, C199S, F201L, N202K, G204R, K213E, K213N, K213T, F215Y, K218E, K218L, K218P, G224S, A228I, S229T, Y234H, I235V, M237I, F251I, S256C, K257E, K257N, T258I, L286Y, R272C, R272H, R272Y, V277D, G286A, Y295H, S298N, S301Y, S302A, D303S, A305P, S307R, Y308S, K314N, S316F, N323M, V324A, D326N, S331P, S331T, A332P, A333E, K334E, T335S, T335R, I336S, S337C, S337K, S337L, S337R, V338E, V338Y, F339I, S340A, S340K, S340N, S340P, S340Q, G341S, G349R, Q356H, I357V, N363S, S366N, T378G, T378S, A381D, H384N, K386P, K386R, S387A, V389I, I390N, I390T, S391N, A393V e K397D,

15 e em que cada posição corresponde a uma posição da sequência de aminoácidos da pectato liase tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2.

9. Composição de limpeza ou detergente, preferivelmente uma composição de lavar roupa ou lavar louça, caracterizada pelo fato de que
20 compreende a variante como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 3 e compreendendo, ainda, um tensoativo.

10. Composição de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente uma celulase, uma lipase, uma cutinase, uma oxidoreductase, uma protease, uma amilase, uma
25 hemicelulase, tal como uma mananase, uma xilanase, uma galactanase, uma arabinofuranosidase, uma esterase, uma liquenase, uma arabinanase, uma outra pectato liase, ou uma mistura destas.

11. Uso de uma variante de pectato liase como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser em

uma composição detergente, preferivelmente, um detergente de lavar roupa e/ou lavar louça.

5 12. Uso de uma variante de pectato liase como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser no processamento da fibra têxtil e celulósica.

 13. Método de limpeza por esfregamento enzimático, caracterizado pelo fato de que compreende contatar o material da parede celular com a variante da pectato liase como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 3.

10 14. Método para a remoção enzimática do material da parede celular de tecido, caracterizado pelo fato de que compreende contatar o tecido com a variante de pectato liase como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 3.

RESUMO

“VARIANTE DE UMA ENZIMA PRECURSORA, CÉLULA HOSPEDEIRA MICROBIANA, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA VARIANTE DA PECTATO LIASE, MÉTODO PARA MELHORAR A ESTABILIDADE EM DETERGENTE DE UMA PECTATO LIASE, COMPOSIÇÃO DE LIMPEZA OU DETERGENTE, USO DE UMA PECTATO LIASE VARIANTE, MÉTODO DE LIMPEZA POR ESFREGAMENTO ENZIMÁTICO, E, MÉTODO PARA A REMOÇÃO ENZIMÁTICA DO MATERIAL DA PAREDE CELULAR DE TECIDO”

A presente invenção diz respeito às variantes de pectato liase que exibem alterações relativas a uma enzima precursora que exibe a atividade de pectato liase como sua atividade enzimática principal; a um método de produzir tais enzimas; e aos métodos para usar tais enzimas nas indústrias que processam tecido, detergente e fibra de celulose. Comparados à enzima precursora, as variantes da pectato liase da presente invenção exibem estabilidade melhorada nos detergentes.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

	<110>	Novozymes A/S
	<120>	Variante da pectato liase
	<130>	10190.010-DK
5	<160>	2
	<170>	PatentIn versão 3.2
	<210>	1
	<211>	1200
	<212>	DNA
10	<213>	<i>Bacillus subtilis</i>
	<220>	
	<221>	CDS
	<222>	(1)..(1200)
	<400>	1

gct gat tta ggc cac cag acg tta gaa tca aat gat ggc tgg ggc gcg	48
Ala Asp Leu Gly His Gln Thr Leu Glu Ser Asn Asp Gly Trp Gly Ala	
1 5 10 15	
tac tcg acc ggc aca aca ggc gga tca aaa gct tcg tca tcc cac gtg	96
Tyr Ser Thr Gly Thr Thr Gly Gly Ser Lys Ala Ser Ser Ser His Val	
20 25 30	
tat acc gtc agc aac aga aac cag ctt gtc tcg gca tta ggc aag gac	144
Tyr Thr Val Ser Asn Arg Asn Gln Leu Val Ser Ala Leu Gly Lys Asp	
35 40 45	
acc aac aca acg cca aaa atc att tat att aag gga acg att gac atg	192
Thr Asn Thr Thr Pro Lys Ile Ile Tyr Ile Lys Gly Thr Ile Asp Met	
50 55 60	
aac gtc gat gac aat ctg aag ccg ctt ggt cta aat gat tat aaa gat	240
Asn Val Asp Asp Asn Leu Lys Pro Leu Gly Leu Asn Asp Tyr Lys Asp	
65 70 75 80	
cca gag tac gat ttg gac aaa tat ttg aaa gcc tat gac cct agc aca	288
Pro Glu Tyr Asp Leu Asp Lys Tyr Leu Lys Ala Tyr Asp Pro Ser Thr	
85 90 95	
tgg ggc aaa aag gag ccg tcg ggg aca cta gaa gag gcg aga gca cga	336
Trp Gly Lys Lys Glu Pro Ser Gly Thr Leu Glu Glu Ala Arg Ala Arg	
100 105 110	
tct cag aaa aat caa aaa gca cga gtc atg gtg gat att ccg gca aac	384
Ser Gln Lys Asn Gln Lys Ala Arg Val Met Val Asp Ile Pro Ala Asn	
115 120 125	
acg acg atc gtc ggt tca ggg aca aat gcc aaa atc gtg ggc gga aat	432
Thr Thr Ile Val Gly Ser Gly Thr Asn Ala Lys Ile Val Gly Gly Asn	
130 135 140	

ttc cag atc aag agt gat aat gtc atc atc cgc aac atc gaa ttc cag Phe Gln Ile Lys Ser Asp Asn Val Ile Ile Arg Asn Ile Glu Phe Gln 145 150 155 160	480
gat gct tat gat tat ttt ccg caa tgg gat ccg act gac ggc agc tca Asp Ala Tyr Asp Tyr Phe Pro Gln Trp Asp Pro Thr Asp Gly Ser Ser 165 170 175	528
gga aac tgg aac tca caa tac gac aac atc aca ata aac ggc ggc acg Gly Asn Trp Asn Ser Gln Tyr Asp Asn Ile Thr Ile Asn Gly Gly Thr 180 185 190	576
cat ata tgg att gat cat tgt aca ttt aat gac ggt tcc cgt ccg gac His Ile Trp Ile Asp His Cys Thr Phe Asn Asp Gly Ser Arg Pro Asp 195 200 205	624
agc aca tcg cca aag tat ttc ggc aga aaa tat cag cac cat gac ggc Ser Thr Ser Pro Lys Tyr Phe Gly Arg Lys Tyr Gln His His Asp Gly 210 215 220	672
caa acc gat gct tot aac ggc gct aac tat atc acg atg tct tac aac Gln Thr Asp Ala Ser Asn Gly Ala Asn Tyr Ile Thr Met Ser Tyr Asn 225 230 235 240	720
tat tat cac gat cat gat aaa agc tcc att ttc gga tca agc gac agc Tyr Tyr His Asp His Asp Lys Ser Ser Ile Phe Gly Ser Ser Asp Ser 245 250 255	768
aaa aca tct gat gac ggc aaa tta aaa atc acg ctc cat cat aac cgc Lys Thr Ser Asp Asp Gly Lys Leu Lys Ile Thr Leu His His Asn Arg 260 265 270	816
tat aaa aat atc gtc cag cgc gca ccg aga gtc cgc ttc ggg cag gtg Tyr Lys Asn Ile Val Gln Arg Ala Pro Arg Val Arg Phe Gly Gln Val 275 280 285	864
cac gtt tac aac aac tat tat gaa ggc agc aca agc tcc tcg gat tat His Val Tyr Asn Asn Tyr Tyr Glu Gly Ser Thr Ser Ser Ser Asp Tyr 290 295 300	912
gcc ttc agc tat ggc tgg gga atc gga aaa tca tct aaa atc tac gct Ala Phe Ser Tyr Ala Trp Gly Ile Gly Lys Ser Ser Lys Ile Tyr Ala 305 310 315 320	960
caa aac aat gtc att gac gtg cct gga ctg tca gcc gct aaa acg atc Gln Asn Asn Val Ile Asp Val Pro Gly Leu Ser Ala Ala Lys Thr Ile 325 330 335	1008
agc gta ttc agc ggg gga acg gct tta tat gac tca ggc aca ttg ctg Ser Val Phe Ser Gly Gly Thr Ala Leu Tyr Asp Ser Gly Thr Leu Leu 340 345 350	1056
aat ggc acg cag atc aac gca tcg gct gca aac ggg ctg agt tct tct Asn Gly Thr Gln Ile Asn Ala Ser Ala Ala Asn Gly Leu Ser Ser Ser 355 360 365	1104
gtc ggc tgg aca ccg tct ctg cac ggc aca atc gat gct tcc gcg cat Val Gly Trp Thr Pro Ser Leu His Gly Thr Ile Asp Ala Ser Ala His 370 375 380	1152

gta aaa tcg aat gtt ata tct caa gcg ggt gcg ggt aaa tta aat taa 1200
 Val Lys Ser Asn Val Ile Ser Gln Ala Gly Ala Gly Lys Leu Asn
 385 390 395

<210> 2

<211> 399

<212> PRT

5 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 2

Ala Asp Leu Gly His Gln Thr Leu Glu Ser Asn Asp Gly Trp Gly Ala
 1 5 10 15

Tyr Ser Thr Gly Thr Thr Gly Gly Ser Lys Ala Ser Ser Ser His Val
 20 25 30

Tyr Thr Val Ser Asn Arg Asn Gln Leu Val Ser Ala Leu Gly Lys Asp
 35 40 45

Thr Asn Thr Thr Pro Lys Ile Ile Tyr Ile Lys Gly Thr Ile Asp Met
 50 55 60

Asn Val Asp Asp Asn Leu Lys Pro Leu Gly Leu Asn Asp Tyr Lys Asp
 65 70 75 80

Pro Glu Tyr Asp Leu Asp Lys Tyr Leu Lys Ala Tyr Asp Pro Ser Thr
 85 90 95

Trp Gly Lys Lys Glu Pro Ser Gly Thr Leu Glu Glu Ala Arg Ala Arg
 100 105 110

Ser Gln Lys Asn Gln Lys Ala Arg Val Met Val Asp Ile Pro Ala Asn
 115 120 125

Thr Thr Ile Val Gly Ser Gly Thr Asn Ala Lys Ile Val Gly Gly Asn
 130 135 140

Phe Gln Ile Lys Ser Asp Asn Val Ile Ile Arg Asn Ile Glu Phe Gln
 145 150 155 160

Asp Ala Tyr Asp Tyr Phe Pro Gln Trp Asp Pro Thr Asp Gly Ser Ser
 165 170 175

Gly Asn Trp Asn Ser Gln Tyr Asp Asn Ile Thr Ile Asn Gly Gly Thr
 180 185 190

His Ile Trp Ile Asp His Cys Thr Phe Asn Asp Gly Ser Arg Pro Asp
 195 200 205

Ser Thr Ser Pro Lys Tyr Phe Gly Arg Lys Tyr Gln His His Asp Gly
 210 215 220

Gln Thr Asp Ala Ser Asn Gly Ala Asn Tyr Ile Thr Met Ser Tyr Asn
 225 230 235 240

Tyr Tyr His Asp His Asp Lys Ser Ser Ile Phe Gly Ser Ser Asp Ser
 245 250 255

Lys Thr Ser Asp Asp Gly Lys Leu Lys Ile Thr Leu His His Asn Arg
 260 265 270

Tyr Lys Asn Ile Val Gln Arg Ala Pro Arg Val Arg Phe Gly Gln Val
 275 280 285

His Val Tyr Asn Asn Tyr Tyr Glu Gly Ser Thr Ser Ser Ser Asp Tyr
 290 295 300

Ala Phe Ser Tyr Ala Trp Gly Ile Gly Lys Ser Ser Lys Ile Tyr Ala
 305 310 315 320

Gln Asn Asn Val Ile Asp Val Pro Gly Leu Ser Ala Ala Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Val Phe Ser Gly Gly Thr Ala Leu Tyr Asp Ser Gly Thr Leu Leu
 340 345 350

Asn Gly Thr Gln Ile Asn Ala Ser Ala Ala Asn Gly Leu Ser Ser Ser
 355 360 365

Val Gly Trp Thr Pro Ser Leu His Gly Thr Ile Asp Ala Ser Ala His
 370 375 380

Val Lys Ser Asn Val Ile Ser Gln Ala Gly Ala Gly Lys Leu Asn
 385 390 395

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



CDFDD80A97961F3B

Campo 2



3A6D40AD8900D272

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 084529e008.txt
- Data de Geração do Código: 24-03-2016
- Hora de Geração do Código: 09:50:47
- Código de Controle:
 - Campo 1: CDFDD80A97961F3B
 - Campo 2: 3A6D40AD8900D272