

República Federativa do Brasil
Ministério da Economia, Ministério
do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0808753-9 A2



* B R P I 0 8 0 8 7 5 3 A 2 *

(22) Data de Depósito: 12/03/2008

(43) Data da Publicação: 12/08/2014
(RPI 2275)

(51) Int.Cl.:

C12N 9/30

(54) Título: ALFA-AMILASE DE TRICHODERMA
REESEI É UMA ENZIMA MALTOGÊNICA

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 14/03/2007 US 60/906,811,
14/03/2007 US 60/906,812

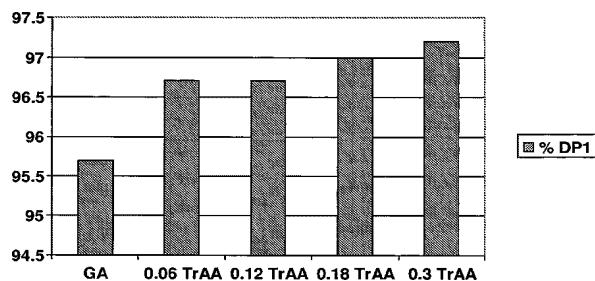
(73) Titular(es): Danisco US INC., Genencor Division

(72) Inventor(es): Gang Duan, Jayarama Shetty, Kathy Qian,
Martijn Scheffers, Pieter Van Solingen

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2008056601 de
12/03/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/112729de
18/09/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: "**ENZIMA MALTOGÊNICA ALFA-AMILASE DE *TRICHODERMA REESEI***".

Este pedido de patente reivindica a prioridade dos pedidos de patentes Provisórias americanas 60/906.811, arquivado em 14 de março de 5 2007 e 60/906.812, arquivado em 14 de março de 2007, cada um dos quais é neste pedido incorporado por referência em sua totalidade.

Listagem de Sequências

Além disso, está anexada uma listagem de sequências compreendendo as SEQ ID NOS: 1 a 7, que estão neste pedido incorporadas por 10 referência em sua totalidade.

Campo da Invenção

Uma α -amilase maltogênica de *Trichoderma reesei* (TrAA), ácidos nucleicos que codificam a mesma e células hospedeiras compreendendo os ácidos nucleicos são fornecidos. Métodos de uso de TrAA incluem sacarificação do amido a um xarope rico em glicose. 15

Antecedentes

Xarope de milho de alta frutose (HFCS) é uma forma processada do xarope de milho que tem um alto conteúdo de frutose e uma docura comparável com o açúcar, fazendo HFCS útil como um substituto de açúcar em 20 refrigerantes e outros alimentos processados. HFCS atualmente representa uma indústria de um bilhão de dólares. O processo de produção de HFCS progrediu ao longo dos anos a partir de hidrólise ácida a uma sequência de reações catalisadas por enzima:

(1) Liquefação: α -amilases (EC 3.2.1.1) são primeiros usadas para degradar uma suspensão de amido contendo 30 a 40% p/p de sólidos secos (sólidos secos) a maltodextranas. α -Amilases são endo-hidrolases que catalisam a clivagem randômica de ligações internas α -1,4-D-glicosídicas. Como a liquefação tipicamente é conduzida em altas temperaturas, por exemplo, 90 a 100°C, α -amilases termoestáveis, tais como uma α -amilase de *Bacillus sp.*, são preferenciais para esta etapa. 25 30

(2) Sacarificação: Glicoamilases e/ou α -amilases maltogênicas comumente são usadas para catalisar a hidrólise de extremidades não-

reduzidas das maltodextranas formadas após liquefação, liberando D-glicose, maltose e isomaltose. Enzimas de desramificação, tais como pululanase, podem ser usadas para ajudar a sacarificação. Sacarificação tipicamente ocorre sob condições acidicas em temperaturas elevadas, por exemplo, 60°C, pH 4,3. As glicoamilases usadas neste processo tipicamente são obtidas de fungos, por exemplo, glicoamilase de *Aspergillus niger* (AnGA) usado em Optidex® L400 ou glicoamilase de *Humicola grisea* (HgGA). As α-amilases maltogênicas atualmente usadas para esta aplicação incluem amilases vegetais e a α-amilase de *Aspergillus oryzae*, o ingrediente ativo de Clarase® L. Sacarificação pode ser usada para produzir xaropes de alta maltose ou ricos em glicose.

(3) Isomerização: um xarope rico em glicose pode ser ainda processado para produzir frutose, quando produtos mais doces são desejados. Isomerização de glicose à frutose é catalisada pela glicose isomerase e produz aproximadamente 42% (p/v) de frutose, glicose de 50 a 52% e uma mistura de outros açúcares. Manipulações adicionais enfim podem produzir a classe comercial HFCS tendo um conteúdo de frutose de 42%, 55% ou 90%, por exemplo.

As α-amilases e glicoamilases são adicionadas diretamente a um processo em batelada do xarope de milho e não são reutilizadas. Glicose isomerases, por outro lado, são imobilizadas em colunas sobre as quais a mistura de açúcar é passada. As colunas de glicose isomerase são reutilizadas até que as enzimas percam a maior parte de sua atividade.

A etapa de sacarificação é a etapa limitante da taxa de produção de HFCS. Sacarificação tipicamente ocorre durante 48 a 72 horas, tempo pelo qual muitas glicoamilases fúngicas perderam atividade significante. Além disso, embora ambas α-amilases maltogênicas e glicoamilases possam ser usadas para catalisar a sacarificação, as enzimas tipicamente funcionam em pH e temperaturas diferentes ótimos. Por exemplo, as α-amilases maltogênicas tipicamente têm um pH ótimo de pelo menos pH 5,0 e uma temperatura ótima de menos do que 55°C, enquanto AnGA tipicamente tem um pH ótimo de pH 4,0 a 4,5 e uma temperatura ótima de aproximadamente 60°C.

A diferença nas condições de reação entre as duas enzimas exige ajuste de pH e temperatura, que retarda o processo global e pode dar a origem à formação de agregados de amilose insolúveis. Qualquer α -amilase bacteriana restante será inativada quando o pH é reduzido; entretanto, a α -amilase bacteriana pode ser substituída mais tarde por uma α -amilase estável em ácido.

De maneira ideal, a etapa de sacarificação produz um xarope com uma composição de aproximadamente 95 a 97% p/p de glicose, 1 a 2% p/p de maltose, e 0,5 a 2% p/p de isomaltose. Este xarope rico em glicose pode ser usado na reação de isomerização, etapa (3) acima, ou usado para a produção de glicose cristalina. Estas altas concentrações de glicose não são facilmente alcançadas. Por exemplo, a glicoamilase de *Trichoderma reesei* (TrGA) oferece atividade específica melhorada em relação à AnGA ou HgGA; entretanto, TrGA produz um produto que tem uma concentração de glicose final tipicamente aproximadamente de 88% p/v. Além disso, altas concentrações de glicose no xarope promovem a conversão de glicose à maltose e maltotriose.

Consequentemente, há uma necessidade na técnica de um processo melhorado de produção de HFCS, que inclui uma etapa de sacarificação que usa uma α -amilase com um pH ótimo e temperatura ótima compatíveis com o uso de glicoamilases fúngicas. Há também uma necessidade por uma α -amilase que possa catalisar a sacarificação em menos tempo. Além disso, há uma necessidade por uma α -amilase que possa alcançar estes objetivos, produzindo um xarope após sacarificação que tem uma concentração de glicose de aproximadamente 96% p/p.

25 Sumário

Estas e outras necessidades na técnica são satisfeitas por uma α -amilase maltogênica de *Trichoderma reesei* (TrAA). A enzima, variantes da enzima e ácidos nucleicos de codificação são fornecidos. Células hospedeiras que expressam TrAA também são fornecidas.

30 TrAA é vantajosamente usada em vários processos, particularmente a sacarificação de maltodextranas formadas após liquefação. Em um aspecto, uma TrAA é usada em um processo de produção de maltose por si

mesma ou em combinação com outras enzimas, tais como pululanase. TrAA vantajosamente catalisa a produção de maltose em um pH relativamente baixo e temperatura alta, permitindo o uso de condições de reação compatíveis com glicoamilases fúngicas, por exemplo, AnGA. Além disso, a facilidade de produzir TrAA a faz mais econômica do que α -amilases atualmente usadas para produção de maltose.

Em outro aspecto, TrAA é usada em um processo de sacarificação que produz uma alta concentração de glicose. TrAA vantajosamente suprime a reação reversa que forma maltoligossacarídeos de glicose, permitindo concentrações de glicose em uma mistura de amido de milho processada alcançar concentrações tão altas como aproximadamente 96% p/v. Além disso, esta concentração de glicose pode ser alcançada em menos tempo que se a reação fosse catalisada com somente uma glicoamilase. Em uma modalidade, uma glicoamilase é adicionada com TrAA. A glicoamilase pode ser uma glicoamilase fúngica, tal como TrGA, ou uma mistura de glicoamilases pode ser adicionada, tais como uma combinação de TrGA, HgGA e AnGA, por exemplo.

Consequentemente, um objetivo é fornecer um polipeptídeo isolado compreendendo (i) resíduos 21 a 463 da SEQ ID NO:3, ou (ii) uma variante da α -amilase de *Trichoderma reesei* (TrAA), em que a variante tem a atividade de α -amilase e identidade de sequência de aminoácido de pelo menos 80%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% aos resíduos 21 a 463 da SEQ ID NO:3. Por exemplo, a variante pode ter de 1 a 10 substituições, inserções ou deleções de aminoácidos em comparação aos resíduos 21 a 463 da SEQ ID NO:3. Alternativamente, o polipeptídeo pode compreender SEQ ID NO: 3 ou resíduos 21 a 463 da SEQ ID NO:3, isto é, a sequência polipeptídica madura sem a sequência sinal. O polipeptídeo pode compreender uma sequência sinal de uma outra espécie exceto *Trichoderma reesei*. O polipeptídeo em uma modalidade é glicosilado. O polipeptídeo isolado ainda pode ser purificado.

Outro objetivo é fornecer um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo acima. O polinucleotídeo pode compreender SEQ ID NO:2, isto

é, uma sequência de cDNA. Um mRNA isolado também é fornecido, onde os resíduos T na SEQ ID NO:2 são substituídos com resíduos U (uracila).

Outro objetivo é fornecer um vetor compreendendo o polinucleotídeo acima, e uma célula bacteriana compreendendo este vetor. Uma célula hospedeira que expressa o polinucleotídeo também é fornecida, onde a célula hospedeira em uma modalidade é um *Trichoderma* sp., particularmente *T. reesei*. O hospedeiro alternativamente pode ser um RL-P37 isolado, uma célula fúngica filamentosa, um *Aspergillus* sp., um *Fusarium* sp., ou um *Penicillium* sp. A célula hospedeira *Aspergillus* pode ser *Aspergillus nidulans*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. aculeatus*, *A. niger*, ou *A. japonicus*. A célula hospedeira *Fusarium* pode ser *Fusarium oxysporum*, ou *F. solani*. A célula hospedeira pode ainda expressar um ácido nucleico que codifica uma glicoamilase heteróloga, isto é, uma glicoamilase que não é da mesma espécie que a célula hospedeira. A glicoamilase, por exemplo, pode ser uma glicoamilase de *Humicola grisea*. A célula hospedeira alternativamente ou além disso pode não expressar uma glicoamilase endógena da célula hospedeira.

Outro objetivo é fornecer um método de sacarificação de amido compreendendo: adição a uma solução de amido liquefeita de um polipeptídeo apresentado acima, e sacarificação da solução de amido liquefeita. O polipeptídeo pode ser adicionado à solução de amido liquefeita em aproximadamente 0,3 a 1 kg por tonelada métrica de sólidos secos. A solução de amido liquefeita pode ser uma pasta fluida do amido liquefeito em aproximadamente 20 a 35% p/p de sólidos secos.

O método de sacarificação do amido pode produzir um xarope rico em maltose. O método pode ainda compreender uma etapa de adição de pululanase, uma β -amilase, uma α -amilase fúngica que não é TrAA, uma protease, uma celulase, uma hemicelulase, uma lipase, uma cutinase, uma isoamilase ou uma combinação das mesmas, para uma solução de amido liquefeito. A solução de amido liquefeito pode estar a aproximadamente 50° a aproximadamente 60°. A solução de amido liquefeito pode estar em pH 4,0 a aproximadamente pH 6,0, ou aproximadamente pH 4,2 a aproximadamente pH 4,8.

É um objetivo adicional fornecer um amido que processa composição compreendendo o polipeptídeo acima e opcionalmente uma glicoamilase, uma pululanase, uma α -amilase, uma α -amilase fúngica que não é TrAA, uma protease, uma celulase, uma hemicelulase, uma lipase, uma cutinase, uma isoamilase, ou uma combinação das mesmas.

5 É outro objetivo fornecer uma composição de cozimento compreendendo o polipeptídeo acima em uma solução ou em um gel. Um método de cozimento compreendendo a adição da composição de cozimento de reivindicação 46 para uma substância a ser cozida e cozimento da substância.

10 É ainda um objeto adicional fornecer uma composição de desengomagem de tecido compreendendo o polipeptídeo em uma solução aquosa, e opcionalmente com outra enzima. Um método de desengomagem de um tecido compreende contatar com a composição de desengomagem com um tecido por um tempo suficiente para desengomar o tecido.

Breve Descrição dos Desenhos

Os desenhos associados são incorporados e constituem uma parte deste relatório descritivo e ilustram várias modalidades. Nos desenhos:

A figura 1 representa a capacidade da TrAA, na presença da glicoamilase, catalisar um processo de sacarificação com uma eficiência superior àquela alcançada pela glicoamilase sozinha. O eixo y mostra a porcentagem em peso de glicose (DPI) produzida após 24 horas de um processo de sacarificação em pH 4,2, 60°C. A reação foi catalisada por 1,0 kg/mt de sólidos secos de glicoamilase sozinha (GA) ou por GA combinada com a 20 quantidade indicada de TrAA em kg/mt de sólidos secos. Observa-se que a adição de 1 mg de enzima a 50 mL de uma solução contendo 32% de sólidos secos, por exemplo, significa que a solução contém 1 mg de enzima/16 25 g de sólidos secos, ou 0,0625 kg/mt de sólidos secos.

A figura 2 representa a capacidade da TrAA de catalisar a produção de maltose em um pH baixo. O eixo y mostra a porcentagem em peso de maltose (DP2) produzida após 24 horas de um processo de produção de maltose catalisada por 0,5 kg/mt de sólidos secos de TrAA a 55°C. O pH da 30

reação é mostrado no eixo x.

A figura 3 representa a capacidade da TrAA de catalisar a produção de maltose com uma eficiência comparável com porcentagem de Clarase® L. A porcentagem em peso de maltose (DP2) produzida após 48 horas de um processo de produção de maltose é mostrada no eixo y. A enzima usada para catalisar a reação é mostrada no eixo x. "Clarase": 10 SKBU/g de sólidos secos de Clarase® L em pH 5,5, 55°C. "10 TrAA": 10 SKBU/g de sólidos secos de α -amilase de *Trichoderma reesei* em pH 4,5, 60°C. "15 TrAA" e "20 TrAA" representam a TrAA em 15 SKBU/g de sólidos secos e 20 SKBU/g de sólidos secos, respectivamente, em pH 4,5, 60°C. "20 TrAA + PU" representa a adição de 0,25 kg/mt de sólidos secos de pululanase a 20 SKBU/g de sólidos secos de TrAA em pH 4,5, 60°C.

A figura 4 representa um processo de produção de maltose catalisado pela TrAA na quantidade ótima de pululanase. O eixo y mostra a porcentagem em peso de maltose (DP2) produzida após 48 horas em pH 4,6, 58°C na presença de 0,5 kg/mt de sólidos secos de TrAA. O eixo x mostra a quantidade da pululanase em kg/mt de sólidos secos adicionados à reação.

A figura 5 mostra proteínas resolvidas por SDS-PAGE a partir de uma alíquota de células cultivadas que expressam TrAA (coluna 1) ou de TrAA purificada (coluna 2). Os marcadores de pesos moleculares mostrados na coluna M.

A figura 6A mostra atividade de α -amilase relativa (em unidades arbitrárias) de TrAA purificada como uma função do pH, usando reagente Ceralpha (Megazyme International Ireland, Ltd., Wicklow, Ireland; Cat. Nº K-25 CERA) como um substrato.

A figura 6B mostra atividade de α -amilase relativa (em unidades arbitrárias) de TrAA purificada como uma função da temperatura, usando o mesmo substrato artificial.

As figura 7A e figura 7B é uma listagem das SEQ ID NOS:1 a 7.

30 Descrição Detalhada

Uma α -amilase fúngica é fornecida a partir de *Trichoderma reesei*. TrAA oferece várias vantagens sobre as α -amilases atualmente usadas.

Em primeiro lugar, TrAA é ativa em um pH relativamente baixo e alta temperatura, permitindo a enzima ser usada em combinação com uma glicoamilase fúngica sob as mesmas condições de reação. Isto livra da necessidade de realizar uma reação de sacarificação como um processo em batelada, 5 onde o pH e a temperatura devem ser reajustados para uso ótimo da α-amilase ou glicoamilase. Em segundo lugar, em combinação com uma pululanase, TrAA catalisa geração de maltose com a mesma eficiência como enzimas mais caras comumente usadas, tais como Clarase® L.

1. Definições & Abreviaturas

10 Conforme esta descrição detalhada, as seguintes abreviaturas e definições aplicam-se. Deve ser observado que como usado neste pedido, as formas singulares "um", "uma" e "o", "a", incluem referências plurais a menos que o contexto claramente dite de outra maneira. Dessa maneira, por exemplo, a referência a "uma enzima" inclui uma pluralidade de tais enzimas, e a referência a "a formulação" inclui referência a uma ou mais formulações e equivalentes das mesmas conhecidas por aqueles versados na técnica, e similares.

15

A menos que definido de outra maneira, todos os termos técnicos e científicos usados neste pedido têm a mesma significação que comumente entendida por um versado ordinário na técnica. Os seguintes termos 20 são fornecidos abaixo.

1.1. Definições

"Amilase" significa uma enzima que é, entre outras coisas, capaz de catalisar a degradação do amido. Geralmente, α-amilases (EC 3.2.1.1; α-D-(1→4)-glican glicano-hidrolase) são definidas como enzimas endoatuanteras clivando ligações α-D-(1→4) O-glicosídicas dentro da molécula de amido de uma maneira randômica. Ao contrário, as enzimas amilolíticas exoatuanteras, tais como α-amilases maltogênicas (EC 3.2.1.133); β-amilases (EC 3.2.1.2; e α-D-(1→4)-glican malto-hidrolase) clivam a molécula de amido a 25 partir da extremidade não-reduzida do substrato. β-Amilases, α-glicosidases (EC 3.2.1.20; α-D-glicosídeo glico-hidrolase), glicoamilase (EC 3.2.1.3; α-D-(1→4)-glican glico-hidrolase) e amilases específicas para o produto podem

produzir malto-oligossacarídeos de um tamanho específico a partir de amido. As glicoamilases liberam resíduos glicosil a partir das extremidades não-reduzidas de moléculas de amilopectina e amilose. As glicoamilases também catalisam a hidrólise de ligações α -1,6 e α -1,3, embora em taxa muito mais

5 lenta do que as ligações α -1,4.

"Variante de α -amilase", "polipeptídeo variante de α -amilase" e "enzima variante" significam uma proteína α -amilase que tem uma sequência de aminoácidos que foi modificada a partir da sequência de aminoácidos de uma α -amilase de tipo selvagem. Como usado neste pedido, "enzimas parentais", "sequência parental", "polipeptídeo parental", "proteína α -amilase de tipo selvagem" e "polipeptídeos parentais" significam enzimas e polipeptídeos a partir dos quais os polipeptídeos variantes de α -amilase são baseados, por exemplo, uma α -amilase de *Trichoderma reesei*. Por "ácido nucleico parental" é representada uma sequência de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo parental. Uma α -amilase de tipo selvagem ocorre naturalmente. "Variantes de α -amilase" diferenciam-se de uma α -amilase de tipo selvagem nos resíduos de aminoácido da proteína madura, isto é, sem uma sequência sinal. A variante de α -amilase pode ser uma proteína de fusão contendo um polipeptídeo de α -amilase heterólogo. Por exemplo, a proteína α -amilase

10 pode compreender uma proteína α -amilase madura ligada ao peptídeo sinal de outra α -amilase.

"Variantes" referem-se a polipeptídeos e ácidos nucleicos. O termo "variante" pode ser usado intercambiavelmente com o termo "mutante". As variantes incluem inserções, substituições, transversões, truncamentos e/ou inversões em uma ou mais posições na sequência de aminoácidos ou nucleotídica, respectivamente. Ácidos nucleicos variantes podem incluir sequências que são complementares a sequências que são capazes de hibridizar às sequências nucleotídicas apresentadas neste pedido. Por exemplo, uma sequência variante é complementar a sequências capazes de hibridizar sob condições estrigentes, por exemplo, 50°C e 0,2X SSC (1X SSC = NaCl a 0,15 M, citrato de sódio a 0,015 M, pH 7,0), às sequências nucleotídicas apresentadas neste pedido. Mais particularmente, o termo variante

15

20

25

30

engloba sequências que são complementares a sequências que são capazes de hibridizar sob condições altamente estrigentes, por exemplo, 65°C e 0,1X SSC, às sequências nucleotídicas apresentadas neste pedido.

- Como usado neste pedido, o termo "expressão" refere-se ao processo pelo qual um polipeptídeo é produzido com base na sequência de ácido nucleico de um gene. O processo inclui ambas transcrição e tradução.

"Isolado" significa que a sequência é pelo menos substancialmente livre de pelo menos um outro componente que a sequência é naturalmente associada e encontrada na natureza.

- "Purificado" significa que o material está em um estado relativamente puro, por exemplo, pelo menos aproximadamente 90% puro, pelo menos aproximadamente 95% puro ou pelo menos aproximadamente 98% puro.

- "Termoestável" significa que a enzima conserva a atividade após exposição a temperaturas elevadas. A termoestabilidade de uma enzima, tal como uma α-amilase, é medida pela sua meia-vida ($t_{1/2}$), onde a metade da atividade da enzima é perdida pela meia-vida. O valor de meia-vida é calculado sob condições definidas pela mensuração da atividade amilase residual.

- "Faixa de pH" significa a capacidade da enzima de exibir atividade catalítica em condições acídicas a básicas variando pH de 5 unidades ou mais.

Como usado neste pedido, "estável a pH" relaciona-se à capacidade da enzima de conservar atividade sobre uma ampla faixa de pHs.

- Como usado neste pedido, "sequência de aminoácido" é sinônima ao termo "polipeptídeo" e/ou o termo "proteína". Em alguns exemplos, o termo "sequência de aminoácido" é sinônimo ao termo "peptídeo"; em alguns exemplos, o termo "sequência de aminoácido" é sinônimo ao termo "enzima".

- Como usado neste pedido, "sequência nucleotídica" ou "sequência de ácido nucleico" se referem a uma sequência oligonucleotídica ou sequência polinucleotídica e variantes, homólogos, fragmentos e derivados das mesmas. A sequência nucleotídica pode ser de origem genômica, sintética

ou recombinante e pode ser dupla fita ou fita simples, se representar a fita de sentido direto ou sentido reverso. Como usado neste pedido, o termo "sequência nucleotídica" inclui DNA genômico, cDNA, DNA sintético e RNA.

"Homólogo" significa uma entidade que tem um certo grau de identidade ou "homologia" com as sequências de aminoácido objeto e as sequências nucleotídicas objeto. Uma "sequência homóloga" inclui um polinucleotídeo ou um polipeptídeo que tem uma certa porcentagem, por exemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 99% de identidade de sequência com outra sequência. Identidade de porcentagem significa que, quando alinhadas, aquela porcentagem de bases ou resíduos de aminoácido são os mesmos quando comparados às duas sequências. Sequências de aminoácido não são idênticas, onde um aminoácido é substituído, deletado ou adicionado em comparação à sequência objeto. A porcentagem de identidade de sequência tipicamente é medida em relação à sequência madura da proteína objeto, isto é, após modificação pós-traducional para remover uma sequência sinal, por exemplo. Tipicamente, homólogos compreenderão os mesmos resíduos de sítio ativos que a sequência de aminoácido objeto. Homólogos também conservam atividade α -amilase maltogênica, embora o homólogo possa ter propriedades enzimáticas diferentes que a proteína objeto.

Como usado neste pedido, "hibridização" inclui o processo pelo qual uma fita de ácido nucleico se junta com uma fita complementar através do pareamento de bases, bem como o processo de amplificação como realizado nas tecnologias de reação de polimerase em cadeia (PCR). O ácido nucleico variante de α -amilase pode existir como DNA ou RNA fita simples ou dupla, um heteroduplex de RNA/DNA ou um copolímero de RNA/DNA. Como usado neste pedido, "copolímero" refere-se a uma fita simples de ácido nucleico que compreende ambos ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos. O ácido nucleico variante de α -amilase pode ser otimizado pelo códon para ainda aumentar a expressão.

Como usado neste pedido, um composto "sintético" é produzido por síntese química ou enzimática *in vitro*. Inclui, mas não é limitado a, ácidos nucleicos de variante de α -amilase feitos com uso ótimo do códon de

organismos hospedeiros, tais como leveduras metilotróficas *Pichia*, *Hansenula*, *Streptomyces* e *Trichoderma*, por exemplo, *T. reesei*, ou outros hospedeiros de expressão de escolha.

Como usado neste pedido, "célula transformada" inclui células, 5 incluindo ambas as células bacterianas e fúngicas, que foram transformadas pelo uso de técnicas de DNA recombinante. Transformação tipicamente ocorre pela inserção de uma ou mais sequências nucleotídicas em uma célula. A sequência nucleotídica inserida pode ser uma sequência nucleotídica heteróloga, isto é, é uma sequência que não é natural para a célula que deve ser transformada, tal como uma proteína de fusão.
10

Como usado neste pedido, "operacionalmente ligado" significa que os componentes descritos estão em uma relação que os permite funcionar em sua maneira desejada. Por exemplo, uma sequência regulatória operacionalmente ligada a uma sequência de codificação é ligada de tal modo 15 que a expressão da sequência de codificação é realizada sob condição compatível com as sequências de controle.

Como usado neste pedido, "biologicamente ativo" refere-se a uma sequência tendo uma função estrutural, regulatória ou bioquímica similar à sequência que ocorre naturalmente, embora não necessariamente no 20 mesmo grau.

O termo "fungos filamentosos" refere-se a todas as formas filamentosas da subdivisão Eumycotina. Ver Alexopoulos, INTRODUCTORY MYCOLOGY, Wiley, New York (1962). Estes fungos são caracterizados por um micélio vegetativo com uma parede celular composta de quitina, celulose 25 e outros polissacarídeos complexos. Fungos filamentosos são morfologicamente, fisiologicamente e geneticamente distintos de leveduras. O crescimento vegetativo em fungos filamentosos é através de alongamento de hifas e catabolismo de carbono é obrigatoriamente aeróbico. Uma célula parental fúngica filamentosa pode ser uma célula de *Trichoderma* sp., por exemplo, 30 *T. reesei* (anteriormente classificado como *T. longibrachiatum* e atualmente também conhecido como *Hypocrea jecorina*), *T. viride*, *T. koningii*, *T. harzianum*; *Penicillium* sp.; *Humicola* sp., por exemplo, *H. insolens* e *H. grisea*; C-

hrysosporium sp., por exemplo, *C. lucknowense*; *Gliocladium* sp.; *Aspergillus* sp., por exemplo, *A. oryzae*, *A. niger* e *A. awamori*; *Fusarium* sp.; *Neurospora* sp.; *Hypocrea* sp.; e *Emericella* sp. Ver também Innis et al. *Science* 228: 21-26 (1985).

5 Como usado neste pedido, o termo "amido" refere-se a qualquer material compreendido dos carboidratos polissacarídicos complexos de plantas, compreendidos de amilose e amilopectina com a fórmula $(C_6H_{10}O_5)_x$, onde X pode ser qualquer número. O termo "amido granular" refere-se amido bruto, isto é, amido não cozido, por exemplo, aquele que não foi submetido à gelatinização.
 10

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

O termo "liquefação" refere-se ao estágio na conversão do amido em que amido gelatinizado é hidrolisado para formar dextrinas solúveis
 15 de baixo peso molecular. O termo "grau de polimerização" (DP) refere-se ao número (n) de unidades de anidroglicopiranose em um dado sacarídeo. Exemplos de DP1 são os monossacarídeos glicose e frutose. Exemplos de DP2 são os dissacarídeos maltose e sacarose.

Como usado neste pedido, o termo "conteúdo de sólidos secos"
 20 (ds) refere-se aos sólidos totais de uma pasta fluida em uma base de percentagem de peso seco. O termo "pasta fluida" refere-se a uma mistura aquosa contendo sólidos insolúveis.

O termo "DE", ou "dextrose equivalente" é definido como a percentagem de redução de açúcar, isto é, D-glicose, como uma fração de carboidrato total em um xarope.
 25

A frase "sacarificação e fermentação simultânea (SSF)" refere-se a um processo na produção de bioquímicos nos quais um organismo microbiano, tal como um micro-organismo de produção de etanol e pelo menos uma enzima, tal como TrAA ou uma variante da mesma, estão presentes
 30 durante a mesma etapa do processo. SSF refere-se à hidrólise contemporânea de substratos de amido granular a sacarídeos, incluindo a glicose, e a fermentação dos sacarídeos e, álcool, por exemplo, no mesmo vaso de rea-

ção.

Como usado neste pedido "micro-organismo etanogênico" refere-se a um micro-organismo com capacidade de converter um açúcar ou oligossacarídeo em etanol.

5 1.2. Abreviaturas

As seguintes abreviaturas aplicam-se a menos que indicado de outra maneira:

ADA	azodicarbonamida
AnGA	glicoamilase de <i>Aspergillus niger</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BBA	β -amilase Spezyme® BBA 1500L
cDNA	DNA complementar
DE	Dextrose Equivalente
DEAE	dietilamino etanol
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNS	ácido 3,5-dinitrossalicílico
DPn	grau de polimerização com n subunidades
Ds	sólido seco
EC	encarregado enzimático para classificação enzimática
EDTA	ácido etilenodiaminotetra-acético
FGSC	Fungal Genetics Stock Center
G173A	resíduo glicina (G) na posição 173 é substituído por uma resíduo de alanina (A) onde os aminoácidos são denominados pelas abreviações de letra única comumente conhecidas na técnica
GA	Glicoamilase
GAU	unidade de atividade de glicoamilase
HFCS	xarope de milho de alta frutose
HFSS	xarope baseado em amido de alta frutose
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
HgGA	glicosilase de <i>Humicola grisea</i>
HS	açúcares maiores (DPn, onde n > 3)

kb	Quilobase
LAT	α -amilase de <i>B. licheniformis</i>
LB	caldo de Luria Bertani
LU	Unidades de Lipase, uma medição da atividade de fosfolipase por unidade de massa de enzima
MOPS	ácido 3-(n-morfolino) propanossulfônico
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
mt	tonelada métrica (1000 kg)
PCR	reação da polimerase em cadeia
PEG	Polietilenoglicol
ppm	partes por milhão
PU	pululanase ou unidades de pululanase
RT-PCR	reação da polimerase em cadeia por transcriptase reversa
SD	caldo de dextrose Sabouraud
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio
SKBU/g ds	Unidade de α -Amilase por grama de sólidos secos. Uma Unidade de α -Amilase dextriniza um grama de substrato limitado por dextrina por hora sob condições do ensaio
1X SSC	NaCl a 0,15 M, citrato de sódio a 0,015 M, pH 7,0
SSF	sacariação e fermentação simultâneas
TE	Tris a 10 mM, pH 7,4, EDTA a 1 mM
TrAA	α -amilase de <i>Trichoderma reesei</i>
TrGA	glicoamilase de <i>Trichoderma reesei</i>
p/v	peso/volume
p/p	peso/peso
YM	Caldo de Extrato de Malte de Levedura
μ L	Microlitro

2. α -Amilase de *Trichoderma reesei* (TrAA) e variantes da mesma

Um polipeptídeo isolado e/ou purificado compreendendo a SEQ ID NO:3 é fornecido. Esta é uma α -amilase de *Trichoderma reesei* de tipo selvagem (TrAA) compreendendo uma sequência líder de 20 aminoácidos.

Em uma modalidade, a TrAA é uma forma madura do polipeptídeo, em que a sequência líder de 20 aminoácidos é clivada, para que o N-terminal do polipeptídeo comece no resíduo de ácido aspártico (D) na posição 21 da SEQ ID NO:3. Ácidos nucleicos que codificam o polipeptídeo compreendendo a

- 5 SEQ ID NO:3 ou resíduos de aminoácido 21 a 463 da SEQ ID NO: 3 também são fornecidos. Em uma modalidade, uma TrAA de codificação de ácido nucleico é um DNA genômico compreendendo a SEQ ID NO:1; em outra modalidade, o ácido nucleico é um cDNA compreendendo SEQ ID NO:2. Como é bem entendido por um versado na técnica, o código genético é de-
10 generado, significando que múltiplos códons em alguns casos podem codifi-
car o mesmo aminoácido. Ácidos nucleicos incluem DNA genômico, mRNA e cDNA que codificam uma TrAA ou variante da mesma.

Além da α -amilase de *Trichoderma reesei* de tipo selvagem (TrAA), variantes das mesmas são as fornecidas que diferem da sequência

- 15 de TrAA de tipo selvagem mostrada na SEQ ID NO: 3 por substituição, in-
serção ou deleção de um ou mais aminoácidos. Por exemplo, uma α -amilase variante pode compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, ou 40 modificações de aminoácidos, por exemplo, 1 a 10 substi-
tuições de aminoácidos, que conservam a atividade α -amilase maltogênica.
20 A TrAA variante pode conservar uma atividade específica mais alta ou mais baixa do que a TrAA de tipo selvagem. As variantes são sinônimas a "homó-
logos". Ácidos nucleicos variantes são os fornecidos que codificam polipep-
tídeos variantes. Ácidos nucleicos variantes incluem todos os ácidos nuclei-
cos que codificam os polipeptídeos variantes.

25 2.1. Caracterização da Variante de TrAA

Variantes enzimáticas podem ser caracterizadas pelas suas se-
quências polipeptídicas primárias e de ácidos nucleicos, por modelagem es-
trutural tridimensional, e/ou por sua atividade específica. Características adi-
cionais da variante de TrAA incluem estabilidade, faixa de pH, estabilidade à
30 oxidação e termoestabilidade, por exemplo. Em um aspecto, as variantes de TrAA são expressas a níveis mais altos do que a TrAA de tipo selvagem,
enquanto conservam as características de desempenho da TrAA de tipo sel-

vagem. Níveis de expressão e atividade enzimática podem ser avaliados usando ensaios padrão conhecidos ao versado neste campo. Em outro aspecto, variantes demonstram características de desempenho melhoradas em relação à enzima de tipo selvagem, tais como estabilidade melhorada em 5 altas temperaturas (isto é, 70 a 120°C) e/ou extremos de pH (isto é, pH 4,0 a 6,0, ou pH 8,0 a 11,0).

Uma característica de expressão significa um nível alterado da expressão da variante, quando a variante é produzida em uma determinada célula hospedeira. A expressão geralmente relaciona-se à quantidade da 10 variante ativa que é recuperável de um caldo de fermentação usando técnicas padrão conhecidas nesta técnica em um dado período de tempo. A expressão também pode relacionar-se à quantidade ou taxa da variante produzida na célula hospedeira ou secretada pela célula hospedeira. A expressão também pode relacionar-se à taxa de tradução do mRNA que codifica a enzima de variantes.

As variantes de TrAA também podem ter alterado a estabilidade de oxidação em comparação com a α-amilase parental. Por exemplo, a estabilidade de oxidação reduzida pode ser vantajosa na composição da liquefação de amido.

20 Variante de TrAA pode ser mais termoestável do que a α-amilase de tipo selvagem. Tais variantes de TrAA são vantajosas para o uso em cozimento ou outros processos que necessitam temperaturas elevadas. Por exemplo, uma variante de TrAA termoestável pode degradar o amido em temperaturas de aproximadamente 55°C a aproximadamente 80°C ou mais. 25 Uma variante de TrAA termoestável pode conservar sua atividade após exposição a temperaturas de até aproximadamente 95°C.

Os polipeptídeos variantes de α-amilase descritos neste pedido também podem ter mutações que estendem a meia-vida em relação à enzima parental em 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 30 200% ou mais, particularmente em temperaturas elevadas de aproximadamente 55°C a aproximadamente 95°C ou mais, particularmente a aproximadamente 80°C. Em uma modalidade, a variante de TrAA pode ser aquecida

por aproximadamente 1 a 10 minutos a 80°C ou maior.

Os polipeptídeos variantes de TrAA podem ainda incluir mutações na sequência sinal do polipeptídeo parental, ou em outro lugar no polipeptídeo TrAA parental. Por exemplo, a variante de TrAA pode estar na forma de uma proteína de fusão compreendendo um polipeptídeo heterólogo, tal como o peptídeo sinal de *B. licheniformis* (LAT), fusionado à TrAA para promover a secreção da proteína expressa de uma célula hospedeira bacteriana. Outros polipeptídeos heterólogos que podem ser fusionados a variantes de TrAA incluem sequências para facilitar a purificação da proteína expressa, por exemplo. Em uma modalidade, uma sequência heteróloga inclui um sítio sensível à protease que permite à sequência heteróloga ser clivada a partir da variante de TrAA expressa.

Em um aspecto, o polipeptídeo variante de TrAA codificado pelo ácido nucleico tem a mesma estabilidade ao pH que a sequência parental. Em outro aspecto, a variante de TrAA compreende uma mutação que confere uma maior faixa de estabilidade ao pH ou desloca a faixa de pH para uma área desejada para objetivo de fins comerciais da enzima. Por exemplo, em uma modalidade, a variante de TrAA pode degradar o amido em aproximadamente pH 4,5 a aproximadamente pH 10,5. O polipeptídeo variante de TrAA pode ter uma meia-vida mais longa ou atividade mais alta (dependendo do ensaio) em comparação com o polipeptídeo parental sob condições idênticas, ou a variante de TrAA pode ter a mesma atividade que o polipeptídeo parental. O polipeptídeo variante de α-amilase também pode ter meia-vida de aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% ou mais longa em comparação com seu polipeptídeo parental sob condições de pH idênticas. Alternativamente, ou ainda, a variante de TrAA pode ter atividade específica mais alta em comparação com o polipeptídeo parental sob condições de pH idênticas.

Em outro aspecto, um ácido nucleico complementar a um ácido nucleico que codifica alguma das variantes de TrAA apresentadas neste pedido é fornecido. Adicionalmente, um ácido nucleico capaz de hibridizar ao complemento é fornecido. Em outra modalidade, a sequência para uso nos

métodos e composições descritas neste pedido é uma sequência sintética. Inclui, mas não é limitada a sequências feitas com uso ótimo de códon para expressão em organismos hospedeiros, tais como leveduras metilotróficas *Trichoderma*, *Pichia* e *Hansenula*.

5 3. Produção de TrAA e variantes da mesma

Em uma modalidade, a TrAA de tipo selvagem é expressa em uma cepa de *T. reesei* e opcionalmente é isolada antes do uso. Em outra modalidade, a TrAA de tipo selvagem é purificada, após expressão. As cepas de *T. reesei* particularmente úteis são selecionadas usando técnicas bem-conhecidas ao versado que expressam TrAA de tipo selvagem em altos níveis. A expressão de alto nível pode ser aproximadamente 12 a 20 g de TrAA ou uma variante da mesma por litro do meio de cultura, aproximadamente 14 a 18g/L, ou aproximadamente 16 a 19g/L. Em outras modalidades, a TrAA de tipo selvagem ou uma variante da mesma é recombinantemente expressa em uma célula hospedeira. O gene de TrAA pode ser clonado e expresso como descrito, por exemplo, nos Pedidos de Patente Americana Publicados Nº 2007/0004018 e Nº 2006/0094080.

3.1 Enzimas Recombinantemente Expressas.

Em algumas modalidades, os micro-organismos são geneticamente construídos para expressar TrAA ou suas variantes. Células hospedeiras adequadas incluem células fúngicas filamentosas, que podem ser uma cepa de *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp. ou *Penicillium* sp., por exemplo. Células hospedeiras fúngicas particularmente adequadas incluem *Aspergillus nidulans*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. japonicus*, *Trichoderma reesei*, *T. viride*, *Fusarium oxysporum* e *F. solani*. Cepas de *Aspergillus* são descritas em Ward et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:738-743 (1993) e Goedegebuur et al., *Curr. Gene.* 41:89-98 (2002). Em uma modalidade particularmente adequada, o hospedeiro é uma cepa de *Trichoderma reesei* que produz TrAA em níveis relativamente altos, por exemplo, 15 a 20 g/L. *T. reesei* adequadas são conhecidas, e exemplos não-limitantes incluem ATCC Nº 13631, ATCC Nº 26921, ATCC Nº 56764, ATCC Nº 56765, ATCC Nº 56767 e NRRL 15709. Em algumas modalidades, a ce-

pa hospedeira é um derivado de RL-P37, que é descrito em Sheir-Neiss et al., *Appl. Microbiol. Biotechnology* 20:46-53 (1984). Quando TrAA ou suas variantes são expressas em uma célula hospedeira eucariótica, a TrAA expressa em uma modalidade particularmente adequada tem o mesmo padrão

5 da glicosilação como encontrado na TrAA de tipo selvagem. Células hospedeiras particularmente adequadas incluem células hospedeiras de *Trichoderma reesei* construídas de acordo com os procedimentos apresentados na Patente Americana Nº 5.874.276 e WO 05/001036 (Genencor International, Inc.).

10 Em outras modalidades, a célula hospedeira será uma célula hospedeira geneticamente construída com genes nativos inativados, por exemplo, genes deletados. Por exemplo, inativação de um ou mais genes em uma célula hospedeira fúngica pode empregar métodos conhecidos, tais como os descritos na Patente Americana Nº 5.246.853, Patente Americana
15 Nº 5.475.101 e WO92/06209. A inativação gênica pode ser realizada pela deleção completa ou parcial, pela inativação insercional, ou por quaisquer outros meios que forneçam um gene não funcional para seu objetivo desejado, tal que o gene é inibido de expressão de uma proteína funcional. Genes inativados podem incluir, por exemplo, genes que codificam enzimas celulolíticas, tais como endoglicanases e exocellobiohidrolases, por exemplo, *cbh1*,
20 *cbh2*, *egl1*, *egl2* e *egl3*. Em uma modalidade, quando a célula hospedeira é uma célula *Trichoderma*, particularmente uma célula hospedeira *T. reesei*, os genes *cbh1*, *cbh2*, *egl1* e *egl2* serão inativados e particularmente deletados. Células *T. reesei* hospedeiras particularmente adequadas tendo proteínas quad-deletadas são apresentadas e descritas na Patente Americana Nº
25 5.874.276 e WO 05/001036. Em outra modalidade, a Patente Americana Nº 5.650.322 revela cepas derivadas de RL-P37 tendo deleções no gene *cbh1* e no gene *cbh2*, por exemplo.

30 Em outra modalidade, células hospedeiras adequadas incluem uma bactéria Gram-positiva selecionada a partir do grupo composto de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B.*

thuringiensis, *Streptomyces lividans* ou *S. murinus*; ou uma bactéria Gram-negativa, em que a dita bactéria Gram-negativa é *Escherichia coli* ou uma espécie *Pseudomonas*.

- Em algumas modalidades, uma célula hospedeira é geneticamente projetada para expressar uma variante de TrAA com uma sequência de aminoácido que tem identidade de pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% com a TrAA de tipo selvagem. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo que codifica uma TrAA ou variante da mesma terá uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO:2 ou uma sequência de ácido nucleico que tem identidade de sequência de pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% com SEQ ID NO:2. Em outras modalidades, a cepa hospedeira expressando uma TrAA ou variante da mesma também é geneticamente construída para expressar uma GA heteróloga.

- ### 3.2. Vetores
- Em algumas modalidades, um construto de DNA compreendendo um ácido nucleico que codifica uma TrAA ou variante da mesma é construído para ser expresso em uma célula hospedeira. Ácidos nucleicos representativos que codificam TrAA incluem SEQ ID NO:1 e 2. Em uma modalidade, o construto de DNA é transferido para uma célula hospedeira por um vetor de expressão que compreende sequências regulatórias operacionalmente ligadas a uma sequência de codificação de TrAA.

- O vetor pode ser qualquer vetor que pode ser integrado em um genoma da célula hospedeira fúngica e replicado quando introduzido na célula hospedeira. O Catálogo de Cepas FGSC (lista vetores adequados. Ver FGSC, Catálogo de Cepas, University of Missouri, em www.fgsc.net (última modificação em 17 de janeiro de 2007). Exemplos adicionais de vetores de expressão e/ou integração adequados são fornecidos em Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); Bennett *et al*, MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press, San Diego (1991), pp. 396 a 428; e Patente Americana Nº 5.874.276. Vetores particularmente úteis incluem pFB6, pBR322, pUC18, pUC100 e pENTR/D,

pDON™ 201, pDONR™ 221, pENTR™, pGEM® 3Z e pGEM® 4Z. Plasmídeos adequados para uso em células bacterianas incluem pBR322 e pUC19, que permitem a replicação em *E.coli*, e pE194, por exemplo, que permite a replicação em *Bacillus*.

- 5 Em algumas modalidades, um ácido nucleico que codifica uma TrAA ou uma variante da mesma é operacionalmente ligado a um promotor adequado, que permite a transcrição na célula hospedeira. O promotor pode ser derivado de genes que codificam proteína homóloga ou heteróloga à célula hospedeira. Preferencialmente, o promotor é útil em um hospedeiro de
- 10 10 *Trichoderma*. Exemplos não-limitantes adequados de promotores incluem promotores *cbh1*, *cbh2*, *egl1* e *egl2*. Em uma modalidade, o promotor é aquele que é nativo à célula hospedeira. Por exemplo, quando *T. reesei* é o hospedeiro, o promotor é um promotor de *T. reesei* nativo. Em uma modalidade, o promotor é *cbh1* de *T. reesei*, que é um promotor induzível que é depositado
- 15 15 no GenBank sob o número de acesso D86235. Um "promotor induzível" é um promotor que é ativo sob regulação ambiental ou desenvolvimento. Em outra modalidade, o promotor é aquele que é heterólogo à célula hospedeira. Outros exemplos de promotores úteis incluem promotores de *Aspergillus awamori* e genes de glicoamilase de *A. niger*. Ver Nunberg *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 4: 2306-2315 (1984) e Boel *et al.*, *EMBO J.* 3: 1581-1585 (1984).
- 20 20

Em algumas modalidades, a sequência de codificação é operacionalmente ligada a uma sequência sinal. O DNA que codifica a sequência sinal pode ser a sequência de DNA naturalmente associada com o gene de TrAA a ser expresso. Por exemplo, o DNA de codificação pode compreender 25 a sequência nucleotídica de SEQ ID NO:4, que codifica a sequência sinal de TrAA da SEQ ID NO:5. Em outras modalidades, o DNA de codificação não compreende SEQ ID NO:4, que é substituído por uma sequência nucleotídica que codifica uma sequência sinal de uma espécie exceto *Trichoderma reesei*. Nesta modalidade, o polinucleotídeo que codifica a sequência sinal 30 está imediatamente a montante e na região do polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo. Em modalidades adicionais, uma sequência sinal e uma sequência promotora compreendendo um construto ou vetor de DNA a ser in-

troduzido em uma célula hospedeira fúngica são derivadas da mesma fonte. Por exemplo, em algumas modalidades, a sequência sinal é a sequência sinal de *cbh1* que está operacionalmente ligada a um promotor *cbh1*.

Em algumas modalidades, o vetor de expressão também inclui 5 uma sequência de terminação. Em uma modalidade, a sequência de terminação e a sequência promotora são derivadas da mesma fonte. Em outra modalidade, a sequência de terminação é homóloga à célula hospedeira. Uma sequência terminadora particularmente adequada é *cbh1* derivada de 10 uma cepa de *Trichoderma* e particularmente *T. reesei*. Outros terminadores fúngicos úteis incluem o terminador do gene de glicoamilase de *Aspergillus niger* ou *A. awamori*. Ver Nunberg *et al.* (1984), *supra*, e Boel *et al.* (1984), *supra*.

Em algumas modalidades, um vetor de expressão inclui um marcador selecionável. Exemplos de marcadores selecionáveis adequados 15 incluem aqueles que conferem resistência a agentes antimicrobianos, por exemplo, higromicina ou fleomicina. Marcadores seletivos nutricionais também são adequados e incluem *amdS*, *argB* e *pyr4*. Marcadores úteis em sistemas de vetor de transformação de *Trichoderma* são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, BIOTECHNOLOGY OF FILAMENTOUS FUNGI, Fin- 20 kelstein *et al.*, Eds., Butterworth-Heinemann, Boston, Mass. (1992), Cap. 6; e Kinghorn *et al.*, APPLIED MOLECULAR GENETICS OF FILAMENTOUS FUNGI, Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, London (1992). Em uma modalidade, o marcador seletivo é o gene *amdS*, que codifica a enzima acetamidase; permite a células transformadas crescer em acetamida como uma fonte de nitrogênio. O uso de um gene *amdS* de *A. nidulans* como um marcador seletivo é descrito em Kelley *et al.*, EMBO J. 4: 475- 25 479 (1985) e Penttila *et al.*, Gene 61:155-164 (1987).

Um vetor de expressão adequado compreendendo um construto 30 de DNA com um polinucleotídeo que codifica uma TrAA ou variante da mesma pode ser qualquer vetor que é capaz de replicação autonomamente em um dado organismo hospedeiro ou integração no DNA do hospedeiro. Em algumas modalidades, o vetor de expressão é um plasmídeo. Em algu-

mas modalidades, dois tipos de vetores de expressão para obtenção da expressão de genes são contemplados. O primeiro vetor de expressão comprehende sequências de DNA nas quais o promotor, região de codificação de TrAA, e terminador todos se originam do gene a ser expresso. Em algumas 5 modalidades, o truncamento gênico é obtido pela deleção de sequências de DNA não desejadas, por exemplo, DNA que codifica domínios não desejados, para deixar o domínio a ser expresso no controle das suas próprias sequências regulatórias transcricionais e traducionais. O segundo tipo do vetor de expressão é pré-montado e contém sequências necessárias para a transcrição de alto nível e um marcador selecionável. Em algumas modalidades, 10 a região de codificação de um gene de TrAA ou parte do mesmo é inserida neste vetor de expressão de uso geral, tal que está sob o controle transcripcional das sequências promotoras e terminadoras do construto de expressão. Em algumas modalidades, genes ou parte dos mesmos são inseridos a 15 jusante do promotor *cbh1* forte.

Métodos usados para ligar um construto de DNA comprehendendo um polinucleotídeo que codifica uma TrAA ou variante da mesma, um promotor, um terminador e outras sequências e métodos para inserir o construto em um vetor adequado são bem-conhecidos na técnica. A ligação é 20 geralmente realizada pela ligação a sítios de restrição convenientes. Se tais sítios não existem, os ligadores de oligonucleotídeos sintéticos são usados conforme a prática convencional. Ver, por exemplo, Sambrook (2001), *supra*, e Bennett *et al.* (1991), *supra*. Adicionalmente, vetores podem ser construídos usando técnicas de recombinação conhecidas bem-conhecidas na técnica. 25

Métodos conhecidos podem ser usados para obter uma célula hospedeira fúngica tendo um ou mais genes inativados, como descrito, por exemplo, na Patente Americana Nº 5.246.853; Patente Americana Nº 5.475.101; e WO 92/06209. A inativação gênica pode ser realizada pela deleção completa ou parcial, pela inativação insercional ou por qualquer outro meio que fornece um gene não funcional para seu alvo desejado, tal que o gene é inibido de expressão de uma proteína funcional. Qualquer gene de

uma *Trichoderma* sp. ou outro hospedeiro fúngico filamentoso que foi clonado pode ser deletado, por exemplo, genes *cbh1*, *cbh2*, *egII* e *egI/2*. Em algumas modalidades, a deleção gênica pode ser realizada pela inserção de uma forma do gene desejado a ser inativado em um plasmídeo por métodos conhecidos na técnica. O plasmídeo de deleção então é cortado em um sítio(s) de enzima de restrição apropriado interno na região de codificação gênica desejada, e a sequência de codificação gênica ou uma parte da mesma é substituída com um marcador selecionável. Sequências de DNA flanqueadoras a partir do locus do gene a ser deletado, por exemplo, entre aproximadamente 0,5 a 2,0 kb, permanece em ambos os lados do gene marcador. Um plasmídeo de deleção apropriado terá geralmente sítios de restrição enzimática únicos presentes para permitir o fragmento contendo o gene deletado, incluindo as sequências de DNA flanqueadoras e os marcadores genéticos selecionáveis, ser removido como uma parte linear única.

15 3.3 Transformação, Expressão e Cultura de Células Hospedeiras

A introdução de um construto de DNA ou vetor em uma célula hospedeira inclui técnicas, tais como transformação; eletroporação; microinjeção nuclear; transdução; transfecção, por exemplo, transfecção mediada por lipofecção e mediada por DEAE-dextrina; precipitação de DNA por incubação com fosfato de cálcio; bombardeio de alta velocidade com microprojéteis revestidos com DNA; e fusão protoplástica. Técnicas de transformação gerais são conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Ausubel *et al.* (1987), *supra*, capítulo 9; Sambrook *et al.* (2001), *supra*; e Campbell *et al.*, *Curr. Genet.* 16:53-56 (1989). A expressão da proteína heteróloga em *Trichoderma* é descrita, por exemplo, na Patente Americana Nº 6.022.725; Patente Americana Nº 6.268.328; Harkki *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.* 13: 227-233 (1991); Harkki *et al.*, *BioTechnol.* 7:596-603 (1989); EP 244.234; EP 215.594; e Nevalainen *et al.*, "The molecular biology of *Trichoderma* and its application to the expression of both homologous and heterologous genes," em MOLECULAR INDUSTRIAL MYCOLOGY, Leong and Berka, eds., Marcel Dekker Inc., New York (1992), pp. 129-148. Referência também é feita a Cao *et al.*, *Science* 9: 991-1001 (2000) para transformação de cepas de As-

pergillus. Em uma modalidade, transformantes geneticamente estáveis são construídos com sistemas de vetor pelo qual o ácido nucleico que codifica uma TrAA ou variante da mesma é estavelmente integrado em um cromossomo da célula hospedeira. Transformantes então são purificados por técnicas conhecidas.

Em um exemplo não-limitante, os transformantes estáveis incluindo um marcador *amdS* são distinguidos de transformantes não estáveis pela sua taxa de crescimento mais rápida e a formação de colônias circulares com um traçado regular, em vez de irregular no meio de cultura sólido contendo acetamida. Adicionalmente, em alguns casos um teste adicional de estabilidade é conduzido pelo cultivo dos transformantes em meio não seletivo sólido, por exemplo, um meio sem acetamida, coleta de esporos deste meio de cultura e determinação da porcentagem destes esporos que posteriormente germinam e crescem em meio seletivo contendo acetamida. Outros métodos conhecidos na técnica podem ser usados para selecionar transformantes.

Em uma modalidade específica, a preparação de *Trichoderma* sp. para transformação envolve a preparação de protoplastos de micélios fúngicos. Ver Campbell *et al.*, *Curr. Genet.* 16: 53-56 (1989). Em algumas modalidades, os micélios são obtidos de esporos vegetativos germinados. Os micélios são tratados com uma enzima que digere a parede celular, resultando em protoplastos. Os protoplastos são protegidos pela presença de um estabilizador osmótico no meio de suspensão. Estes estabilizadores incluem sorbitol, manitol, cloreto de potássio, sulfato de magnésio e similares. Normalmente a concentração destes estabilizadores varia entre 0,8 M e 1,2 M, por exemplo, uma solução a 1,2 M de sorbitol pode ser usada no meio de suspensão.

A entrada de DNA na cepa hospedeira *Trichoderma* sp. é dependente da concentração de íon de cálcio. Geralmente, entre aproximadamente 10 a 50 mM de CaCl₂ são usados em uma solução de entrada. Compostos adequados adicionais incluem um sistema de tamponamento, tal como tampão TE (Tris a 10 mM, pH 7,4; EDTA a 1 mM) ou MOPS 10 mM, pH

6,0 e polietileno glicol. Acredita-se que o polietileno glicol fusiona-se às membranas celulares, permitindo dessa forma os conteúdos do meio serem entregues no citoplasma da cepa de *Trichoderma sp.*. Esta fusão frequentemente deixa múltiplas cópias do DNA do plasmídeo integradas no cromossomo do hospedeiro.

Normalmente a transformação de *Trichoderma sp.* usa protoplastos ou células que foram submetidas a um tratamento de permeabilidade, tipicamente a uma densidade de 10^5 a 10^7 /mL, particularmente 2×10^6 /mL. Um volume de 100 µL destes protoplastos ou células em uma solução apropriada (por exemplo, sorbitol a 1,2 M e CaCl₂ a 50 mM) são misturados com o DNA desejado. Geralmente, uma alta concentração de PEG é adicionada à solução de entrada. De 0,1 a 1 volume de PEG 4000 a 25% pode ser adicionado à suspensão de protoplasto; entretanto, é útil adicionar aproximadamente 0,25 volume à suspensão de protoplasto. Os aditivos, tais como sulfóxido de dimetila, heparina, espermidina, cloreto de potássio e similares, também podem ser adicionados à solução de entrada para facilitar a transformação. Procedimentos similares estão disponíveis para outras células hospedeiras fúngicas. Ver, por exemplo, Patentes Americanas Nos. 6.022.725 e 6.268.328, ambas as quais estão incorporadas por referência.

Geralmente, a mistura é então incubada em aproximadamente 0°C por um período entre 10 a 30 minutos. PEG adicional então é adicionado à mistura para aumentar ainda a entrada do gene ou sequência de DNA desejados. PEG 4000 a 25% é geralmente adicionado em volumes de 5 a 15 vezes o volume da mistura de transformação; entretanto, os maiores e menores volumes podem ser adequados. PEG 4000 a 25% é tipicamente aproximadamente 10 vezes o volume da mistura de transformação. Após PEG ser adicionado, a mistura de transformação é incubada à temperatura ambiente ou em gelo antes da adição de uma solução de sorbitol e CaCl₂. A suspensão de protoplasto então é ainda adicionada a alíquotas fusionadas de um meio de crescimento. Este meio de crescimento permite o crescimento somente de transformantes.

Geralmente, células são cultivadas em um meio padrão conten-

do sais e nutrientes fisiológicos. Ver, por exemplo, Pourquie *et al.*, BIOCHEMISTRY AND GENETICS OF CELLULOSE DEGRADATION, Aubert *et al.*, eds., Academic Press (1988), pp. 71-86; e Ilmen *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1298-1306 (1997). Os meios comuns comercialmente preparados, 5 por exemplo, caldo de Extrato de Malte de Levedura (YM), caldo de *Luria Bertani* (LB), ou caldo de Dextrose Sabouraud (SD), também são adequados.

Condições de cultura padrão são adequadas, por exemplo, culturas são incubadas a aproximadamente 28°C no meio apropriado em culturas 10 ou fermentadores de agitação até um nível desejado de expressão de uma TrAA ou variante da mesma ser alcançado. Condições de cultura preferenciais de um dado fungo filamentoso são conhecidas na técnica e estão disponíveis, por exemplo, na American Type Culture Collection (ATCC) e Fungal Genetics Stock Center (FGSC). Após o crescimento fúngico ter sido 15 estabelecido, as células são expostas a condições eficazes para causar ou permitir a expressão de uma TrAA ou uma variante da mesma.

3.4. Identificação de Atividade de TrAA

Para avaliar a expressão de uma TrAA ou variante da mesma em uma célula hospedeira, ensaios podem medir a proteína expressa, mRNA 20 correspondente ou atividade maltogênica da α-amilase. Por exemplo, ensaios adequados incluem Northern e Southern blotting, RT-PCR (reação de polimerase em cadeia via transcriptase reversa), e hibridização *in situ*, usando uma sonda de hibridização apropriadamente marcada. Ensaios adequados também incluem mensuração de atividade de TrAA em uma amostra, por exemplo, por ensaios que diretamente medem redução de açúcares, tal como glicose nos meios de cultura. Por exemplo, a concentração de glicose pode ser determinada usando conjunto de reagente de glicose Nº 15-UV (Sigma Chemical Co) ou um instrumento, tal como Technicon Autoanalyzer. A atividade de glicoamilase pode ser analisada pelo método do ácido 25 3,5-dinitrossalicílico (DNS). Ver, Goto *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58:49-54 (1994).

Geralmente, a TrAA expressa por um hospedeiro *Trichoderma*

ou *Aspergillus* terá uma concentração no meio de cultura de maior que 1 grama de proteína por litro (g/L), maior do que 2 g/L, maior do que 5 g/L, maior do que 10 g/L, maior do que 20 g/L, ou maior do que 25 g/L. Em uma modalidade, a TrAA ou variante da mesma expressa por um hospedeiro *Trichoderma* ou *Aspergillus* será glicosilada, isto é, a TrAA ou variante da mesma compreenderá uma porção glicosil. Em uma modalidade particularmente adequada, o padrão de glicosilação será o mesmo como presente na TrAA de tipo selvagem.

3.5. Métodos para Purificação de TrAA

Em geral, uma TrAA ou variante da mesma produzida na cultura celular é secretada no meio e pode ser purificada ou isolada, por exemplo, pela remoção de componentes não desejados do meio de cultura celular. Em alguns casos, uma TrAA ou variante da mesma pode ser recuperada de um lisado celular. Em tais casos, a enzima é purificada a partir das células nas quais foi produzida usando técnicas costumeiramente empregadas por aqueles versados na técnica. Exemplos incluem, mas não são limitados a, cromatografia de afinidade, métodos cromatográficos de troca iônica, incluindo troca iônica de alta resolução, cromatografia de interação hidrofóbica, particionamento em duas fases, precipitação em etanol, HPLC em fase reversa, cromatografia em sílica ou em uma resina de troca catiônica, tal como DEAE, cromatofocalização, SDS-PAGE, precipitação em sulfato de amônio e filtração em gel usando Sephadex G-75, por exemplo.

3.6 Fermentação

Em algumas modalidades, células fúngicas expressando uma TrAA ou variante da mesma são cultivadas sob condições de fermentação em batelada ou contínua. Uma fermentação em batelada clássica é um sistema fechado, onde a composição do meio é estabelecida no início da fermentação e não é alterada durante a fermentação. No início da fermentação, o meio é inoculado com o organismo(s) desejado. Neste método, permite-se que a fermentação ocorra sem adição de quaisquer componentes ao sistema. Tipicamente, uma fermentação em batelada prepara-se como uma "batelada" com respeito à adição da fonte de carbono, e tentativas são muitas

vezes feitas para controlar fatores, tais como pH e concentração de oxigênio. As composições de biomassa e metabólitos da modificação do sistema em batelada mudam constantemente até o tempo da fermentação ser parado. Dentro de culturas em batelada, células progredem através de uma fase lag 5 estática a uma fase log de alto crescimento e finalmente a uma fase estacionária, onde a taxa de crescimento é diminuída ou parada. Se não tratadas, as células na fase estacionária consequentemente morrem. Em geral, as células na fase log são responsáveis pelo volume da produção do produto.

Uma variação adequada no sistema em batelada padrão é o sistema de fermentação em "batelada alimentada". Nesta variação de um sistema em batelada típico, o substrato é adicionado em incrementos com os progressos da fermentação. Os sistemas de batelada alimentada são úteis provavelmente quando a repressão do catabólito provavelmente inibe o metabolismo das células e onde é desejável ter quantidades limitadas de substrato no meio. A mensuração da concentração do substrato real em sistemas de batelada alimentada é difícil e por isso é estimada com base nas modificações de fatores mensuráveis, tais como pH, oxigênio dissolvido e pressão parcial de gases residuais, tais como CO₂. Fermentações em batelada e batelada alimentada são comuns e bem-conhecidas na técnica.

Fermentação contínua é um sistema aberto onde um meio de fermentação definido é adicionado continuamente a um biorreator, e uma quantidade igual do meio condicionado é removida simultaneamente para o processamento. Fermentação continua geralmente mantém as culturas em uma alta densidade constante, onde as células estão principalmente na fase de crescimento log. A fermentação contínua leva em conta a modulação de um ou mais fatores que afetam o crescimento celular e/ou concentração do produto. Por exemplo, em uma modalidade, um nutriente limitante, tal como a fonte de carbono ou fonte de nitrogênio, é mantido em uma taxa fixa e permite-se que todos outros parâmetros se moderem. Em outros sistemas, diversos fatores que afetam o crescimento podem ser alterados continuamente enquanto a concentração celular, medida pela turbidez do meio, é mantida constante. Sistemas contínuos esforçam-se para manter condições

de crescimento em estado de equilíbrio. Dessa maneira, a perda celular devida ao meio que é retirado deve ser equilibrada contra a taxa de crescimento celular na fermentação. Métodos de modulação de nutrientes e fatores de crescimento em processos de fermentação contínua, bem como técnicas 5 para maximizar a taxa de formação de produto, são bem-conhecidos na técnica da microbiologia industrial.

4. Composições e Usos de TrAA e Variantes da Mesma

TrAA e suas variantes produzidas e purificadas pelos métodos descritos acima são úteis para uma variedade de aplicações industriais. Em 10 uma modalidade, TrAA e suas variantes são úteis em um processo de conversão de amido, particularmente em um processo de sacarificação de um amido que sofreu a liquefação. O produto final desejado pode ser qualquer produto que possa ser produzido pela conversão enzimática do substrato de amido. Por exemplo, produto desejado pode ser um xarope rico em maltose, 15 que pode ser usado em outros processos, tais como a preparação de HFCS. O produto alternativamente pode ser um xarope rico em glicose, que pode ser usado diretamente como uma fonte de glicose cristalina, por exemplo, ou que pode ser convertido em diversos outros produtos úteis, tais como intermediários de ácido ascórbico (por exemplo, gliconato; ácido 2-ceto-L- 20 gulônico; 5-ceto-gliconato; e 2,5-dicetogliconato); 1,3-propanodiol; aminoácidos aromáticos (por exemplo, tirosina, fenilalanina e triptofano); ácidos orgânicos (por exemplo, lactato, piruvato, succinato, isocitrato e oxaloacetato); aminoácidos (por exemplo, serina e glicina); antibióticos; enzimas; vitaminas; e hormônios.

25 Ainda em outra modalidade, o processo de conversão de amido pode ser um precursor, ou simultâneo com um processo de fermentação desenhado para produzir álcool para combustível ou bebida (isto é, álcool potável). Um versado na técnica está ciente das várias condições de fermentação que podem ser usadas na produção destes produtos finais. TrAA e 30 variantes da mesma também são úteis em composições e métodos de preparação alimentícia. Estes vários usos de TrAA e suas variantes são descritos em mais detalhes abaixo.

4.1 Preparação de Substratos de Amido

Aqueles de conhecimento geral na técnica estão cientes de métodos disponíveis que podem ser usados para preparar substratos de amido para uso nos processos descritos neste pedido. Por exemplo, um substrato de amido útil pode ser obtido a partir de tubérculos, raízes, caules, legumes, cereais ou grão inteiro. Mais especificamente, o amido granular pode ser obtido a partir de milhos, espigas de milho, trigo, cevada, centeio, milo, sagu, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, ervilhas, feijão, banana ou batatas. Milho contém aproximadamente 60 a 68% de amido; cevada contém aproximadamente 55 a 65% de amido; painço contém aproximadamente 75 a 80% de amido; trigo contém aproximadamente 60 a 65% de amido; e arroz polido contém 70 a 72% de amido. Substratos de amido especificamente contemplados são amido de milho e amido de trigo. O amido de um grão pode ser moído ou inteiro e inclui sólidos de milho, tais como sementes, farelo e/ou espigas de milho. O amido pode ser amido bruto altamente refinado ou matéria-prima de processos de refinaria de amido. Vários amidos também estão comercialmente disponíveis. Por exemplo, amido de milho está disponível em Cerestar, Sigma e Katayama Chemical Industry Co. (Japão); amido de trigo está disponível em Sigma; amido de batata-doce está disponível em Wako Pure Chemical Industry Co. (Japão); e amido de batata está disponível em Nakaari Chemical Pharmaceutical Co. (Japão).

O substrato de amido pode ser um amido bruto a partir do grão inteiro moído, que contém frações não-amido, por exemplo, resíduos de germe e fibras. A moagem pode compreender moagem úmida ou moagem seca. Na moagem úmida, o grão inteiro é embebido em água ou ácido diluído para separar o grão em suas partes componentes, por exemplo, amido, proteína, germe, óleo, fibras da semente. A moagem úmida separa eficientemente o germe e a farinha (isto é, grânulos de amido e proteína) e é especialmente adequada para a produção de xaropes. Na moagem seca, as sementes inteiras são quebradas em um pó fino e processadas sem fracionamento do grão nas suas partes componentes. O grão moído a seco dessa forma compreenderá quantidades significantes de compostos de carboidrato

não-amido, além do amido. A maior parte do etanol vem da moagem seca. Alternativamente, o amido a ser processado pode ser uma qualidade de amido altamente refinada, por exemplo, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 99,5% puro.

5 **4.2. Gelatinização e Liquefação de Amido**

Como usado neste pedido, o termo "liquefação" ou "liquefazer" significa um processo pelo qual o amido é convertido em menos dextrinas de cadeia mais curtas e menos viscosas. Geralmente, este processo envolve gelatinização do amido simultaneamente com ou seguido pela adição de 10 uma α -amilase, embora as enzimas adicionais indutoras de liquefação opcionalmente possam ser adicionadas. Em algumas modalidades, o substrato de amido preparado como descrito acima é misturado com água. A pasta fluida de amido pode conter amido com uma porcentagem em peso de sólidos secos de aproximadamente 10 a 55%, aproximadamente 20 a 45%, a- 15 proximadamente 30 a 45%, aproximadamente 30 a 40% ou aproximadamen- te 30 a 35%. α -amilase (EC 3.2.1.1) pode ser adicionada à pasta fluida, com uma bomba de medição, por exemplo. A α -amilase tipicamente usada para esta aplicação é uma α -amilase termicamente estável, bacteriana, tal como uma α -amilase de *B. licheniformis*. A α -amilase é normalmente fornecida, por 20 exemplo, em aproximadamente 1500 unidades por kg de matéria seca de amido. Para otimizar a estabilidade e a atividade da α -amilase, o pH da pasta fluida é ajustado a aproximadamente o pH 5,5 a 6,5 e aproximadamente 1 mM de cálcio (aproximadamente 40 ppm de íons de cálcio livres) tipicamente é adicionado. Outras α -amilases podem requerer condições diferentes. A α -amilase bacteriana que permanece na pasta fluida após liquefação pode ser 25 desativada pela redução do pH em uma etapa de reação subsequente ou pela remoção de cálcio da pasta fluida.

A pasta fluida do amido mais a α -amilase podem ser bombeadas continuamente através de um fogareiro a jato, que é aquecido por vapor a 30 105°C. A gelatinização ocorre muito rapidamente sob estas condições, e a atividade enzimática, combinada com forças significantes de corte, começam a hidrólise do substrato de amido. O tempo de permanência no fogareiro a

jato é muito breve. O amido parcialmente gelatinizado pode ser passado em uma série de tubos de armazenamento mantidos de 100 a 105°C e contido por 5 minutos para concluir o processo de gelatinização. A hidrólise para o DE requerido é concluída em tanques de armazenamento a temperaturas de 5 90 a 100°C ou mais altas por aproximadamente 1 a 2 horas. Estes tanques podem conter instrumentos que regulam o fluxo para prevenir mistura de volta.

Como usado neste pedido, o termo "liquefação secundária" refere-se à etapa de liquefação subsequente à liquefação primária (aquecimento 10 de 90 a 100°C), quando se permite que a pasta fluida esfrie à temperatura ambiente. Esta etapa de esfriamento pode ser de 30 minutos a 180 minutos, por exemplo, 90 minutos a 120 minutos. Como usado neste pedido, o termo "minutos de liquefação secundária" refere-se ao tempo decorrido a partir do 15 início da liquefação secundária ao tempo que a Dextrose Equivalente (DE) é medida.

O amido liquefeito resultante do processo acima tipicamente contém aproximadamente 98% de oligossacarídeos e aproximadamente 2% de maltose e 0,3% de D-glicose. O amido liquefeito tipicamente está na forma de uma pasta fluida tendo aproximadamente 10 a 50% de sólidos secos; 20 aproximadamente 10 a 45%; aproximadamente 15 a 40%; aproximadamente 20 a 40%; aproximadamente 25 a 40%; ou aproximadamente 25 a 35% de sólidos secos.

4.3. Sacarificação: Criação de Xaropes de Maltose ou Glicose

O amido liquefeito pode ser sacarificado em um xarope de glicose ou em um xarope de maltose usando a TrAA e variantes da mesma, opcionalmente na presença de outra enzima(s). A composição exata dos produtos da sacarificação depende da combinação de enzimas usadas, bem como o tipo do amido granular processado. Vantajosamente, o xarope de glicose obtinível usando a TrAA e variantes da mesma fornecidas pode conter D-glicose em aproximadamente 96% p/p. A quantidade máxima de glicose que atualmente pode ser obtida sob qualquer conjunto de condições de sacarificação é aproximadamente 95 a 97%. O xarope de glicose pode ser

usado diretamente após concentração para a produção de xaropes de alta frutose ou para a produção de glicose cristalina. Igualmente vantajosamente, o xarope de maltose obtinível usando TrAA e variantes da mesma fornecidas pode conter maltose excedendo 60% p/p.

5 Em geral, TrAA ou uma variante da mesma será adicionada a uma pasta fluida de um substrato de amido granular em uma quantidade da enzima de aproximadamente 0,01 a 1 kg de enzima por tonelada métrica de sólidos secos. Em algumas modalidades, TrAA ou uma variante da mesma é adicionada a 0,1 a 5 kg/mt de sólidos secos, ou 0,3 a 1 kg/mt de sólidos secos, ou a aproximadamente 0,5 kg/mt de sólidos secos. A atividade específica da TrAA ou variante da mesma pode ser aproximadamente 10.000 a 10

10 80.000 SKBU/g de enzima, ou aproximadamente 15.000 a 60.000 SKBU/g, ou aproximadamente 15.000 a 30.000 SKBU/g.

A TrAA ou uma variante da mesma pode ser adicionada à pasta fluida na forma de uma enzima purificada. Alternativamente, TrAA ou uma variante da mesma pode ser adicionada como uma solução enzimática isolada. Em uma modalidade, TrAA ou uma variante da mesma é adicionada na forma de um extrato celular produzido a partir de uma cultura de células expressando a TrAA ou variante da mesma. Em outra modalidade, TrAA ou 20 uma variante é adicionada na forma de uma célula hospedeira que expressa e secreta a TrAA ou variante no meio de reação, tal que a enzima é fornecida continuamente na reação. Nesta modalidade, a célula hospedeira que expressa TrAA ou uma variante da mesma também pode expressar outra enzima que é usada para catalisar a sacarificação além da TrAA ou sua variante. Por exemplo, uma célula hospedeira, por exemplo, *Trichoderma reesei* ou *Aspergillus niger*, pode ser projetada para co-expressar TrAA ou uma variante da mesma e uma glicoamilase, por exemplo, TrGA ou HgGA. Em 25 uma modalidade, a célula hospedeira é geneticamente modificada para não expressar sua glicoamilase endógena.

30 4.3.1. Xaropes de glicose

Em um aspecto, TrAA e suas variantes são usadas em um processo de sacarificação para produzir um xarope rico em glicose. Para produ-

zir um xarope de glicose, TrAA ou variantes da mesma tipicamente são adicionadas com uma glicoamilase (EC 3.2.1.3), por exemplo, glicoamilase AMG™. Como mostrado na TABELA 1, Figura 1 e discutido nos exemplos abaixo, o processo de sacarificação catalisado pela TrAA ou uma variante da 5 mesma na presença de uma glicoamilase pode produzir concentrações de glicose perto ou excedendo 97%. Vantajosamente, uma concentração máxima de glicose pode ser alcançada em menos tempo que se a reação fosse catalisada por uma glicoamilase sozinha. Em uma modalidade, as concentrações máximas de glicose são alcançadas em 12 horas, 24 horas ou 36 10 horas. Ver a TABELA 2 e o texto associado nos exemplos. Particularmente vantajosamente, TrAA e suas variantes suprimem a reação reversa da glicose a malto-oligossacarídeos, para que a concentração máxima de glicose seja mantida por de um tempo mais longo do que em um processo de sacarificação convencional. Ver TABELA 2. Em algumas modalidades, a concentração máxima de glicose é mantida por aproximadamente 12 horas ou 15 15 aproximadamente 24 horas após a concentração máxima ser alcançada.

Uma glicoamilase exemplar é glicoamilase de *Trichoderma reesei* (TrGA) e variantes da mesma que possui atividade específica e estabilidade térmica superiores. Ver Pedido de Patente Americana Publicados Nos. 20 2006/0094080, 2007/0004018, e 2007/0015266 (Genencor International, Inc.). Variantes adequadas de TrGA incluem aquelas com atividade de glicoamilase e identidade de sequência de pelo 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% da TrGA de tipo selvagem. TrAA e suas variantes vantajosamente aumentam o rendimento de glicose produzida em um processo de sacarificação catalisado por TrGA. Sem a adição da TrAA ou suas variantes, 25 TrGA tipicamente produz uma solução de glicose de aproximadamente 88% em pH 4,3; entretanto, quando TrAA ou suas variantes são adicionadas à reação, a mistura de TrAA e TrGA produz uma solução com uma concentração de glicose significativamente mais alta, por exemplo 94%.

30 Alternativamente, a glicoamilase pode ser outra glicoamilase derivada de plantas, fungos ou bactérias. Por exemplo, as glicoamilases podem ser glicoamilase G1 ou G2 de *Aspergillus niger* ou suas variantes (por

exemplo, Boel *et al.*, EMBO J. 3: 1097-1102(1984), WO 92/00381 e WO 00/04136 (Novo Nordisk A/S)); e glicoamilase de *A. awamori* (por exemplo, WO 84/02921 (Cetus Corp.)). Outra glicoamilase de *Aspergillus* contemplada inclui variantes com estabilidade térmica aumentada, por exemplo, G137A e 5 G139A (Chen *et al.*, *Prot. Eng.* 9: 499-505(1996)); D257E e D293E/Q (Chen *et al.*, *Prot. Eng.* 8: 575-582(1995)); N182 (Chen *et al.*, *Biochem. J.* 301: 275-281(1994)); A246C (Fierobe *et al.*, *Biochemistry*, 35: 8698-8704(1996)); e variantes com resíduos Pro nas posições A435 e S436 (Li *et al.*, *Protein Eng.* 10: 1199-1204(1997)). Outras glicoamilases contempladas incluem glicoamilases de *Talaromyces*, em particular derivadas de *T. emersonii* (por exemplo, WO 99/28448 (Novo Nordisk A/S), *T. leycettanus* (por exemplo, Patente Americana Nº RE 32.153 (CPC International, Inc.)), *T. duponti* ou *T. thermophilus* (por exemplo, Patente Americana Nº 4.587.215). Glicoamilases bacterianas contempladas incluem glicoamilases do gênero *Clostridium*, em particular *C. thermoamylolyticum* (por exemplo, EP 135.138 (CPC International, Inc.) e *C. thermohydrosulfuricum* (por exemplo, WO 86/01831 (Michigan Biotechnology Institute)). Glicoamilases adequadas incluem as glicoamilases derivadas de *Aspergillus oryzae*, tais como uma glicoamilase que tem homologia de 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% ou até de 90% à sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2 em WO 00/04136 (Novo Nordisk A/S). Também são adequadas glicoamilases comerciais, tais como AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER e AMG™E (de Novozymes); OPTIDEX® 300 (de Genencor International, Inc.); AMIGASE™ e AMIGASE™ PLUS(de DSM); G-ZYME® G900 (de Enzyme Bio-Systems); e G-ZYME® 25 G990 ZR (glicoamilase de *A. niger* com um baixo conteúdo de protease). Glicoamilases tipicamente são adicionadas em uma quantidade de 0,02 a 2,0 GAU/g de sólido seco ou 0,1 a 1,0 GAU/g de sólido seco, por exemplo, 0,2 GAU/g de sólido seco.

Outras enzimas adequadas que podem ser usadas com TrAA ou suas variantes incluem uma enzima de desramificação, tal como uma isoenzima (EC 3.2.1.68). Enzimas de desramificação podem ser adicionadas em quantidades eficazes bem-conhecidas ao versado na técnica. Uma pulula-

nase (EC 3.2.1.41), por exemplo, Promozyme®, é também adequada. Pulu-lanase é tipicamente adicionada a 100 U/kg de sólido seco. Enzimas adicionais adequadas incluem proteases, tais como proteases fúngicas e bacterianas. Proteases fúngicas incluem aquelas obtidas a partir de *Aspergillus*, tais como *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*; *Mucor* (por exemplo, *M. miehei*); e *Rhizopus*. Outras enzimas adequadas incluem, mas não são limitadas a, celulases, hemicelulases, lipases e cutinases.

Ao passo que a liquefação é geralmente dirigida como um processo contínuo, a sacarificação muitas vezes é conduzida como um processo em batelada. Sacarificação tipicamente é a mais eficaz em temperaturas de aproximadamente 60°C e a um pH de aproximadamente 4,0 a 4,5, por exemplo, pH 4,3, exigindo esfriamento e ajuste do pH do amido liquefeito. A sacarificação pode ser realizada, por exemplo, a uma temperatura entre aproximadamente 40°C, aproximadamente 50°C, ou aproximadamente 55°C a aproximadamente 60°C. Sacarificação é normalmente conduzida em tanques agitados, que podem levar várias horas para encher-se ou esvaziá-los. Enzimas tipicamente são adicionadas em uma proporção fixa a sólidos secos quando os tanques são enchidos ou adicionados como uma dose única no começo da etapa de enchimento. Uma reação de sacarificação para fazer um xarope de glicose tipicamente é realizada em aproximadamente 24 a 72 horas, ou 24 a 28 horas, ou particularmente 24 ou menos horas, por exemplo, 20 a 21 horas. Quando um DE máximo foi alcançado, a reação é parada pelo aquecimento a 85°C por 5 minutos, por exemplo. Incubação adicional resultará em um DE mais baixo, eventualmente a aproximadamente 90 DE, já que a glicose acumulada repolimeriza à isomaltose com a aproximação do equilíbrio termodinâmico. O rendimento final de glicose, como uma porcentagem do total de sólidos secos solubilizados, pode ser pelo menos aproximadamente 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% ou 98%. Em uma modalidade, a glicose é produzida em um processo contínuo, e substancialmente toda glicose é usada para produzir um produto de fermentação, tal como etanol.

4.3.2. Xaropes de maltose

Em outro aspecto, TrAA ou uma variante da mesma é usada em

um processo para produzir um xarope de alta maltose. Entre as vantagens oferecidas pela TrAA e suas variantes está a capacidade de usar a TrAA e suas variantes em pHs relativamente baixos. Uma dependência de pH da TrAA representativa para produção da maltose (DP2) é representada na Figura 2. Como a sacarificação tipicamente se realiza sob condições acidíferas em temperaturas elevadas, por exemplo, 60°C, pH 4,3, a alta atividade da TrAA ou suas variantes sob estas condições vantajosamente permite a TrAA ou suas variantes serem usadas sob condições que são ótimas para outras enzimas, por exemplo, glicoamilases, usadas na sacarificação.

Xaropes de alta maltose produzidos com uma TrAA ou suas variantes têm propriedades vantajosas. A concentração de maltose alcançada usando TrAA ou suas variantes é comparável ou mais alta do que aquela alcançada com enzimas maltogênicas convencionais, tais como BBA ou a α -amilase fúngica Clarase® L. Ver as TABELAS 3 e 4 e a Figura 2. Em uma modalidade, a concentração de maltose atinge uma porcentagem de sólidos secos de aproximadamente 50% a aproximadamente 62%. Em outra modalidade, a concentração de maltose atinge aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, ou aproximadamente 61% a aproximadamente 62%. Além disso, o xarope de alta maltose obtido usando TrAA pode conter glicose em uma concentração de aproximadamente 8 a 9%, ao passo que um xarope de alta maltose convencional produzido sob condições comparáveis, por exemplo, usando Clarase® L, tipicamente tem uma concentração de glicose de aproximadamente 4 a 5%. Ver TABELA 3. O rendimento relativamente alto de glicose vantajosamente permite ao xarope de alta maltose feito usando TrAA ou suas variantes ser mais doce do que xaropes de alta maltose produzidos usando enzimas convencionais.

TrAA ou uma variante da mesma podem catalisar a produção de um xarope de alta maltose por si mesmas na presença de pelo menos uma outra enzima. Uma enzima particularmente adequada para uso com TrAA ou uma variante da mesma é pululanase. A adição de uma pululanase aumenta significativamente o rendimento da maltose, como mostrado na TABELA 5 e na Figura 3. A quantidade de pululanase adicionada pode ser aproximada-

mente 0,1 kg/mt de sólido seco, aproximadamente 0,25 kg/mt de sólido seco, ou aproximadamente 0,5 kg/mt de sólido seco. Em uma modalidade, a quantidade de pululanase adicionada para fornecer um aumento máximo na maltose produzida na reação. Os dados na TABELA 5 indicam que o efeito 5 da pululanase na formação de maltose é ainda maior quando a concentração da pululanase é aproximadamente 0,25 kg/mt de sólido seco sob as condições particulares usadas para produzir maltose observadas no texto que acompanha a TABELA 5 nos exemplos abaixo.

Outras enzimas adequadas para uso com TrAA ou variantes das 10 mesmas incluem β -amilases bacterianas, por exemplo, BBA, outras α -amilases fúngicas, por exemplo, Clarase® L. ou glicoamilase. Enzimas adicionais adequadas incluem proteases, tais como proteases fúngicas e bacterianas. Proteases fúngicas incluem aquelas obtidas a partir de *Aspergillus*, tais como *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*; *Mucor*, por exemplo, *M. miehei*; e 15 *Rhizopus*. Outras enzimas adequadas incluem, mas não são limitadas a, celulases, hemicelulases, lipases, isoamilases e cutinases.

β -amilases (EC 3.2.1.2) são amilases maltogênicas de exo-atuação, que catalisam a hidrólise de ligações 1,4- α -glicosídicas em amilopectina e polímeros de glicose relacionados, por meio disso, liberando maltose. β -amilases foram isoladas de várias plantas e micro-organismos. Ver 20 Fogarty *et al.*, em PROGRESS IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, Vol. 15, PP. 112-115 (1979). Estas β -amilases têm temperaturas ótimas na faixa de 40°C a 65°C e pH ótimo na faixa de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,0. β -amilases contempladas incluem, mas não são limitadas a, β -amilases de cevada Spezyme® BBA 1500, Spezyme® DBA, Optimalt™ ME, 25 Optimalt™ BBA (Genencor International, Inc.); e Novozym™ WBA (Novozymes A/S).

5. Produção e fermentação de HFCS

Em uma modalidade, o hidrolisado de amido solúvel produzido 30 pelo tratamento com TrAA, variantes da mesma, ou misturas de enzimas compreendendo TrAA ou suas variantes, é convertido em xarope de alta frutose baseado em amido (HFSS), tal como xarope de milho de alta fruto-

se(HFCS). Esta conversão pode ser alcançada usando uma glicose isomerase, particularmente uma glicose isomerase imobilizada em um suporte sólido. O pH é aumentado para aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0, por exemplo, pH 7,5, e Ca^{2+} é removido por troca iônica. Isomerases adequadas incluem Sweetzyme®, IT(Novozymes A/S); G-zyme® IMGI, e G-zyme® G993, Ketomax®, G-zyme® G993, G-zyme® G993 líquido, e GenSweet® IGI. Após isomerização, a mistura tipicamente contém aproximadamente 40 a 45% de frutose, por exemplo, 42% de frutose.

Em outra modalidade, o hidrolisado de amido solúvel, particularmente um xarope rico em glicose, é fermentado pelo contato do hidrolisado com um organismo fermentador tipicamente a uma temperatura por volta de 32°C, tal como de 30°C a 35°C. Os produtos de fermentação incluem etanol, ácido cítrico, glutamato monossódico, ácido glucônico, gliconato de sódio, gliconato de cálcio, gliconato de potássio, glicono delta-lactona, e sódio eritorbato. Os processos de sacarificação e de fermentação podem ser realizados como um processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). Fermentação opcionalmente pode compreender a purificação subsequente e recuperação de etanol. Durante a fermentação, o conteúdo de etanol do caldo ou "cerveja" pode alcançar pelo menos aproximadamente 8%, pelo menos aproximadamente 12%, ou aproximadamente 16% de etanol. O caldo pode ser destilado para produzir soluções de etanol enriquecidas, por exemplo, 96% puras. Além disso, CO₂ gerado pela fermentação pode ser coletado com um depurador de CO₂, comprimido e vendido para outros usos, por exemplo, produção de bebida gaseificada ou gelo seco. Os resíduos sólidos do processo de fermentação podem ser usados como produtos ricos em proteína, por exemplo, ração de gado.

Micro-organismos etanogênicos incluem levedura, tal como *Saccharomyces cerevisiae* e bactérias, por exemplo, *Zymomonas mobilis*, expressando álcool desidrogenase e piruvato decarboxilase. Em algumas modalidades, o micro-organismo etanogênico expressa xilose redutase e xilitol desidrogenase, enzimas que convertem xilose em xilulose. Fontes comerciais de levedura incluem RED STAR (Red Star); FERMIOL® (DSM

Specialties) e SUPERSTART® (Alltech).

Em uma modalidade, células fúngicas expressando uma glicoamilase heteróloga e/ou TrAA ou suas variantes são cultivadas sob condições de fermentação em batelada ou contínuas. Uma fermentação em batelada clássica é um sistema fechado, onde a composição do meio é estabelecida no início da fermentação. Isto é, permite-se que a fermentação ocorra sem a adição de qualquer componente ao sistema. Dentro de culturas em batelada, células progridem através de uma fase lag estática a uma fase log de alto crescimento e finalmente a uma fase estacionária onde a taxa de crescimento é diminuída ou parada. Geralmente, as células na fase log são responsáveis pelo volume da produção heteróloga de glicoamilase e/ou TrAA ou suas variantes.

Uma variação neste processo é uma sistema de "fermentação de alimentacão em batelada", onde o substrato é adicionado em incrementos com os progressos da fermentação. Os sistemas de alimentacão em batelada são úteis quando a repressão de catabólito pode inibir o metabolismo das células e onde é desejável ter limitadas quantidades de substrato no meio. A concentração real de substrato em sistemas de alimentacão em batelada é estimada pelas modificações de fatores mensuráveis, tais como pH, oxigênio dissolvido e a pressão parcial de gases residuais, tais como CO₂. Fermentações em batelada e de alimentacão em batelada são comuns e bem-conhecidas na técnica.

Fermentação contínua é um sistema aberto onde um meio de fermentação definido é adicionado continuamente a um biorreator, e uma quantidade igual do meio condicionado é removida simultaneamente para o processamento. Fermentação contínua geralmente mantém as culturas em uma alta densidade constante, onde as células estão principalmente na fase de crescimento log. A fermentação contínua leva em conta a modulação de um ou mais fatores que afetam o crescimento celular e/ou concentração do produto. Por exemplo, em uma modalidade, um nutriente limitante, tal como a fonte de carbono ou fonte de nitrogênio, é mantido em uma taxa fixa e permite-se que todos outros parâmetros se moderem. Como o crescimento é

mantido em um estado de equilíbrio, a perda celular devida ao meio que é retirado deve ser equilibrada contra a taxa de crescimento celular na fermentação. Métodos de otimização de processos de fermentação contínua e maximização da taxa da formação de produto são bem-conhecidos na técnica de microbiologia industrial.

6. Composições e Métodos para Cozimento e Preparação de Alimento

Para o uso comercial e doméstico de farinha para cozimento e produção de alimento, é importante manter um nível apropriado de atividade de α -amilase na farinha. Um nível de atividade que seja muito alto pode resultar em um produto que é pegajoso e/ou pastoso e por isso não comerciável. Farinha com atividade de α -amilase insuficiente pode não conter açúcar suficiente para função apropriada da levedura, resultando em pão seco, esfarelado ou produtos endurecidos pelo calor. Consequentemente, uma TrAA ou variante da mesma, por si mesmas ou em combinação com outra α -amilase(s), podem ser adicionadas à farinha para aumentar o nível de atividade de α -amilase endógena na farinha. A TrAA ou variante da mesma nessa modalidade podem ter uma temperatura ótima na presença de amido nas faixas de 30 a 90°C, 40 a 80°C, 40 a 50°C, 45 a 65°C, ou 50 a 60°C, por exemplo. O pH ótimo em uma solução de 1% de amido solúvel pode estar entre o pH 4,5 a 6, por exemplo.

Grãos, tais como cevada, aveia, trigo, bem como componentes vegetais, tais como milho, lúpulo e arroz, também são usados para fermentação, tanto na indústria como para fermentação doméstica. Os componentes usados na fermentação podem ser não maltados ou podem ser maltados, isto é, parcialmente germinados, resultando em um aumento nos níveis de enzimas, incluindo a α -amilase. Para fermentação bem sucedida, níveis adequados da atividade de enzima α -amilase são necessários para assegurar os níveis apropriados de açúcares para fermentação. Uma TrAA ou variante da mesma, por si mesmas ou em combinação com outra α -amilase(s), consequentemente podem ser adicionadas aos componentes usados para fermentação.

Como usado neste pedido, o termo "farinha" significa grãos de

cereal moídos ou triturados. O termo "farinha" também pode significar produtos de Sagu ou tubérculo que foram triturados ou amassados. Em algumas modalidades, a farinha também pode conter componentes além de cereal ou matéria vegetal moída ou amassada. Um exemplo de um componente adicional, embora não destinado a ser limitante, é um agente fermentador. Grãos de cereal incluem trigo, aveia, centeio e cevada. Produtos de tubérculo incluem farinha de tapioca, farinha de mandioca e pó para pudim. O termo "farinha" também inclui a farinha de milho triturado, farinha de milho, farinha de arroz, farinha de trigo integral, farinha com fermento, farinha de tapioca, farinha de mandioca, arroz triturado, farinha enriquecida e pó para pudim.

Como usado neste pedido, o termo "estoque" significa grãos e componentes vegetais que são esmagados ou triturados. Por exemplo, a cevada usada na produção de cerveja é um grão que foi grosseiramente triturado ou esmagado para produzir uma consistência apropriada para produção de uma massa para fermentação. Como usado neste pedido, o termo "estoque" inclui qualquer um dos tipos acima mencionados de plantas e grãos nas formas esmagadas ou grosseiramente trituradas. Os métodos descritos neste pedido podem ser usados para determinar níveis de atividade de α -amilase em ambos, farinhas e estoque.

Uma TrAA ou variante da mesma pode ser ainda adicionada sozinha ou em uma combinação com outras amilases para prevenir ou retardar o envelhecimento, isto é, a solidificação do miolo de produtos cozidos no forno. A quantidade da amilase anti-envelhecimento estará tipicamente na faixa de 0,01 a 10 mg de proteína enzima por kg de farinha, por exemplo, 0,5 mg/kg de sólido seco. Amilases anti-envelhecimento adicionais que podem ser usadas em combinação com uma TrAA ou variante da mesma incluem uma endoamilase, por exemplo, uma endoamilase bacteriana de *Bacillus*. Amilase adicional pode ser outra α -amilase maltogênica (EC 3.2.1.133), por exemplo, de *Bacillus*. Novamyl® é uma α -amilase maltogênica exemplar da cepa de *B. stearothermophilus* NCIB 11837 e é descrito em Christophersen et al., *Starch* 50:39-45 (1997). Outros exemplos de endoamilases anti-envelhecimento incluem α -amilases bacterianas derivadas de *Bacillus*, tais como

B. licheniformis ou *B. amyloliquefaciens*. A amilase antienvelhecimento pode ser uma exoamilase, tal como β -amilase, por exemplo, de fontes vegetais, tais como soja, ou de fontes microbianas, tais como *Bacillus*.

A composição de cozimento compreendendo uma TrAA ou variante da mesma pode ainda compreender uma fosfolipase. A fosfolipase pode ter atividade A_1 ou A_2 para remover ácido graxo dos fosfolipídeos, formando um lisofosfolipídeo. Pode ou não ter atividade lipase, isto é, atividade sobre substratos triglycerídicos. A fosfolipase tipicamente tem uma temperatura ótima na faixa de 30 a 90°C, por exemplo, 30 a 70°C. As fosfolipases adicionadas podem ser de origem animal, por exemplo, do pâncreas, por exemplo, pâncreas bovino ou porcino, veneno de cobra ou veneno de abelha. Alternativamente, a fosfolipase pode ser de origem microbiana, por exemplo, de fungos filamentosos, levedura ou bactérias, tais como gêneros ou espécies *Aspergillus*, *A. niger*, *Dictyostelium*, *D. discoideum*; *Mucor*, *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, *N. crassa*; *Rhizomucor*, *R. pusillus*; *Rhizopus*, *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*; *Sclerotinia*, *S. libertiana*; *Trichophyton*, *T. rubrum*; *Whetzelinia*, *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*; *Citrobacter*, *C. freundii*; *Enterobacter*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*; *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Etwinia*, *E. herbicola*; *Escherichia*, *E. coli*; *Klebsiella*, *K. pneumoniae*; *Proteus*, *P. vulgaris*; *Providencia*, *P. stuartii*; *Salmonella*, *S. typhimurium*; *Serratia*, *S. liquefasciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, *S. flexneri*; *Streptomyces*, *S. violeceoruber*; *Yersinia*, *Y. enterocolitica*; *Fusarium*, *F. oxysporum*, cepa DSM 2672), por exemplo.

A fosfolipase é adicionada em uma quantidade que melhora a maciez do pão durante o período inicial após cozimento, particularmente nas primeiras 24 horas. A quantidade de fosfolipase estará tipicamente na faixa de 0,01 a 10 mg de proteína enzima por kg de farinha, por exemplo, 0,1 a 5 mg/kg. Isto é, a atividade de fosfolipase geralmente estará na faixa de 20 a 1000 Unidades de Lipase (LU)/kg de farinha, onde uma Unidade de Lipase é definida como a quantidade da enzima necessária para liberar 1 μ mol de ácido butírico por minuto a 30°C, pH 7,0, com goma arábica como emulsificador e tributirina como substrato.

- Composições da massa de farinha geralmente compreendem farelo de trigo ou farinha de trigo e/ou outros tipos de farelo, farinha ou amido, tais como farinha de milho, amido de milho, farelo de centeio, farinha de centeio, farinha de aveia, farelo de aveia, farinha de soja, farelo de sorgo, 5 farinha de sorgo, farelo de batatas, farinha de batatas ou amido de batatas. A massa de farinha pode ser fresca, congelada ou semicozida. A massa de farinha pode ser uma massa de farinha fermentada ou uma massa de farinha a ser submetida à fermentação. A massa de farinha pode ser fermentada de vários modos, tais como pela adição de agentes químicos fermentadores, por exemplo, bicarbonato de sódio ou adição de um fermento, isto é, fermentação da massa de farinha. A massa de farinha também pode ser fermentada pela adição de uma cultura de levedura adequada, tal como uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de padeiro), por exemplo, uma cepa comercialmente disponível de *S. cerevisiae*.
- 15 A massa de farinha também pode compreender outros ingredientes de massa de farinha convencionais, por exemplo, proteínas, tais como leite em pó, glúten e soja; ovos (por exemplo, ovos inteiros, gemas de ovos ou claras de ovos); um oxidante, tal como ácido ascórbico, bromato de potássio, iodato de potássio, azodicarbonamida (ADA) ou persulfato de amônio; um aminoácido, tal como L-cisteína; um açúcar; ou um sal, tal como cloreto de sódio, acetato de cálcio, sulfato de sódio ou sulfato de cálcio. A massa de farinha pode ainda compreender gordura, por exemplo, triglicerídeo, tal como gordura granulada ou vegetal. A massa de farinha pode ainda compreender um emulsificador tal como mono- ou diglicerídeos, ésteres de ácido 20 diacetil tartárico de mono- ou diglicerídeos, ésteres de açúcar de ácidos graxos, ésteres de poliglycerol de ácidos graxos, ésteres de ácido lático de monoglycerídeos, ésteres de ácido acético de monoglycerídeos, estearatos de polioxietileno ou lisolecitina. Em particular, a massa de farinha pode ser feita sem adição de emulsificadores.
- 25 Opcionalmente, uma enzima adicional pode ser usada em conjunto com a amilase antienvelhecimento e a fosfolipase. A enzima adicional pode ser uma segunda amilase, tal como uma amiloglicosidase, uma α-

amilase, uma ciclodextrina glicanotransferase, ou a enzima adicional pode ser uma peptidase, em particular, uma exopeptidase, uma transglutaminase, uma lipase, uma celulase, uma hemicelulase, em particular, um pentosanase, tal como xilanase, uma protease, uma dissulfeto proteína isomerase, por exemplo, uma dissulfeto proteína isomerase como descrita em WO 95/00636, por exemplo, uma glicosiltransferase, uma enzima de ramificação (enzima de ramificação 1,4- α -glicana), uma 4- α -glicanotransferase (dextrina glicosiltransferase) ou uma oxidoredutase, por exemplo, uma peroxidase, uma lacase, uma glicose oxidase, um piranose oxidase, um lipo-oxigenase, uma L-aminoácido oxidase ou uma carboidrato oxidase. A enzima(s) adicional pode ser de qualquer origem, incluindo mamífera e vegetal, e particularmente de origem microbiana (bacteriana, de levedura ou fúngica) e pode ser obtida por técnicas convencionalmente usadas na técnica.

A xilanase é tipicamente de origem microbiana, por exemplo, derivada de uma bactéria ou fungo, tal como uma cepa de *Aspergillus*, em particular de *A. aculeatus*, *A. niger* (cf. WO 91/19782), *A. awamori* (por exemplo, WO 91/18977), ou *A. tubingensis* (por exemplo, WO 92/01793); de uma cepa de *Trichoderma*, por exemplo, *T. reesei*, ou de uma cepa de *Humicola*, por exemplo, *H. insolens* (por exemplo, WO 92/17573). Pentopan® e Novozym 384® são preparações de xilanase comercialmente disponíveis produzidas a partir de *Trichoderma reesei*. A amiloglicosidase pode ser uma amiloglicosidase de *A. niger* (tal como AMG®). Outros produtos de amilase úteis incluem Grindamyl® A 1000 ou A 5000 (disponível em Grindsted Products, Dinamarca) e Amylase® H ou Amylase® P (disponíveis em Gist-Brocades, Holanda). A glicose oxidase pode ser uma glicose oxidase fúngica, em particular, uma glicose oxidase de *Aspergillus niger* (tal como Gluzyme®). Uma protease exemplar é Neutraser®. Uma lipase exemplar pode ser derivada de cepas de *Thermomyces* (*Humicola*), *Rhizomucor*, *Candida*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, ou *Pseudomonas*, em particular, de *Thermomyces lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*), *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* ou *Rhizopus arrhizus*, ou *Pseudomonas cepacia*. Em modalidades específicas, a lipase pode ser Lipase A ou Lipase

B derivadas de *Candida antarctica* como descrito em WO 88/02775, por exemplo, ou a lipase pode ser derivada de *Rhizomucor miehei* como descrito em EP 238.023, por exemplo, ou *Humicola lanuginosa*, descrita em EP 305.216, por exemplo, ou *Pseudomonas cepacia* como descrito em EP 5 214.761 e WO 89/01032, por exemplo.

O processo pode ser usado para qualquer espécie de produto cozido preparado a partir de massa de farinha, de um caráter macio ou crocante, de um tipo branco, leve ou escuro. Exemplos são pão, particularmente branco, pão integral ou de centeio, tipicamente na forma de pães de forma 10 ou pãezinhos, tais como, mas não limitados a, pão tipo baguete francesa, pão árabe, tortilhas, bolos, panquecas, biscoitos, bolachas, torta coberta, pão crocante, pão cozido no vapor, pizza e similares.

Em outra modalidade, uma TrAA ou variante da mesma pode ser usada em uma mistura para bolo, compreendendo farinha em conjunto com 15 uma amilase antienvelhecimento, uma fosfolipase e um fosfolipídeo. A mistura para bolo pode conter outros aditivos de melhoramento da massa de farinha e/ou de melhoramento do pão, por exemplo, qualquer um dos aditivos, incluindo enzimas, mencionadas acima. Em um aspecto, a TrAA ou variante da mesma é um componente de uma preparação enzimática compreendendo 20 uma amilase antienvelhecimento e uma fosfolipase, para uso como um aditivo de cozimento.

A preparação enzimática está opcionalmente na forma de pó granular ou aglomerado. A preparação pode ter uma distribuição de tamanho de partícula estreita com mais de 95% (por peso) das partículas na faixa de 25 25 a 500 µm. Pós granulares e aglomerados podem ser preparados por métodos convencionais, por exemplo, pela pulverização de TrAA ou variante da mesma em um veículo em um granulador de leito fluido. O veículo pode consistir de núcleos particulados que têm um tamanho de partícula adequado. O veículo pode ser solúvel ou insolúvel, por exemplo, um sal (tal como NaCl ou sulfato de sódio), um açúcar (tal como sacarose ou lactose), um álcool de açúcar (tal como sorbitol), amido, arroz, farinha grossa de milho ou soja.

Outro aspecto contempla o envelopamento de partículas compreendendo uma TrAA ou variante da mesma, isto é, partículas de α-amilase. Para preparar as partículas de α-amilase envelopadas, a enzima é contatada com um lipídio de classificação alimentícia em quantidade suficiente para suspender todas as partículas de α-amilase. Lipídios de classificação alimentícia, como usados neste pedido, podem ser qualquer composto orgânico natural que seja insolúvel em água mas seja solúvel em solventes orgânicos não-polares, tais como hidrocarboneto ou dietil éter. Lipídios de classificação alimentícia adequados incluem, mas não são limitados a, triglycerídeos na forma de gorduras ou óleos que são saturados ou insaturados.

Exemplos de ácidos graxos e combinações dos mesmos que compõem os triglycerídeos saturados incluem, mas não são limitados a, butírico (derivado da gordura do leite), palmítico (derivado de gordura animal e vegetal) e/ou esteárico (derivado de gordura animal e vegetal). Exemplos de ácidos graxos e combinações dos mesmos que compõem os triglycerídeos insaturados incluem, mas não são limitados a, palmitoleico (derivado de gordura animal e vegetal), oleico (derivado de gordura animal e vegetal), linoleico (derivado de óleos vegetais) e/ou linolênico (derivado do óleo de semente de linho). Outros lipídios de classificação alimentícia adequados incluem, mas não são limitados a, monoglicerídeos e diglicerídeos derivados dos triglycerídeos discutidos acima, fosfolipídeos e glicolipídeos.

O lipídio de classificação alimentícia, particularmente na forma líquida, é contatado com uma forma em pó das partículas de α-amilase de tal maneira que o material lipídico cobre pelo menos uma porção da superfície de pelo menos uma maioria, por exemplo, 100% das partículas de α-amilase. Dessa maneira, cada partícula de α-amilase é individualmente envelopada em um lipídio. Por exemplo, todas ou substancialmente todas as partículas de α-amilase são fornecidas de um filme de envelopamento fino, contínuo de lipídio. Isto pode ser realizado pela mistura inicial de uma quantidade de lipídio em um recipiente, e então misturando as partículas de α-amilase para que o lipídio completamente umidifique a superfície de cada partícula de α-amilase. Após um período curto da agitação, as partículas de

α-amilase envelopadas, transportando uma quantidade substancial dos lipídios nas suas superfícies, são recuperadas. A espessura do revestimento como aplicado às partículas de α-amilase pode ser controlada pela seleção do tipo de lipídio usado e pela repetição da operação a fim de construir um filme mais espesso, quando desejado.

O armazenamento, manejo e incorporação do veículo de entrega carregado podem ser realizados por meio de uma mistura empacotada. A mistura empacotada pode compreender a α-amilase envelopada. Entretanto, a mistura empacotada pode conter ainda ingredientes adicionais quando requeridos pelo fabricante ou padeiro. Após a α-amilase envelopada ter sido incorporada na massa de farinha, o padeiro prossegue através do processo de produção normal para aquele produto.

As vantagens de envelopar as partículas de α-amilase são duplas. Em primeiro lugar, o lipídio de classificação alimentícia protege a enzima da desnaturação térmica durante o processo de cozimento daquelas enzimas que são lábeis ao calor. Consequentemente, enquanto a α-amilase é estabilizada e protegida durante os estágios de prova e cozimento, é liberada a partir do revestimento protetor no produto final assado, onde hidrolisa as ligações glicosídicas em poliglicanos. O veículo de entrega carregado também fornece uma liberação sustentada da enzima ativa no assado. Isto é, após o processo de cozimento, a α-amilase ativa é continuamente liberada do revestimento protetor em uma taxa que neutraliza, e por isso reduz a taxa de mecanismos de envelhecimento.

Em geral, a quantidade do lipídio aplicado às partículas de α-amilase pode variar de alguma porcentagem do peso total de α-amilase a muitas vezes aquele peso, dependendo da natureza do lipídio, maneira na qual é aplicado às partículas de α-amilase, composição da mistura de massa de farinha a ser tratada e a severidade da operação de mistura da massa de farinha envolvida.

O veículo de entrega carregado, isto é, a enzima envelopada no lipídio, é adicionado aos ingredientes usados para preparar um assado em uma quantidade eficaz para estender o prazo de validade do assado. O pa-

deiro computa a quantidade da α -amilase envelopada, preparada como discutido acima, que será requerida para alcançar o efeito antienvelhecimento desejado. A quantidade da α -amilase envelopada requerida é calculada com base na concentração da enzima envelopada e na proporção da α -amilase na farinha especificada. Uma ampla faixa de concentrações foi considerada ser eficaz, embora, como foi discutido, melhorias observáveis no antienvelhecimento não correspondem linearmente com a concentração de α -amilase, mas acima de certos níveis mínimos, grandes aumentos na concentração de α -amilase produzem pequena melhoria adicional. A concentração de α -amilase atualmente usada em uma determinada produção de padaria pode ser muito mais alta do que o mínimo necessário a fim de fornecer ao padeiro com alguma garantia contra erros na medição inadvertida pelo padeiro. O menor limite de concentração enzimática é determinado pelo mínimo efeito antienvelhecimento que o padeiro deseja alcançar.

Um método de preparação de um assado pode compreender: a) preparação de partículas de α -amilase cobertas por lipídio, onde substancialmente todas as partículas de α -amilase são cobertas; b) mistura de uma massa de farinha contendo farinha; c) adição da α -amilase coberta por lipídio à massa de farinha antes da mistura é completa e terminação da mistura antes que o revestimento lipídico seja removido da α -amilase; d) prova da massa de farinha; e e) cozimento da massa de farinha para fornecer o assado, onde a α -amilase é inativa durante os estágios de mistura, prova e cozimento e está ativa no assado.

A α -amilase envelopada pode ser adicionada à massa de farinha durante o ciclo de mistura, por exemplo, próximo ao final do ciclo de mistura. A α -amilase envelopada é adicionada em um ponto no estágio de mistura que permite a distribuição suficiente da α -amilase envelopada em todas as partes da massa de farinha; entretanto, a etapa de mistura é terminada antes que o revestimento protetor seja retirado da partícula(s) de α -amilase. Dependendo do tipo e volume da massa de farinha, e ação e velocidade do misturador, em qualquer tempo de um a seis minutos ou mais pode ser requerido para a mistura à α -amilase envelopada na massa de farinha, mas

dois a quatro minutos é a média. Dessa forma, diversas variáveis podem determinar o procedimento preciso. Em primeiro lugar, a quantidade de α-amilase envelopada deve ter um volume total suficiente para permitir à α-amilase envelopada ser espalhada em todas as partes da mistura de massa de farinha. Se a preparação de α-amilase envelopada for altamente concentrada, óleo adicional pode precisar ser adicionado à mistura para bolo antes que a α-amilase envelopada seja adicionada à massa de farinha. Receitas e processos de produção podem requerer modificações específicas; entretanto, bons resultados geralmente podem ser alcançados quando 25% do óleo especificado em uma fórmula de massa de farinha de pão são mantidos fora da massa de farinha e é usado como um veículo para uma α-amilase envelopada concentrada quando adicionado próximo ao final do ciclo de mistura. No pão ou outros assados, particularmente aqueles que têm um baixo conteúdo de gordura, por exemplo, pães de estilo francês, uma mistura de α-amilase envelopada de aproximadamente 1% do peso de farinha seca é suficiente para misturar a α-amilase envelopada propriamente com a massa de farinha. A faixa de porcentagens adequadas é larga e depende da fórmula, produto terminado e exigências de metodologia de produção do padeiro individual. Em segundo lugar, a suspensão de α-amilase envelopada deve ser adicionada à mistura com o tempo suficiente para mistura completa na massa de farinha, mas não um tempo que a ação mecânica excessiva remova o revestimento lipídico protetor das partículas de α-amilase envelopadas.

7. Composições e Uso na Desengomagem Têxtil

Também contemplados são composições e métodos de tratamento de tecidos (por exemplo, para desengomar um tecido) usando uma TrAA ou uma variante da mesma. Métodos de tratamento de tecido são bem-conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Patente Americana Nº 6.077.316). Por exemplo, em um aspecto, a sensação e aparência de um tecido são melhoradas por um método compreendendo contatar o tecido com uma TrAA ou uma variante da mesma em uma solução. Em um aspecto, o tecido é tratado com a solução sob pressão.

Em um aspecto, uma TrAA ou uma variante da mesma é aplica-

da durante ou após a tecelagem de um tecido, ou durante a etapa de desengomagem, ou uma ou mais etapas de processamento de tecido adicionais.

Durante a tecelagem de tecidos, os fios são expostos à tensão mecânica considerável. Antes da tecelagem em teares mecânicos, os fios de urdidura

- 5 muitas vezes são cobertos com engomagem de amido ou derivados de amido para aumentar sua força elástica e prevenir quebra. Uma TrAA ou uma variante da mesma pode ser aplicada durante ou após a tecelagem para remover estas engomagens de amido ou derivadas de amido. Após tecelagem, uma TrAA ou uma variante da mesma pode ser usada para remover o
10 revestimento de goma antes ainda do processamento do tecido para assegurar um resultado homogêneo e à prova de lavagem.

Uma TrAA ou uma variante da mesma pode ser usada sozinha ou com outros reagentes químicos de desengomagem e/ou enzimas de de-

15 sengomagem para desengomar tecidos, incluindo tecidos contendo algodão, como aditivos detergentes, por exemplo, em composições aquosas. Uma TrAA ou uma variante da mesma também pode ser usada em composições

e métodos para produção de uma aparência desgastada no tecido de algodão tingido com índigo e artigos de vestuário. Para a fabricação de roupas, o tecido pode ser cortado e costurado em roupas ou artigos de vestuário, que

20 são posteriormente terminados. Em particular, para a fabricação da jeans de tecido de algodão, diferentes métodos enzimáticos de acabamento foram desenvolvidos. O acabamento do artigo de vestuário de tecido de algodão

normalmente é iniciado com uma etapa de desengomagem enzimática, du-

25 rante a qual os artigos de vestuário são submetidos à ação de enzimas am-

iolíticas para fornecer maciez ao tecido e fazer o algodão mais acessível às etapas de acabamento enzimático subsequentes. Uma TrAA ou uma varian-

te da mesma pode ser usada em métodos de acabamento de artigos de ves-

tuário de tecido de algodão (por exemplo, um "processo de biodesgaste"),

desengomagem enzimática e fornecimento de maciez a tecidos e/ou proces-

30 so de acabamento.

Será evidente àqueles versados na técnica que várias modifica-

cões e variações podem ser feitas nas composições e métodos de uso dos

mesmos sem afastar-se do espírito ou escopo de uso desejado. Dessa maneira, estão as modificações e variações fornecidas por eles no escopo das reivindicações acrescentadas e seus equivalentes.

Exemplos

5 Exemplo 1

1.1 Clonagem do gene *TrAA*

DNA cromossômico de *T. reesei* QM6a foi isolado de uma massa micelial de uma cultura líquida no Caldo de Dextrose de Batata (Difco™ Cat. Nº 254920) usando o Sistema BIO101 Fast Prep® de acordo com o método descrito pelo fornecedor (Qbiogene, Inc., Irvine, CA). O DNA foi purificado usando uma coluna Quick Spin (Qiagen, Inc., Valencia, CA; Cat. Nº 28106). O gene *TrAA* foi isolado usando iniciadores com sequências específicas para *TrAA*, um iniciador de sentido direto NSP331 (SEQ ID NO:6: AT-GAAGCTCCGGTACGCTCTCC) e um iniciador de sentido reverso NSP332 (SEQ ID NO:7: TCACGAAGACAGCAAGACAATGGGC) desenhados de acordo com a sequência nucleotídica predita no banco de dados de genoma de *Trichoderma reesei* de United States Department of Energy Joint Genome Institute. Os iniciadores foram flanqueados na extremidade 5' pelas sequências Gateway® attB (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). DNA cromossômico de *T. reesei* QM6a foi usado como molde.

A mistura de PCR continha os seguintes componentes: 4 µL de iniciador de sentido direto (10 µM); 4 µL de iniciador de sentido reverso (10 µM); 1 µL de molde de DNA (500 ng/µL); 2 µL de mistura de dNTP (10 mM); 10 µL de tampão Cx 10x; e 0,5 µL de DNA polimerase PfuTurbo® Cx Hotstart (Stratagene, La Jolla, CA; Cat. Nº 600410). Água deionizada foi adicionada até um volume total de 100 µL. O protocolo de PCR foi como se segue: Desnaturação inicial por 30 s a 98°C, desnaturação, anelamento e extensão em 30 ciclos de 10 s a 98°C; 30 s a 68°C; 45 s a 72°C, respectivamente, e uma etapa de extensão final de 10 min a 72°C.

Os fragmentos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os fragmentos do tamanho esperado foram isolados usando o kit de Purificação de Extração em Gel (Qiagen Cat. Nº 28706). Os

fragmentos PCR foram clonados no vetor pDONR201 Gateway® Entry e transformados em células de *E. coli* DH5α de Máxima Eficiência (Invitrogen Cat. Nº 18258012). A sequência nucleotídica do DNA inserido foi determinada, a partir da qual a sequência de DNA genômico do gene *TrAA* foi deduzida (SEQ ID NO:1).

5 **1.2 Transformação de *T. reesei* e fermentação/expressão de TrAA**

DNA do vetor contendo o gene *TrAA* foi recombinado em *T. reesei* em um vetor de expressão pTrex3g, que é descrito em detalhes em WO 2006/060062. O vetor de expressão resultante foi transformado em uma cepa hospedeira de *T. reesei* derivada de RL-P37 tendo várias deleções gênicas ($\square cbh1$, $\square cbh2$, $\square egl1$, $\square egl2$, isto é, "quad-deletado"; ver WO 92/06184 e WO 05/001036) usando bombardeio de partícula pelo Sistema PDS-1000/Helium (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA; Cat. Nº 165-02257). O protocolo é delineado abaixo, e a referência é feita a exemplos 6 e 11 de WO 05/001036.

15 Uma suspensão de esporos (aproximadamente 5×10^8 esporos/mL) de uma cepa quad-deletada de *T. reesei* foi preparada. Uma suspensão de esporos de 100 a 200 µL foi espalhada no centro de placas do Meio Acetamida de Meio Mínimo (MM). Meio de acetamida MM é 0,6 g/L de acetamida; 1,68 g/L de CsCl; 20 g/L de glicose; 20 g/L de KH₂PO₄; 0,6 g/L de CaCl₂.2H₂O; solução de elementos-traço; 20 g/L ágar Noble; pH 5,5. Uma solução estoque de elementos-traço de 1000x continha 5,0 g/L de Fe-SO₄.7H₂O; 1,6 g/L de MnSO₄.H₂O; 1,4 g/L ZnSO₄.7H₂O; e 1,0 g/L de Co-Cl₂.6H₂O. Permitiu-se que a suspensão de esporo secasse na superfície do meio de acetamida MM.

A transformação seguiu a instrução do fabricante. Resumidamente, 60 mg de partículas de tungstênio M10 foram colocados em um tubo de microcentrífuga. 1 mL de etanol foi adicionado, e permitiu-se que a solução permanecesse por 15 s. As partículas foram centrifugadas a 15.000 rpm por 15 s. O etanol foi removido, e as partículas foram lavadas três vezes com dH₂O estéril antes que 250 µL de 50% (v/v) de glicerol estéril fossem adicionados. 25 µL de suspensão de partículas de tungstênio foram coloca-

dos em um tubo de microcentrífuga. As seguintes soluções então foram adicionadas com agitação contínua: 5 µL (100 a 200 ng/µL) de DNA plasmidial, 25 µL de CaCl₂ a 2,5 M, e 10 µL de espermidina a 0,1 M. As partículas foram centrifugadas por 3 s. O sobrenadante foi removido, e as partículas foram 5 lavadas com 200 µL de etanol a 100% e centrifugadas por 3 s. O sobrenadante foi removido, 24 µL de etanol a 100% foram adicionados e misturados por pipetagem, então alíquotas de 8 µL de partículas foram removidas e colocadas no centro de discos macrocarreadores em um dessecador. Uma vez que tungstênio/solução de DNA foram secos, os discos macrocarreadores 10 foram colocados em uma câmara de bombardeio junto com a placa de acetamida MM com esporos, e o processo de bombardeio foi realizado de acordo com instruções do fabricante. Após bombardeio dos esporos plaqueados com as partículas de tungstênio/partículas de DNA, as placas foram incubadas a 30°C. As colônias transformadas foram transferidas para placas frescas de meio de acetamida MM e incubadas a 30°C.

1.3 Demonstração de atividade de α-amilase de TrAA expressa

Após 5 dias de crescimento em placas de acetamida MM, transformantes mostrando morfologia estável foram inoculados em frascos de agitação de 250 mL contendo 30 mL de meio Proflo. O meio Proflo continha 20 30 g/L de α-lactose; 6,5 g/L de (NH₄)₂SO₄; 2 g/L de KH₂PO₄; 0,3 g/L de MgSO₄.7H₂O; 0,2 g/L de CaCl₂; solução de elementos-traço; 2 mL/L de Tween 80 a 10%; 22,5 g/L de farinha de semente de algodão ProFlo (Traders Protein, Memphis, TN); e 0,72 g/L de CaCO₃. Após dois dias de crescimento a 28°C com a agitação a 140 rpm, 10% da cultura Proflo foram transferidos 25 para um frasco de agitação de 250 mL contendo 30 mL de Meios de Lactose Definidos. A composição de Meios de Lactose Definidos é 5 g/L de (NH₄)₂SO₄; 33 g/L de tampão PIPPS; 9 g/L de casaminoácidos; 4,5 g/L de KH₂SO₄; 1,0 g/L de MgSO₄.7H₂O; 5 mL/L de antiespumante Mazu DF60-P (Mazur Chemicals, IL); solução de elementos-traço; pH 5,5. Após esterilização, 30 40 mL/L de solução de lactose a 40% (p/v) foram adicionados ao meio. Os frascos de agitação de Meio de Lactose Definido foram incubados a 28°C, 140 rpm por 4 a 5 dias.

Os micélios foram removidos por centrifugação, e o sobrenadante foi analisado para a proteína total (BCA Protein Assay Kit, Pierce CA; Cat. Nº 23225). Atividade de α -amilase foi analisada usando o reagente Ceralpha (p-nitrofenil maltoheptaosídeo bloqueado por benzilideno) como um substrato (Megazyme International Ireland, Ltd., Wicklow, Irlanda; Cat. Nº K-CERA).

Amostras do sobrenadante da cultura foram misturadas com um volume apropriado de tampão de carregamento de amostra 2X com agente redutor, e as proteínas foram resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) usando NUPAGE® Novex 10% de Bis-Tris Gel com Tampão de Corrida MES SDS. Proteínas foram coradas com SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen, Carlsbad, CA). O padrão de marcação proteica de uma amostra bruta do sobrenadante de cultura é mostrado na figura 5, coluna 1. É evidente que as células hospedeiras expressam quantidades relativamente altas de uma proteína com um peso molecular aparente de aproximadamente 47 kDa, como determinado por comparação com marcadores de peso molecular na coluna M. Esta TrAA é estimada ser aproximadamente 89% pura.

1.4 Caracterização bioquímica do produto gênico TrAA

Transformantes expressando de TrAA foram cultivados em uma cultura de 3 L. A célula hospedeira secretou TrAA na cultura em uma concentração de aproximadamente 15 a 20 g/L. O filtrado da cultura foi concentrado usando uma unidade de ultrafiltração com um peso molecular limite de 10.000 Da (Pall Corp., Omega™ Membrane, Cat. Nº OS010c10). A preparação enzimática bruta foi purificada usando um Sistema AKTA Explorer 100 25 FPLC (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Uma coluna HiPrep 16/10 FF Q-Sepharose (Amersham BioSciences, Cat. Nº 17-5190-01) foi equilibrada com Tris a 25 mM, pH 6,0, e a proteína foi eluída da coluna com NaCl 100 mM, Tris a 25 mM, pH 6,0. Uma segunda etapa de cromatografia por afinidade foi realizada usando resina Cbind 200 (Novagen Cat. Nº 701212-3) 30 e Tris a 50 mM, pH 7,0 contendo NaCl a 500 mM como tampão de eluição. Após esta purificação por afinidade, a TrAA pode ser concentrada novamente pela ultrafiltração como descrito acima. A TrAA purificada foi analisada por

SDS-PAGE, e os resultados são mostrados na figura 5, coluna 2. A TrAA foi estimada ser aproximadamente 98% pura.

Os perfis de pH e temperatura da atividade de α -amilase do produto gênico foram determinados usando o reagente Ceralpha (Megazyme International Ireland, Ltd., Wicklow, Irlanda; Cat. Nº K-CERA) como um substrato. Como mostrado na figura 6A, TrAA demonstra um pH ótimo de aproximadamente pH 5 a 6, e como mostrado na figura 6B, TrAA demonstra uma temperatura ótima de aproximadamente 42°C sob as condições testadas.

Exemplo 2

TrAA é útil para aumentar o rendimento de glicose em uma reação de sacarificação catalisada por uma glicoamilase em um pH baixo. TrAA (Lote N. GCI2004017/018-UF) foi purificada como descrito na seção 1.3 do Exemplo 1. Glicoamilase foi GA-L, Lote Nº 901-04290-001 (Genencor International, Inc.), que tinha uma atividade de 385 GAU/g. O substrato consistiu em um substrato de amido liquefeito preparado como se segue: 745 g de amido de milho bruto foi diluído com água para criar uma pasta fluida de 32% p/p de sólido seco. A α -amilase bacteriana termoestável Spezyme® Ethyl (Genencor International, Inc.), Lote Nº 107-04107-001, foi adicionada a uma concentração de 0,3 kg/mt de sólido seco, e a solução foi liquefeita a 92°C por 25 min. Um teste de iodo foi realizado para medir a concentração restante de amido usando procedimentos bem-conhecidos na técnica.

O amido liquefeito foi resfriado a 60°C e o pH foi ajustado a 4,2 com 20% v/v de ácido sulfúrico. TrAA e Optimax® 4060 foram adicionados nas concentrações indicadas abaixo, e a reação foi realizada por 30 horas a 60°C. No fim da reação, DPn produzidos pela reação foram determinados usando HPLC, após diluição da amostra em 1:40 com água de classificação para HPLC e filtração das amostras através de um filtro de 0,45 micron. Para a análise de HPLC, 20 μ L das amostras foram injetados em uma coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid(H⁺) e resolvidas em uma corrida de 16 min em uma fase móvel de água de classificação para HPLC a 60°C. Os produtos (DPn) no eluente foram medidos por modificação no índice refrativo.

A tabela 1 mostra DPn obtidos de uma reação representativa; a figura 1 representa a produção de DP1 como uma função de concentrações enzimáticas usadas neste experimento. Como pode ser visto, TrAA na presença de uma glicoamilase produz um xarope rico em glicose tendo uma maior concentração de glicose do que uma glicoamilase por si só.

5

Tabela 1

GA	TrAA	Tempo (h)	DP1	DP2	DP3	DP4+
0,6 kg/mt de sólido seco	Nenhum	30	95,7	1,7	0,2	2,5
0,6 kg/mt de sólido seco	0,06 kg/mt de sólido seco	30	96,7	1,7	0,1	1,5
0,6 kg/mt de sólido seco	0,12 kg/mt de sólido seco	30	96,7	1,8	0,2	1,3
0,6 kg/mt de sólido seco	0,18 kg/mt de sólido seco	30	97,0	1,8	0,2	1,1
0,6 kg/mt de sólido seco	0,3 kg/mt de sólido seco	30	97,2	1,8	0,2	0,8

Exemplo 3

Uma reação de sacarificação catalisada por TrAA e uma glicoamilase alcança um nível mais alto de glicose em um tempo mais curto do que uma reação catalisada somente por uma glicoamilase. O amido de milho bruto liquefeito foi preparado como descrito no Exemplo 2 como uma pasta fluida de 32% de sólido seco. O amido liquefeito foi resfriado a 60°C e o pH foi ajustado a 4,2 antes da adição de enzimas nas concentrações indicadas na TABELA 2. TrAA (Lote Nº GCI12004017/018-UF) foi preparada como descrito na seção 1.3 do Exemplo 1. Glicoamilase foi fornecida como GA-L (Lote Nº 901-04290-001) em 385 GAU/g. DPn foram medidos no fim da reação como indicado no Exemplo 2 acima.

10

15

Tabela 2

GA	TrAA	Tempo (h)	DP1	DP2	DP3	DP4+
1 kg/mt de sólido seco	Nenhum	21	93,9	2,5	0,3	3,3
		24	94,6	2,6	0,3	2,4
		29	95,0	2,8	0,3	1,9
		48	95,2	3,8	0,4	0,7
1 kg/mt de sólido seco	0,1 kg/mt de sólido seco	21	94,6	2,5	0,3	2,4
		24	95,1	2,6	0,3	2,0
		29	95,4	2,9	0,3	1,4
		48	95,3	3,7	0,4	0,7
1 kg/mt de sólido seco	0,2 kg/mt de sólido seco	21	95,1	2,5	0,3	2,0
		24	95,3	2,6	0,3	1,7
		29	95,5	2,9	0,4	1,2
		48	95,4	3,7	0,4	0,5
1 kg/mt de sólido seco	0,3 kg/mt de sólido seco	21	95,6	2,5	0,3	1,7
		24	95,7	2,6	0,3	1,4
		29	95,7	2,9	0,3	1,1
		48	95,3	3,6	0,3	0,7
1 kg/mt de sólido seco	0,5 kg/mt de sólido seco	21	95,6	2,6	0,3	1,4
		24	95,9	2,6	0,3	1,2
		29	95,9	2,9	0,3	0,9
		48	95,2	3,8	0,4	0,7
0,5 kg/mt ds	0,5 kg/mt de sólido seco	21	94,2	2,0	0,4	3,4
		24	94,5	2,5	0,4	3,0
		29	95,3	2,1	0,4	2,3
		48	95,9	2,5	0,3	1,3

A adição da TrAA à reação de sacarificação causou um aumento em DP1, isto é, glicose, na reação. Condições ótimas da produção de DP1 foram encontradas onde glicoamilase estava a 1 kg/mt de sólido seco e 5 TrAA estava a 0,5 kg/mt de sólido seco. DP1 sob estas condições alcançou 95,9% p/p de sólido seco, que foi mais alto do que o nível máximo de DP1

obtido sem TrAA, 95,2% p/p de sólido seco. O nível máximo de DP1 foi alcançado após 24 horas na presença de TrAA, mas foi alcançado somente após 48 horas com glicoamilase sozinha. Na presença de 0,5 kg/mt de sólido seco e TrAA, a reversão de DP1 a oligossacarídeos maiores não começou até 48 horas após a reação ter sido iniciada.

Exemplo 4

TrAA é também útil para aumentar o rendimento de maltose em uma reação de sacarificação. TrAA exibe atividade maltogênica em pH relativamente baixo, como determinado no experimento seguinte. O substrato consistiu em um substrato de amido liquefeito preparado como descrito no Exemplo 2, exceto que o milho bruto foi diluído com água para criar uma pasta fluida de 30% p/p de sólido seco, a qual 0,25 kg/mt de sólido seco de Spezyme® Ethyl (Genencor International, Inc., Lote Nº 107-04107-001) foi adicionado. Após liquefação a 92°C por 25 min, o amido liquefeito foi resfriado a 55°C e o pH foi ajustado usando 20% v/v de ácido sulfúrico. DPn foi medido como descrito no Exemplo 2 acima. A figura 2 representa a dependência de pH da produção de DP2 após uma reação de 24 horas catalisada por 0,5 kg/mt de sólido seco de TrAA (Lote Nº GCI12004017/018-UF). Como mostrado na Figura 2, TrAA mostrou atividade ótima em pH 5,0 a 5,5; entretanto, TrAA também mostrou atividade quase ótima acima de uma faixa de pH de 4,5 a 6,0. Este experimento indica que TrAA é altamente ativa em pH relativamente baixo de 4,5.

Exemplo 5

TrAA pode catalisar a produção de DP2 a níveis comparáveis àqueles obtidos com a α -amilase fúngica maltogênica Clarase® L (Genencor International, Inc.). TrAA foi produzida a partir de *T. reesei* e purificada de acordo com os procedimentos descritos no Exemplo 1 acima. A TrAA (Lote Nº 150906) usada para este experimento demonstrou uma atividade específica de aproximadamente 18.000 SKBU/g. TrAA também foi testada em combinação com uma pululanase na forma de Optimax® L-1000 (Genencor International, Inc., Lote Nº 107-04224-001), que tinha uma atividade específica de aproximadamente 1040 unidades de PU/g. Atividade específica do

Clarase® L (Lote N° 107-04330-001) neste experimento foi aproximadamente 41.000 SKBU/g.

Amido liquefeito foi preparado como descrito no Exemplo 2 e foi ajustado a 55°C, pH 5,5, ou 60°C, pH 4,5. Enzimas foram adicionadas nas concentrações indicadas abaixo, e a reação foi realizada por 48 horas na temperatura indicada. DPn produzidos durante a reação foram medidos em 24 horas e 48 horas após a reação ter sido iniciada, usando os procedimentos descritos no Exemplo 2. A TABELA 3 mostra os DPn obtidos a partir de uma reação representativa. A figura 3 representa a concentração de DP2 obtido após 48 horas da reação de sacarificação como uma função da concentração enzimática em unidades de SKBU/g.

Tabela 3

Enzima 1 (dose)	Enzima 2 (do- se)	T (°C)	pH	Tempo (h)	% de DP1	% de DP2	% de DP3	% de HS
Clarase® L (10 SK- BU/g)	NA	55	5,5	24	3,0	53,9	21,3	21,7
				48	4,4	58,2	17,1	20,3
TrAA (10 SKBU/g)	NA	60	4,5	24	4,5	37,8	23,7	34,0
				48	6,4	46,2	21,7	25,7
TrAA (15 SKBU/g)	NA	60	4,5	24	6,7	47,4	21,3	24,6
				48	8,9	52,8	17,3	21,1
TrAA (20 SKBU/g)	NA	60	4,5	24	8,7	52,6	17,6	21,1
				48	10,5	55,1	14,5	19,9
TrAA (20 SKBU/g)	PU (0,25 kg/mt)	60	4,5	24	8,9	54,5	19,4	17,2
				48	11,3	58,9	16,5	13,4

Em 48 horas, a concentração de DP2 tinha aumentado em aproximadamente 58% p/p de sólido seco na presença de 10 SKBU/g de Clarase® L a 55°C, pH 5,5. Em comparação, reações catalisadas por 20 SKBU/g de TrAA a 60°C, pH 4,5 produziram aproximadamente 55% de DP2 em 48 horas. Na presença de 20 SKBU/g de TrAA e 0,25 kg/mt de pululanase, en-

tretanto, DP2 aumentou a aproximadamente 59% p/p de sólido seco em 48 horas, excedendo a concentração obtida com Clarase® L. Além disso, TrAA por si só ou em combinação com uma pululanase produziu um xarope rico em maltose com uma concentração mais alta de DP1 do que a obtida com 5 Clarase® L: aproximadamente 11% p/p de sólido seco contra aproximadamente 4% p/p de sólido seco. Este experimento consequentemente mostra que TrAA pode ser usada para produzir um xarope de alta maltose em um pH baixo, onde o xarope contém níveis comparáveis de maltose, bem como níveis mais altos de glicose, do que os obtidos com Clarase® L.

10 **Exemplo 6**

Quando usado em pH baixo, TrAA significativamente superou outras amilases maltogênicas convencionais, como mostrado no seguinte experimento. As condições experimentais usadas foram as mesmas do Exemplo 5, exceto que a reação foi conduzida a 58°C, pH 4,6 e a produção de 15 DPn foi catalisada por 0,2 kg/mt de sólido seco BBA (uma β-amilase; Lote N° 05189-001), 0,2 kg/mt de sólido seco de Clarase® L (Lote N° 9016231002), ou 0,5 kg/mt de sólido seco de TrAA (Lote N° GCI2004017/018-UF). Como indicado na TABELA 4, concentrações significativamente mais altas de DP2 foram obtidas na presença de TrAA do que na BBA ou Clarase® L.

20 **TABELA 4**

Enzima (dose)	T (°C)	pH	Tempo (h)	% de DP1	% de DP2	% de DP3	% de HS	% de DE
BBA (0,2 kg/mt de sólido seco)	58	4,6	24	0,6	12,5	3,2	83,6	25
			48	0,3	12,2	3,1	84,4	24
Clarase® L (0,2 kg/mt de sólido seco)	58	4,6	24	0,6	9,9	17,9	71,6	28
			48	10,0	18,0	14,2	71,3	28
TrAA (0,5 kg/mt de sólido seco)	58	4,6	24	6,0	44,4	20,8	28,7	46
			48	8,1	51,2	17,8	22,9	49

Exemplo 7

A produção de DP2 pela TrAA foi significativamente aumentada pela adição de uma pululanase. No experimento seguinte, as condições ex-

perimentais foram as mesmas como descritas no Exemplo 5, exceto que a reação foi a 58°C, pH 4,6. Pululanase foi adicionada na forma de Optimax® L-1000 (Genencor International, Inc.; Lote Nº 9016167004 a 1165 PU/g) nas concentrações indicadas na TABELA 5. A reação foi realizada a 58°C, pH 5 4,6, nos tempos indicados. Como mostrado na TABELA 5, 0,1 a 0,25 kg/mt de sólido seco de pululanase aumentaram significativamente a produção de DP2 catalisada por TrAA em 48 horas. A figura 4 representa a formação de DP2 em 48 horas sob as várias condições descritas neste exemplo.

Tabela 5

TrAA	PU	T (°C)	pH	Tempo (h)	% de DP1	% de DP2	% de DP3	% de HS	DE
0,5 kg/mt de sólido seco	Nenhuma	58	4,6	24	7,2	44,8	20,1	27,9	47
				48	9,2	51,6	16,8	22,3	50
0,5 kg/mt de sólido seco	0,1 kg/mt de sólido seco	58	4,6	24	6,7	44,9	21,5	26,9	47
				48	10,4	61,8	22,4	5,3	57
0,5 kg/mt de sólido seco	0,25 kg/mt de sólido seco	58	4,6	24	7,8	49,4	23,6	19,2	50
				48	10,8	61,7	22,0	5,5	57
0,5 kg/mt de sólido seco	0,5 kg/mt de sólido seco	58	4,6	24	7,5	50,3	25	17,2	51
				48	10,3	60,9	22,9	5,9	56

10

Todas as referências citadas acima são neste pedido incorporadas por referência em sua totalidade para todos os objetivos.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo isolado compreendendo (i) resíduos 21 a 463 da SEQ ID NO:3, ou (ii) uma variante da α -amilase de *Trichoderma reesei* (TrAA), em que a variante tem atividade de α -amilase e identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 80% aos resíduos 21 a 463 da SEQ ID NO:3.
5
2. Método de sacarificação de amido liquefeito para produzir um xarope rico em maltose compreendendo: adição de um polipeptídeo como definido na reivindicação 1 a uma solução de amido liquefeito, e sacariação da solução de amido liquefeito, em que a dita sacariação da solução de amido liquefeito produz um xarope rico em maltose.
10
3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que o dito polipeptídeo é adicionado à solução de amido liquefeito em aproximadamente 0,3 a 1 kg por tonelada métrica de sólidos secos.
15
4. Método de acordo com a reivindicação 2, em que a solução de amido liquefeito é uma pasta fluida de amido liquefeito a aproximadamente 20 a 35% p/p de sólidos secos.
20
5. Método de acordo com a reivindicação 2, em que a solução de amido liquefeito é sacarificada de aproximadamente 50°C a aproximadamente 60°C.
25
6. Método de acordo com a reivindicação 5, em que a solução de amido liquefeito é sacarificada de aproximadamente 55°C a aproximadamente 60°C.
30
7. Método de acordo com a reivindicação 2, em que a solução de amido liquefeito é sacarificada em aproximadamente pH 4,0 a aproximadamente pH 6,0.
8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que a solução de amido liquefeito é sacarificada em aproximadamente pH 4,2 a aproximadamente pH 4,8.
9. Método de acordo com a reivindicação 2, compreendendo ainda uma etapa de adição de uma pululanase, uma β -amilase, uma α -amilase fúngica que não é uma TrAA, uma protease, uma celulase, uma

hemicelulase, uma lipase, uma cutinase, uma isoamilase, ou uma combinação das mesmas, à solução de amido liquefeito.

10. Método de acordo com a reivindicação 2, em que a concentração final de maltose atinge uma porcentagem em peso de sólidos secos
5 de aproximadamente 50% a aproximadamente 62%.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que a concentração final de maltose atinge uma porcentagem em peso de sólidos secos de aproximadamente 60% a aproximadamente 62%.

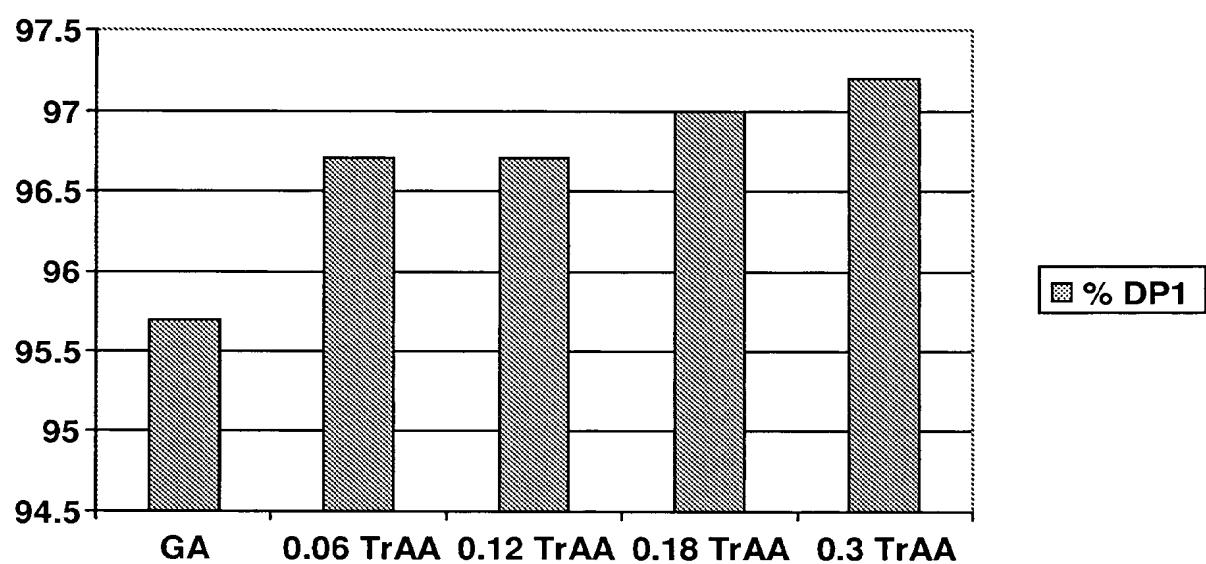
FIG. 1

FIG. 2

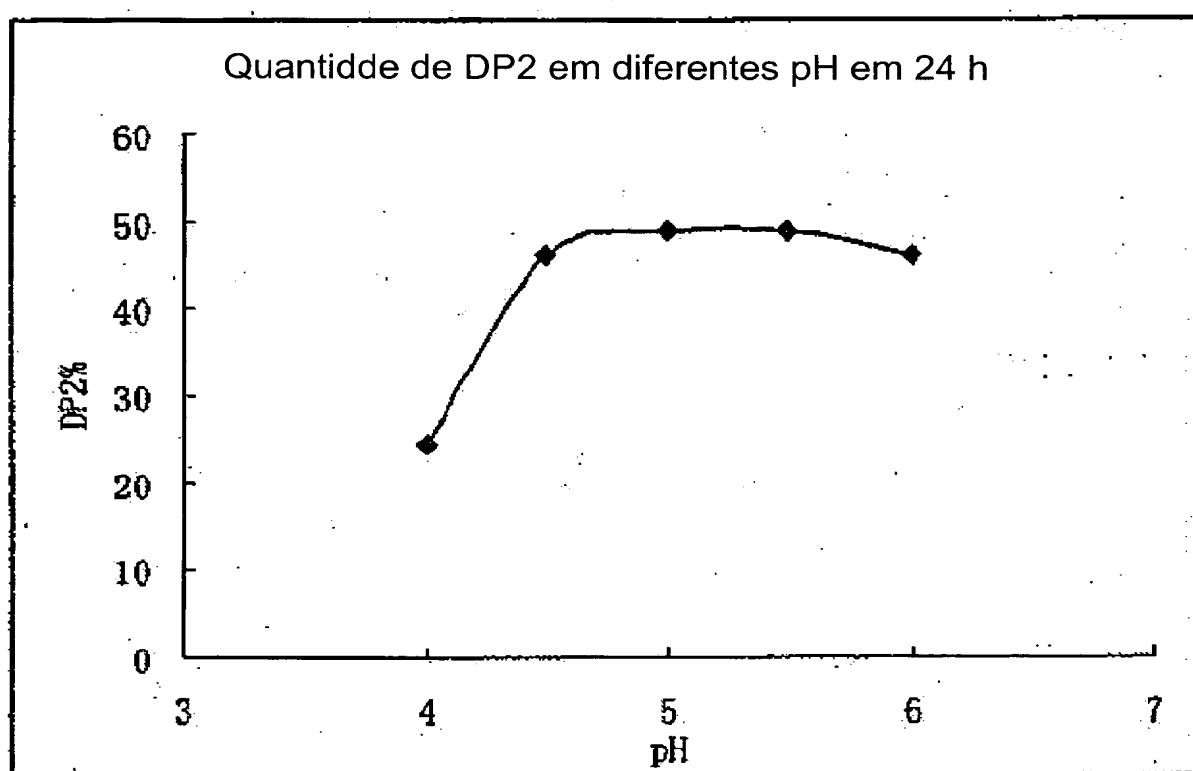


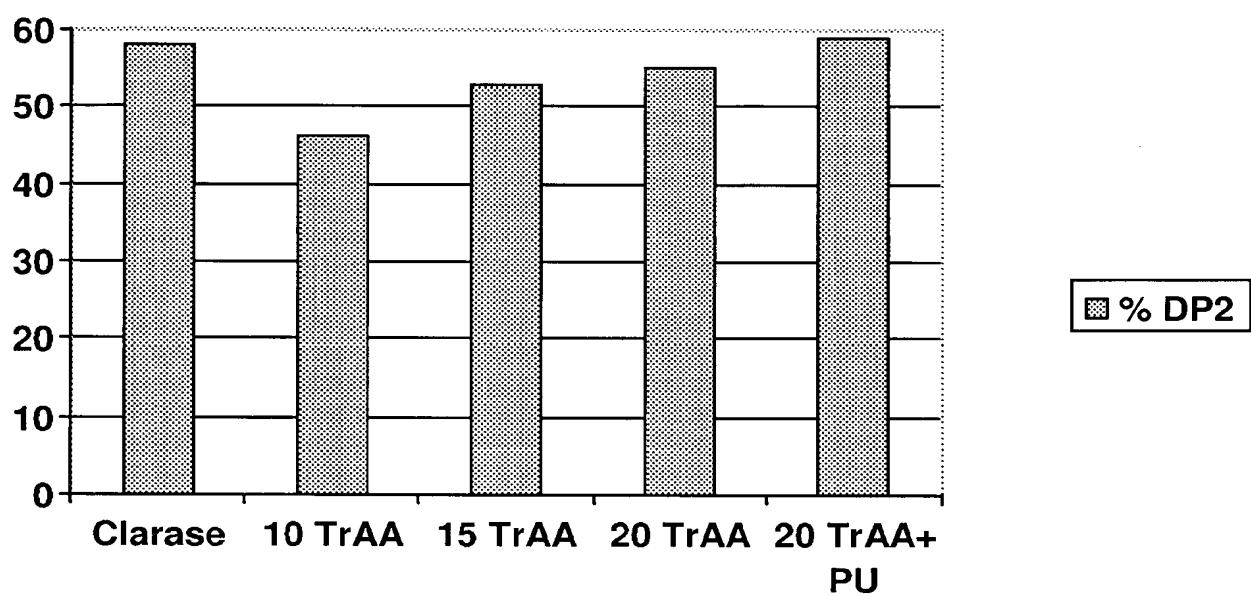
FIG. 3

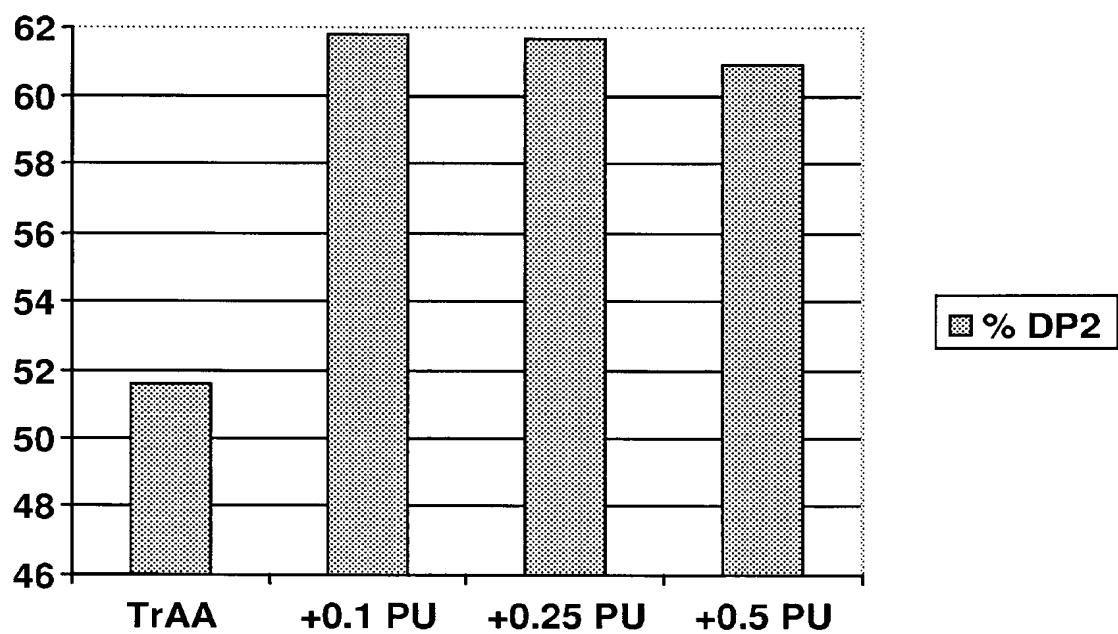
FIG. 4

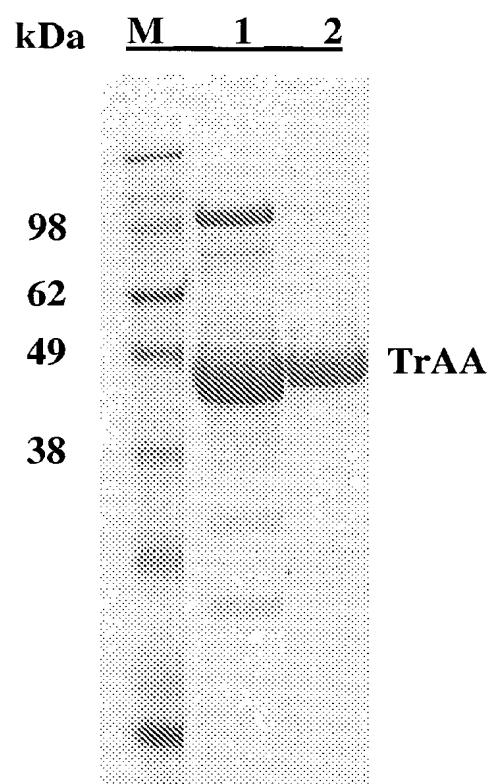
FIG. 5

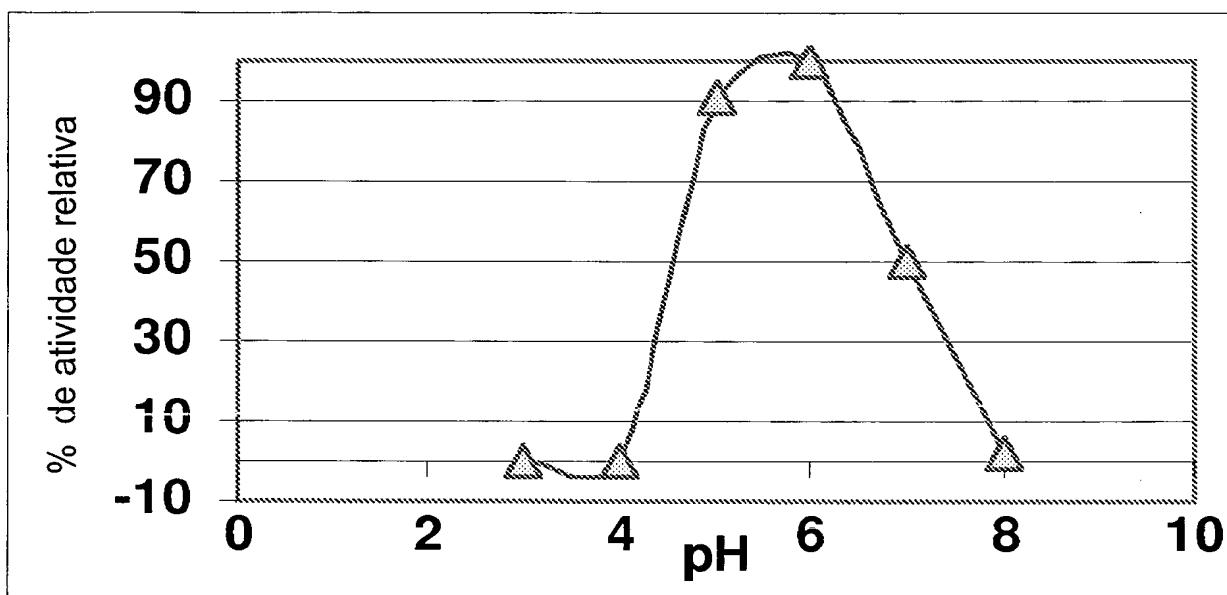
FIG. 6A

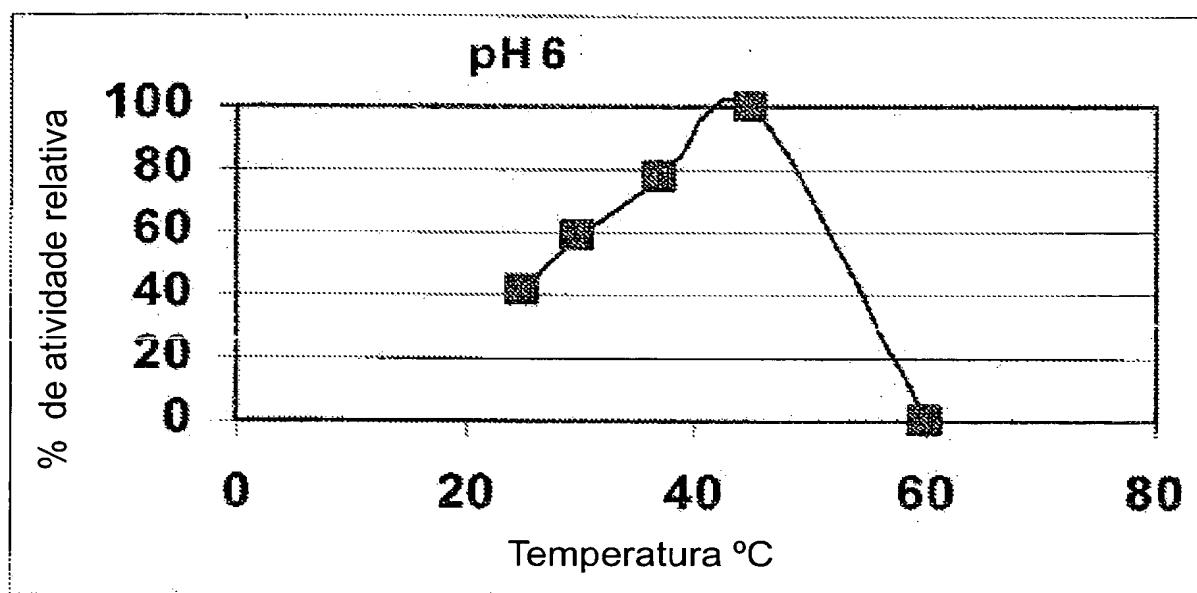
FIG. 6B

FIG. 7A

Listagem de seqüência

SEQ ID NO:1 DNA genômico α-amilase de Trichoderma reesei (1548 nucleotídeos)

```

1 atgaagctcc ggtacgctct cccgctgctc ttgcagctct ctttgcgcgt cctctccgca
61 gacaccgccc cctggaggc tc cgcaccatc tactttgccc tgacagaccc catcgctcgt
121 ggaagcgggtg acacgggggg cagtgcgtgt gggaaacctgg gggactactg cggtggcacg
181 ttcagggtct tggagagcaa gtggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg
241 atcacacctg ttgtgacgag tgagtcttt cataccttc cctgccttgc ctgcctcgc
301 cttgcattgtg tcgcatacag gcttctggta tgcatacgta aacctgatac ctctggacag
361 acagtgtatgg gggctaccat ggctattggg cggaggacat cgactccatc aactcttatt
421 atggctctgc ggacgatctc aagagtctcg tcaacccgc gcatacgaaag gtattccctt
481 ttgttccacac cagacttcat gattatcaaa attaacacaa accagggtt ctatatgatg
541 gtggacgtcg tggccaacca catgggctac gccaatatct ctgacgatag tccctctcca
601 ctgaaccagg cctcgtcgta tcaaaaaagg tgtgatatcg actacaacaa ccaaaccagc
661 gtgcagaact gctggatcg cggcctcccg gatctcaaca cgcagagctc aaccatccgc
721 agcctctacc aggactgggt ctccaaacctc gtgtccacgt acggcttcga cggcgtccgc
781 atgcacccagg tcaagcgtcg cggcaagac tactggcccg gtttgcgtcaa cgccaccaggc
841 gtctactgca tcggcgaggt ctttgacgga gacccaaact acctgtggc ctacgcccgc
901 ctcatgccgg gcctgctcaa ctacgcccatt tactacccca tgacgcccgtt cttccctcc
961 cagggtctc cgcaggacat ggtcaacatg cacgaccaga tcggcagcat gttccccgac
1021 ccgaccggcgc tcggcacctt tgcgacaaac cacgacaacc cgcgttctc gagcatcaag
1081 aacgacacagg ccctgctcaa gaacgcgtcg acgtacacca ttctctcgcg cggcatcccc
1141 atcgtctact acggcacccga gcaggccttc tggggggca acgaccggc caacagggaq
1201 gacctctggc gcagcggctt caacgcccag tccgacatgt acgacgccc ctccaaagctc
1261 acctacgcca agcacggcgt cggcggcctc gccgacaacg accacaagca cctgtacgtc
1321 gccgacacagg cctacgccc tggccggc ggcggcaaca tggtgccct gaccaccaac
1381 agccgcagcgc ggagctcgcc ccagcactgc ttccggacgc aggtgcccgg cggccgctgg
1441 cagaatgtct ttgacgaggg caatggggcc acgtattccg ccgacggcaa cggccagctt
1501 tgcttgaatg tgcggacacgg tcaagccatt gtcttgctgt ctgcgtga

```

SEQ ID NO:2 Seqüência de codificação da α-amilase de Trichoderma reesei (1392 nucleotídeos)

```

1 atgaagctcc ggtacgctct cccgctgctc ttgcagctct ctttgcgcgt cctctccgca
61 gacaccgccc cctggaggc tc cgcaccatc tactttgccc tgacagaccc catcgctcgt
121 ggaagcgggtg acacgggggg cagtgcgtgt gggaaacctgg gggactactg cggtggcacg
181 ttcagggtct tggagagcaa gtggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg
241 atcacacctg ttgtgacgag tgatgtatgg ggctaccatg gctattggc ggaggacatc
301 gactccatca actcttattat tggctctgcg gacgatctcg agactctcgta caacgcccgc
361 catagcaagg gcttcttatat gatggggac gtcgtggca accacatggg ctacgccaat
421 atctctgacg atatccctc tccactgaaac caggcgtcg cgtatcaccc cgagtgtat
481 atcgactaca acaacccaaac cagcgtcgag aactgtggc tcaacgccc cccgatctc
541 aacacgcaga gctcaaccat ccgcagccctc taccaggact gggctccaa ctcgtgtcc
601 acgtacggct tcgacggcgt ccgcattcgac accgtcaagc acgtcgagca agactactgg
661 cccggcttcg tcaacgccc cggcgtctac tgcacggcg aggtctttga cggagaccca
721 aactacctgc tggccatcg cggcctcatg cggggctgc tcaactacgc catctactac
781 cccatgacgc gcttcttc tccagcaggc tccctcgagg acatggtcaa catgcacgac
841 cagatggca gcatgtccc cggccggacc ggcgtggca ctttgcgtca caaccacgac
901 aacccgcgt tcctgagcat caagaacgac acggccctgc tcaagaacgc gtcgacgtac
961 accatcttc cggcggcat ccccatcgtc tactacggca cggagcaggc ttctcgggc
1021 ggcacacgacc cggccaaacag ggaggacctc tggcgcagcg gcttcaacgc ccagtccgac
1081 atgtacgacg ccatctccaa gctcacctac gccaagcacc cctgcggcgg ctcgcggc
1141 aacgaccaca agcaccgtta cgtggccgac acggccctacg cttcagccg cggccggcggc
1201 aacatgggg ccctgaccac caacagccgc agcgggagct cggccacgca ctgcttcggc
1261 acgcagggtgc ccaacggccg ctggcagaat gtcttgacg agggcaatgg gccgacgtat
1321 tccggcggacg gcaacggcca gcttgcattt aatgtgtcca acggtcagcc cattgtcttg
1381 ctgtttcgta ga

```

FIG. 7B

SEQ ID NO:3 Seqüência de aminoácidos da α -amilase de Trichoderma reesei (463 nucleotídeos)

1 MKLRYALPLL LQLSLPVLSA DTAAWRSRTI YFALTDRiar GSGDTGGSAC GNLDYCGGT
61 FQGLESKLDY IKGMGFDAIW ITPVVTSDDG GYHGYWAEDI DSINSHYGSA DDLKSLVNA
121 HSKGFYMMVD VVANHMGYAN ISDDSPSPLN QASSYHPECID IDYNNQTSVE NCWISGLPDL
181 NTQSSTIRSL YQDWVSNLVS TYGFDGVRID TVKHVEQDYW PGFVNATGVY CIGEVFDGDP
241 NYLLPYASLM PGLLNYAIYY PMTRFFLQQG SSQDMVNMDH QIGSMFPDPT ALGTFVDNHD
301 NPRFLSIKND TALLKNALTY TILSRGIPIV YYGTEQAFSG GNDPANREDL WRSGFNAQSD
361 MYDAISKLTY AKHAVGGLAD NDHKHLYVAD TAYAFSRAGG NMVALTTNSG SGSSAQHCFG
421 TQVPNGRWQN VFDEGNNGPTY SADGNGQLCL NVSNGQPIVL LSS

SEQ ID NO:4 Seqüência de sinal da α -amilase de Trichoderma reesei (60 nucleotídeos)

1 atgaagctcc ggtacgctct cccgcgtgctc ttgcagctct ctttgcgggt cctctccgca

SEQ ID NO:5 Seqüência de líder da α -amilase de Trichoderma reesei (20 nucleotídeos)

1 MKLRYALPLL LQLSLPVLSA

SEQ ID NO:6 Indicador de sentido direto NSP331 (22 nucleotídeos)

1 atgaagctcc ggtacgctct cc

SEQ ID NO:7 Indicador de sentido REVERSO NSP331 (25 nucleotídeos)

1 tcacgaagac agcaagacaa tgggc

RESUMO

Patente de Invenção: "**ENZIMA MALTOGÊNICA ALFA-AMILASE DE *TRICHODERMA REESEI*"**.

A invenção refere-se a uma α -amilase maltogênica de *Trichoderma reesei* (TrAA) e variantes das mesmas que são úteis na produção de xaropes de alta maltose a partir de amido liquefeito. Particularmente altas concentrações de maltose são alcançadas quando TrAA é usada na presença de uma pululanase. Hospedeiros para expressão e ácidos nucleicos de codificação úteis para a produção de TrAA e suas variantes também são fornecidos.

Listagem de Sequência

<110> Danisco US Inc., Genencor Division
 Duan, Gang
5 Qian, Kathy
 Scheffers, Martijn
 Shetty, Jayarama
 Van Solingen, Pieter
 <120> ENZIMA MALTOGÊNICA ALFA-AMILASE DE *TRICHODERMA REESEI*
10 <130> 30966WO
 <140> PCT/US2008/056601
 <141> 2008-03-12
 <150> US 60/906,811
 <151> 2007-03-14
15 <150> US 60/906,812
 <151> 2007-03-14
 <160> 7
 <170> PatentIn versão 3.5
 <210> 1
20 <211> 1548
 <212> DNA
 <213> Trichoderma reesei
 <400> 1

atgaagctcc ggtacgctct cccgctgctc ttgcagctct ctttgcgggt cctctccgca	60
25 gacaccgccc cctggagggtc ccgcaccatc tactttgccc tgacagaccg catcgctcgt	120
ggaagcggtg acacgggggg cagtgcgtgt gggAACCTGG gggactactg cggtggcacg	180
ttccagggct tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg	240
atcacacactg ttgtgacgag tgagtcttt cataccttgc cctgccttgc ctgcgcctcgc	300
cttgcatacg tcgcatacag gcttctggta tgcatacgata aacctgatac ctctggacag	360
30 acagtgtatgg gggctaccat ggctattggg cggaggacat cgactccatc aactctcatt	420
atggctctgc ggacgatctc aagagtctcg tcaacgcccgc gcatagcaag gtattccctt	480
ttgttcacac cagacttcat gattatcaaa attaacacaa accaggcgtt ctatatgtg	540

	gtggacgtcg tggccaacca catggctac gccaatatct ctgacgatag tccctctcca	600
	ctgaaccagg cctcgtcgta tcaccccgag tgtgatatcg actacaacaa ccaaaccagc	660
	gtcgagaact gctggatcg cgccctcccg gatctcaaca cgagagctc aaccatccgc	720
	agccttacc aggactgggt ctccaacctc gtgtccacgt acggcttcga cggcgtccgc	780
5	atcgacaccg tcaagcacgt cgagcaagac tactggcccg gctcgtcaa cgccaccggc	840
	gtctactgca tcggcgaggt ctttgacgga gacccaaact acctgctgcc ctacgccagc	900
	ctcatgccgg gcctgctcaa ctacgccatc tactacccca tgacgcgtt cttccctccag	960
	cagggctcct cgaggacat ggtcaacatg cacgaccaga tcggcagcat gttccccgac	1020
	ccgaccgcgc tcggcacctt tgtcgacaac cacgacaacc cgcgcttcct gagcatcaag	1080
10	aacgacacgg ccctgctcaa gaacgcgctg acgtacacca tcctctcgcg cgccatcccc	1140
	atcgctact acggcacccga gcaggccttc tcgggcccga acgaccggc caacagggag	1200
	gacctctggc gcagcggctt caacgcccag tccgacatgt acgacgcatt ctccaaagctc	1260
	acctacgcca agcacgcgtt cggcggccctc gccgacaacg accacaagca cctgtacgtc	1320
	gccgacacgg cctacgcctt cagccgcgcc ggcggcaaca tggtggccct gaccaccaac	1380
15	agccgcagcg ggagctcgcc ccagcactgc ttccggcacgc aggtgcccaa cgccgcgtgg	1440
	cagaatgtct ttgacgaggg caatggcccg acgtattccg ccgacggcaa cggccagctt	1500
	tgcttgaatg tgtccaacgg tcagccatt gtcttgcgtt cttcgtga	1548
	210> 2	
	<211> 1392	
20	<212> DNA	
	<213> Trichoderma reesei	
	<400> 2	
	atgaagctcc ggtacgctct cccgctgctc ttgcagctct ctttgcgggt cctctccgca	60
	gacaccggcg cctggagggtc ccgcaccatc tactttgccc tgacagaccc catcgctcg	120
25	ggaagcggtg acacgggggg cagtgcgtgt gggAACCTGG gggactactg cggtggcacg	180
	ttccagggtt tggagagcaa gttggactac atcaaggga tgggattcga tgccatctgg	240
	atcacacctg ttgtgacgag ttagtatggg ggctaccatg gctattggc ggaggacatc	300
	gactccatca actctcattt tggctctcg gacgatctca agagtctcgta caacgcgcgc	360
	catagcaagg gcttctataat gatgggtggac gtcgtggcca accacatggg ctacgcata	420
30	atctctgacg atagtccttc tccactgaac caggcctcgat cgtatcaccc cgagtgtat	480
	atcgactaca acaaccaaac cagcgtcgag aactgctgga tcagcggcct cccggatctc	540
	aacacgcaga qctcaaccat ccgcagcctc taccaggact gggctccaa cctcgtgtcc	600

	acgtacggct tcgacggcgt ccgcacatcgac accgtcaagc acgtcgagca agactactgg	660
	ccggcgttcg tcaacgcccac cggcgctcac tgcacatcgcg aggtcttga cggagaccca	720
	aactacactgc tgccctacgc cagcctcatg ccgggcctgc tcaactacgc catctactac	780
	cccatgacgc gcttcttcct ccagcagggc tcctcgagg acatggtcaa catgcacgac	840
5	cagatcgacca gcatgttccc cgaccgcacc gcgcgtcgac cctttgtcga caaccacgac	900
	aacccgcgct tcctgagcat caagaacgac acggccctgc tcaagaacgc gctgacgtac	960
	accatcctct cgcgcggcat ccccatcgac tactacggca ccgagcaggc cttctcgccc	1020
	ggcaacgacc cggccaacag ggaggacctc tggcgagcg gcttcaacgc ccagtccgac	1080
	atgtacgacg ccatctccaa gctcacctac gccaaggcacc ccgtcgccgg cctcgccgac	1140
10	aacgaccaca agcacctgta cgtcgcccac acggcctacg cttcagccg cgccggcggc	1200
	aacatggtgg ccctgaccac caacagcggc agcgggagct cggccagca ctgcttcggc	1260
	acgcaggtgc ccaacggccg ctggcagaat gtcttgacg agggcaatgg gccgacgtat	1320
	tccgcccacg gcaacggcca gcttgcttg aatgtgtcca acggtcagcc cattgtcttg	1380
	ctgtcttcgt ga	1392
15	<210> 3	
	<211> 463	
	<212> PRT	
	<213> Trichoderma reesei	
	<400> 3	
20	Met Lys Leu Arg Tyr Ala Leu Pro Leu Leu Leu Gln Leu Ser Leu Pro	
	1 5 10 15	
	Val Leu Ser Ala Asp Thr Ala Ala Trp Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Phe	
	20 25 30	
	Ala Leu Thr Asp Arg Ile Ala Arg Gly Ser Gly Asp Thr Gly Gly Ser	
25	35 40 45	
	Ala Cys Gly Asn Leu Gly Asp Tyr Cys Gly Gly Thr Phe Gln Gly Leu	
	50 55 60	
	Glu Ser Lys Leu Asp Tyr Ile Lys Gly Met Gly Phe Asp Ala Ile Trp	
	65 70 75 80	
30	Ile Thr Pro Val Val Thr Ser Asp Asp Gly Gly Tyr His Gly Tyr Trp	
	85 90 95	
	Ala Glu Asp Ile Asp Ser Ile Asn Ser His Tyr Gly Ser Ala Asp Asp	

	100	105	110
	Leu Lys Ser Leu Val Asn Ala Ala His Ser Lys Gly Phe Tyr Met Met		
	115	120	125
	Val Asp Val Val Ala Asn His Met Gly Tyr Ala Asn Ile Ser Asp Asp		
5	130	135	140
	Ser Pro Ser Pro Leu Asn Gln Ala Ser Ser Tyr His Pro Glu Cys Asp		
	145	150	155
	Ile Asp Tyr Asn Asn Gln Thr Ser Val Glu Asn Cys Trp Ile Ser Gly		
	165	170	175
10	Leu Pro Asp Leu Asn Thr Gln Ser Ser Thr Ile Arg Ser Leu Tyr Gln		
	180	185	190
	Asp Trp Val Ser Asn Leu Val Ser Thr Tyr Gly Phe Asp Gly Val Arg		
	195	200	205
	Ile Asp Thr Val Lys His Val Glu Gln Asp Tyr Trp Pro Gly Phe Val		
15	210	215	220
	Asn Ala Thr Gly Val Tyr Cys Ile Gly Glu Val Phe Asp Gly Asp Pro		
	225	230	235
	Asn Tyr Leu Leu Pro Tyr Ala Ser Leu Met Pro Gly Leu Leu Asn Tyr		
	245	250	255
20	Ala Ile Tyr Tyr Pro Met Thr Arg Phe Phe Leu Gln Gln Gly Ser Ser		
	260	265	270
	Gln Asp Met Val Asn Met His Asp Gln Ile Gly Ser Met Phe Pro Asp		
	275	280	285
	Pro Thr Ala Leu Gly Thr Phe Val Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Phe		
25	290	295	300
	Leu Ser Ile Lys Asn Asp Thr Ala Leu Leu Lys Asn Ala Leu Thr Tyr		
	305	310	315
	Thr Ile Leu Ser Arg Gly Ile Pro Ile Val Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln		
	325	330	335
30	Ala Phe Ser Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Arg Glu Asp Leu Trp Arg		
	340	345	350
	Ser Gly Phe Asn Ala Gln Ser Asp Met Tyr Asp Ala Ile Ser Lys Leu		

	355	360	365	
	Thr Tyr Ala Lys His Ala Val Gly Gly Leu Ala Asp Asn Asp His Lys			
	370	375	380	
	His Leu Tyr Val Ala Asp Thr Ala Tyr Ala Phe Ser Arg Ala Gly Gly			
5	385	390	395	400
	Asn Met Val Ala Leu Thr Thr Asn Ser Gly Ser Gly Ser Ser Ala Gln			
	405	410	415	
	His Cys Phe Gly Thr Gln Val Pro Asn Gly Arg Trp Gln Asn Val Phe			
	420	425	430	
10	Asp Glu Gly Asn Gly Pro Thr Tyr Ser Ala Asp Gly Asn Gly Gln Leu			
	435	440	445	
	Cys Leu Asn Val Ser Asn Gly Gln Pro Ile Val Leu Leu Ser Ser			
	450	455	460	
	<210> 4			
15	<211> 60			
	<212> DNA			
	<213> Trichoderma reesei			
	<400> 4			
	atgaagctcc ggtacgctct cccgctgctc ttgcagctct ctttgccggc cctctccgca			60
20	<210> 5			
	<211> 20			
	<212> PRT			
	<213> Trichoderma reesei			
	<400> 5			
25	Met Lys Leu Arg Tyr Ala Leu Pro Leu Leu Leu Gln Leu Ser Leu Pro			
	1	5	10	15
	Val Leu Ser Ala			
	20			
	<210> 6			
30	<211> 22			
	<212> DNA			
	<213> Artificial			

<220>

<223> iniciador sintético

<400> 6

atgaagctcc ggtacgctct cc

22

5 <210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

10 <223> iniciador sintético

<400> 7

tcacgaagac agcaagacaa tgggc

25