



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

(21) **PI 0713389-8 A2**

(22) Data de Depósito: 06/06/2007
(43) Data da Publicação: 17/04/2012
(RPI 2154)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 9/28

(54) Título: PROCESSO PARA DESENGOMAGEM E LAVAGEM COMBINADAS DE UM TECIDO ENGOMADO, E, COMPOSIÇÃO

(30) Prioridade Unionista: 21/06/2006 US 60/815788

(73) Titular(es): Novozymes North America, Inc. e Novozymes A/S

(72) Inventor(es): Guifang Wu, Jiyin Liu, Sonja Salmon

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2007070485 de 06/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/149699 de 27/12/2007

(57) Resumo: PROCESSO PARA DESENGOMAGEM E LAVAGEM COMBINADAS DE UM TECIDO ENGOMADO, E, COMPOSIÇÃO. A presente invenção refere-se a processos para desengomagem e limpeza combinadas de um tecido engomado contendo amido ou derivados de amido, durante a manufatura do tecido, processo este compreendendo incubar dito tecido engomado em uma solução de tratamento aquosa, tendo um pH na faixa entre 1 e 7, solução de tratamento aquosa esta compreendendo uma amilase ácida e pelo menos uma outra enzima ácida facilitando ditas outras etapas de processamento. A presente invenção refere-se ainda a composições usadas em ditos processos e ao uso de dita composição.



PI0713389-8

1

“PROCESSO PARA DESENGOMAGEM E LAVAGEM COMBINADAS
DE UM TECIDO ENGOMADO, E, COMPOSIÇÃO”
REFERÊNCIA A UMA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

5 Este pedido contém uma Listagem de Sequências em forma legível por computador. A forma legível por computador é incorporada aqui por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção refere-se a processos combinados de desengomagem e limpeza, empregando-se amilase ácida e outras enzimas, tais como celulase, pectinase, lipase, xilanase, protease etc., durante manufatura de novos tecidos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

15 O processamento de tecido, tal como material celulósico, em material pronto para manufatura de peças de roupas, envolve diversas etapas: fiação da fibra em um fio; construção de pano tecido ou entrelaçado do fio; e subseqüentes operações de preparação, tingimento e acabamento. O processo de preparação, que pode envolver desengomagem (para mercadorias tecidas), limpeza e branqueamento, produz um tecido adequado para tingimento ou acabamento.

20 O WO 2006/002034 (Novozymes) descreve um processo de desengomagem e limpeza simultâneas, compreendendo tratar o tecido com uma alfa-amilase alcalina e uma enzima de limpeza alcalina. As alfa-amilases alcalinas são usadas como auxiliares nos processos de desengomagem, para facilitar a remoção da goma contendo amido, que serviu como um
25 revestimento protetor dos fios durante a tecelagem.

Remoção completa do revestimento de goma após tecedura é importante para assegurar ótimos resultados nos processos subseqüentes em que o tecido é geralmente limpado, branquiado, tingido e/ou impresso.

Após a etapa de desengomagem, é com frequência desejável

incluir uma etapa de desmineralização, a fim de remover íons metálicos, tais como Mn^{2+} , Fe^{2+}/Fe^{3+} , Cu^{2+} etc., que – se presentes no tecido – podem resultar em um branqueamento desuniforme em uma etapa de processamento posterior ou poderiam mesmo produzir furos de alfinete no tecido
5 branqueado. A desmineralização é tipicamente realizada por precipitação de ácido e tipicamente envolve a adição de ácidos tais como ácido acético ou ácido sulfúrico.

Há necessidade de processos aperfeiçoados para desengomagem simultânea combinada com outras etapas de tratamento de
10 tecido, tais como desengomagem e limpeza combinadas, desengomagem e biopolimento combinados, desengomagem e abrasão combinadas e desengomagem e carbonização combinadas etc.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção é dirigida ao fornecimento de processos
15 de desengomagem de tecidos engomados durante manufatura de especialmente novos tecidos sob condições ácidas.

Em um aspecto, a presente invenção refere-se a um processo para desengomagem e outras etapas de tratamento de tecido combinadas de um tecido engomado contendo amido ou derivados de amido, durante a
20 manufatura de tecido, processo este compreendendo incubar dito tecido engomado em uma solução de tratamento aquosa, tendo um pH na faixa entre 1 e 7, preferivelmente entre 1 e 5, especialmente entre 1 e 4, solução de tratamento aquosa esta compreendendo uma amilase ácida e pelo menos uma outra enzima ácida facilitando dita(s) outra(s) etapa(s) de tratamento de
25 tecido.

Preferivelmente, ditas outras enzima(s) ácidas, facilitando dita(s) outra(s) etapa(s) de tratamento de tecido, é (são) celulase ácida, pectinase ácida, lipase ácida, xilanase ácida e/ou protease ácida. Mais preferivelmente, a(s) enzima(s) facilitando dita(s) outra(s) etapa(s) de

tratamento de tecido é (são) pectinase(s) ácida(s).

Preferivelmente, a amilase ácida é de origem bacteriana ou fúngica, tal como origem de fungo filamentoso.

Preferivelmente, a amilase ácida é derivada de uma cepa de
5 *Aspergillus*, preferivelmente *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*,
Aspergillus oryzae, ou *Aspergillus kawachii* {SEQ ID NO: 37) ou uma cepa
de *Rhizomucor*, preferivelmente *Rhizomucor pusillus*, ou uma cepa de
Meripilus, preferivelmente uma cepa de *Meripilus giganteus*. Mais
preferivelmente a amilase ácida de *Aspergillus* é a alfa-amilase ácida de
10 *Aspergillus niger* descrita na SEQ ID NO: 48, ou uma variante da mesma.

Preferivelmente, a amilase ácida bacteriana é derivada de uma
cepa do gênero *Bacillus*, preferivelmente derivada de uma cepa de *Bacillus*
sp., mais preferivelmente uma cepa de *Bacillus licheniformes*, *Bacillus*
amyloliquefaciens, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, ou *Bacillus*
15 *Sp.*, tal como *Bacillus Sp.* NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513, DSM
9375, DSMZ 12648, DSMZ 12649, KSM AP1378, KSM K36 ou KSM K38.

A alfa-amilase híbrida pode também ser usada na presente
invenção. Preferivelmente, a alfa-amilase híbrida poderia ser a amilase
consistindo de alfa-amilase de *Rhizomucor pusillus* com ligador de
20 glicoamilase de *Aspergillus niger* e SBD descritos como V039 na Tabela 5 do
Pedido Internacional co-pendente no. PCT/US 05/46725.

Preferivelmente, a alfa-amilase ácida está presente em uma
concentração de 1 – 3.000 AFAU/kg de tecido, preferivelmente 10 – 1.000
AFAU/kg de tecido, especialmente 100 – 500 AFAU/kg de tecido ou 1 –
25 3.000 AFAU/l solução de tratamento, preferivelmente 10 – 1.000 AFAU/l
solução de tratamento, especialmente 100 – 500 AFAU/l solução de
tratamento.

Preferivelmente, a alfa-amilase é a alfa-amilase híbrida
mostrada na SEQ ID NO: 48, compreendendo um domínio catalítico (CD) de

alfa-amilase de *Rhizomucor pusillus*, tendo um domínio de ligação de carboidrato (CBD) de *A. niger*.

Normalmente há três tipos de enzimas pécticas: pectesterase, enzimas despolimerizantes e protopectinase. Preferivelmente, dita pectinase
 5 ácida é uma liase de pectato ácida, uma liase de pectina ácida, uma poligalacturonase ácida e/ou uma poligalacturonato de liase ácida. Mais preferivelmente, a pectinase ácida é Pectinex BEE XXL, Pectinex Ultra; Pectinex Yield Mash, Pectinex XXL, Pectinex Smash XXI ou misturas dos mesmos.

10 Preferivelmente, a pectinase ácida é do gênero *Aspergillus*.

Preferivelmente, a pectinase ácida pode ser adicionada dentro da solução antes, simultânea ou após a adição de amilase ácida.

Preferivelmente, o processo é realizado em uma temperatura na faixa de 5 – 90°C, em particular 20 a 90°C. Mais preferivelmente, o
 15 processo é realizado em uma temperatura entre 25 e 60°C por um período de tempo adequado, preferivelmente entre 2 e 24 horas.

Preferivelmente, o tecido é feito de fibras de origem natural ou produzida pelo homem, tecido de algodão, denim (tecido de algodão resistente), linho, rami, viscose, liocel ou acetato de celulose.

20 Preferivelmente, o tecido é feito de fibras de origem animal, em particular seda ou lã.

Preferivelmente, o tecido é feito de fibras de poliéster produzidas pelo homem ou de origem natural, tais como poli(etileno tereftalato) ou poli(ácido láctico) ou fibras de náilon, acrílico ou poliuretano. O
 25 tecido preferivelmente é um tecido ou roupa contendo poliéster e consiste essencialmente de 100% de poliéster. O tecido de poliéster é uma mistura de poliéster, tal como uma mistura de poliéster e celulósico, incluindo misturas de poliéster e algodão; uma mistura de poliéster e algodão; uma mistura de poliéster e seda; uma mistura de poliéster e ácido acrílico; uma mistura de

poliéster e náilon; uma mistura de poliéster, náilon e poliuretano; uma mistura de poliéster e poliuretano, raiom (viscose), acetato de celulose e tencel.

Em outro aspecto, a presente invenção refere-se a uma composição compreendendo uma amilase ácida e uma enzima de lavagem de ácido. A amilase ácida é preferivelmente derivada de *Aspergillus niger* ou *Rhizomucor pusillus* ou misturas dos mesmos. A enzima de lavagem é preferivelmente selecionada do grupo consistindo de celulase ácida, pectinase ácida, lipase ácida, xilanase ácida e/ou protease ácida e misturas dos mesmos.

Preferivelmente, dita pectinase ácida é Pectinex® BE XXL, Pectinex® BE Colour, Pectinex® Ultra; Pectinex™ Ultra SP-L, Pectinex® Yield SVIash, Pectinex® XXL, Pectinex® Smash XXL, Pectinex® Smash e/ou Pectinex™ AR. Dita pectinase ácida é preferivelmente derivada de uma cepa de *Aspergillus*. A composição compreende ainda estabilizador, tensoativo, agente umectante, agentes dispersantes, agentes seqüestrantes e agentes emulsificantes, ou uma mistura dos mesmos.

No terceiro aspecto, a presente invenção refere-se ao uso da composição como descrita acima para desengomagem e lavagem simultâneas.

Verificou-se que, quando realizando um processo simultâneo de desengomagem e biolavagem da invenção, como definido nas reivindicações, nenhuma desmineralização é necessária. A desmineralização ocorre simultaneamente e/ou após a desengomagem e a biolavagem do tecido engomado na mesma solução de tratamento. Em comparação com processos tradicionais envolvendo uma etapa de desengomagem ácida e uma etapa de desmineralização, uma etapa de ajuste de pH é evitada. Outra vantagem da invenção é que o tempo do processo é economizado/reduzido, visto que a desengomagem, biolavagem e desmineralização podem ser realizadas simultaneamente. Mesmo se as desengomagem, biolavagem e desmineralização combinadas não forem realizadas como um processo de uma etapa, isto é, simultaneamente, os custos de, p. ex., ácidos e potencial

humano para adicionar ácido(s) são economizados/reduzidos, visto que a etapa de ajuste de pH entre a etapa de desengomagem ácida tradicional e a etapa de desmineralização é evitada. Em comparação com a desengomagem e biolavagem simultâneas sob condições alcalinas, desengomagem e biolavagem simultâneas sob condições ácidas podem remover a desmineralização ao tempo sem procedimento de desmineralização adicional.

No contexto da invenção, o termo “tratamento” significa a combinação de enzimas que proveem de processamento facilitado, tal como desengomagem e lavagem combinadas, desengomagem e biopolimento combinados, desengomagem e abrasão combinados; etc.

No contexto da invenção, o termo “biopolimento” é um tratamento específico da superfície do fio, que melhora a qualidade do tecido com respeito a manuseio e aparência, sem perda de umectabilidade do tecido. Os mais importantes efeitos do biopolimento podem ser caracterizados por menos cotão e formação de bolinhas, brilho/lustre aumentados, melhorado manuseio do tecido, aumentada maciez durável e melhorada absorbância de água.

No contexto da invenção, o termo “combinado” ou “combinação” significa que as etapas do processo combinadas ou a combinação são realizadas sequencial ou simultaneamente em um banho (isto é, mesma solução de tratamento). Em uma forma de realização preferida, o processo combinado ou a combinação é realizada simultaneamente em um banho (isto é, mesma solução de tratamento).

No contexto da invenção, o termo “tecido” é usado intercambiável com o termo “têxtil” e significa, ao contrário de tecido lavanderia “usado”, tecidos, roupas, fibras, fios ou outros tipos de tecidos processados recentemente manufaturados, preferivelmente não tingidos. Os tecidos podem ser construídos de fibras por tecelagem, entrelaçamento ou operações não-tecidas. A tecelagem e entrelaçamento requerem fio como o

consumo, enquanto que tecido não-tecido é o resultado de ligação aleatória de fibras (papel pode ser imaginado como não-tecido).

O pano tecido é construído por “enchimento” por tecelagem ou fios de trama entre fios de urdidura estirados na direção longitudinal do tear.

- 5 Os fios de urdidura devem ser engomados antes da tecelagem, a fim de lubrificá-los e protegê-los da abrasão na alta velocidade de inserção dos fios de enchimento durante a tecelagem. O fio de enchimento pode ser tecido através dos fios de urdidura em um modo “sobre um – sob o seguinte” (tecelagem simples) ou por “sobre um – sob dois” (sarja) ou qualquer outra
- 10 miríade de permutações. A resistência, textura e padrão são relacionados não somente com o tipo/qualidade do fio, ms também com o tipo de trama. Geralmente, vestidos, camisas, calças, lençóis, toalhas, cortinas etc. são produzidos de pano não tecido.

- O entrelaçamento é a formação de um tecido pela união entre
- 15 si de laços de fio intertravantes. O oposto de tecelagem, que é construída de dois tipos de fio e tem muitas “extremidades”, ela é produzida de um único cordão contínuo de fios. Como com a tecelagem, há muitas diferentes maneiras de laçar o fio entre si e as propriedades finais do tecido são dependentes tanto do fio como do tipo de tricô. Roupas de baixo, suéteres,
- 20 meias, camisas esportivas, camisetas etc. são derivadas de tecidos entrelaçados.

- Os panos não-tecidos são folhas de tecido produzidas por ligação e/ou intertravamento de fibras e filamentos por processos mecânicos, térmicos, químicos ou mediados por solventes. O tecido resultante pode ser na
- 25 forma de estruturas semelhantes a folha contínua, laminados ou películas. Exemplos típicos são fraldas de bebê, toalhas, esfregões, roupões cirúrgicos, fibras para a moda “amigavelmente ambiental”, meios de filtro, roupas de cama, materiais de telhado, suporte para tecidos bidimensionais e muitos outros.

De acordo com a invenção, o processo pode ser aplicado a qualquer tecido engomado conhecido na técnica (tecido, entrelaçado ou não-tecido). O processo é aplicado a tecido engomado recentemente manufaturado, o oposto a usado e/ou tecido sujo a ser limpo durante a lavagem de roupa. Em uma forma de realização, o tecido é feito de fibras de origem natural e/ou produzidas pelo homem. Em outra forma de realização, o tecido é feito de fibras de origem animal. Em particular, o processo da invenção pode ser aplicado a tecidos contendo celulose ou celulósicos, tais como algodão, viscose, raio, rami, linho, acetato de celulose, denim, liocel (TencelTM, p. ex., produzido por Courtaulds Fibers) ou misturas dos mesmos, ou misturas de qualquer uma destas fibras junto com fibras sintéticas (p. ex., poliéster, poliamida, acrílico ou poliuretano, náilon, poli(etileno tereftalato) ou poli(ácido láctico) ou outras fibras naturais, tais como lã e seda, tais como misturas de viscose e algodão, misturas de liocel/algodão. Misturas de viscose/lã, misturas de liocel/lã, misturas de algodão/lã; flax (linho), rami e outros tecidos baseados em fibras de celulose, incluindo todas as misturas de fibras celulósicas com outras fibras, tais como lã, poliamida, fibras acrílicas e de poliéster, p. ex., misturas de viscose/algodão/poliéster, misturas de lã/algodão/poliéster, misturas de lã /algodão /poliéster, fibras acrílica e de poliéster, p. ex., misturas de viscose/algodão/poliéster, misturas de lã/algodão/poliéster, misturas de linho/algodão etc. O processo pode também ser usado em tecido sintético, p. ex., consistindo de essencialmente 100% de poliéster, poliamida, náilon, respectivamente. O termo “lã” significa qualquer produto de cabelo animal comercialmente útil, por exemplo, lã de carneiro, camelo, coelho, cabra, lama e conhecido como lã de merino, lã Shetland, lã cashmere, lã de alpaca, pelo de cabra angorá etc. e inclui fibra de lã e cabelo de animal. O processo da invenção pode ser usado com lã ou material de cabelo animal na forma de tecido de topo, fibra, fio ou tecido ou entrelaçado.

A alfa-amilase usada de acordo com o processo da invenção

pode ser qualquer alfa-amilase ácida, porém é preferivelmente de origem bacteriana ou fúngica.

Preferivelmente, a alfa-amilase ácida é derivada de um fungo filamentoso, especialmente uma cepa de *Aspergillus*, *Rhizomucor* ou
5 *Meripillus*.

A expressão “alfa-amilase ácida” significa uma alfa-amilase (E.C. 3.2.1.1), que tem uma atividade ótima em um pH na faixa de 1 a 7, preferivelmente de 1 a 5, em uma temperatura de 50°C.

O termo “desengomagem” é para ser entendido de uma
10 maneira convencional, isto é, a degradação e/ou remoção dos agentes de engomagem do tecido, tais como fios de urdidura em um pano tecido.

A expressão “tecido contendo amido ou derivados de amida” é para indicar qualquer tipo de tecido, em particular tecido não tecido, preparado de um material contendo celulose, contendo amido ou derivados da
15 amido. O tecido é normalmente destingido e feito de algodão, viscose, flax e similares. A parte principal do amido ou derivados de amido presentes no tecido é normalmente goma com que os fios, normalmente fios de urdidura, foram revestidos antes da tecedura.

A expressão “módulo de ligação de carboidrato (CBM)” ou
20 como referido com freqüência como um “domínio de ligação de carboidrato (CBD)”, é uma sequência de amino ácido de polipeptídeo, que se liga preferencialmente a um poli ou oligossacarídeo (carboidrato), freqüentemente – porém não necessariamente exclusivamente – a uma sua forma insolúvel em água (incluindo cristalina).

25 Mesmo se não especificamente mencionado com relação ao processo da invenção, deve ser entendido que a(s) enzima(s) ou agente(s) é/são usados em uma “quantidade eficaz”. A expressão “quantidade eficaz” significa uma quantidade de, p. ex., alfa-amilase que é capaz de prover o desejado efeito, isto é, desengomagem do tecido, em comparação com um

tecido que não foi tratado com dita(s) enzima(s).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5 A presente invenção é direcionada ao fornecimento de um processo de desengomagem de um tecido engomado durante a manufatura de tecidos especialmente novos.

10 A etapa de desengomagem da invenção é em uma forma de realização preferida, seguida por uma etapa de lavagem, preferível uma etapa de lavagem enzimática, preferivelmente com uma enzima de lavagem, tal como pectinase, p. ex., uma pectato liase, uma lipase, uma protease, ou
15 combinação delas, e uma etapa de branqueamento, preferivelmente envolvendo branqueamento com peróxido de hidrogênio e/ou um agente gerador de peróxido de hidrogênio. Processos de limpeza pertinentes são descritos na Patente U.S. No. 5.578.489, Patente U.S. No. 5.912.407 e Patente U.S. No. 6.630.342. Processos de branqueamento pertinentes são descritos na
20 Patente U.S. No. 5.851.233, Patente U.S. No. 5.752.980 e Patente U.S. No. 5.928.380. Processos de limpeza e branqueamento combinados são descritos no 2003/002810 (Novozymes) e WO 2003/002705 (Novozymes). De acordo com a presente invenção, o tecido pode ser desengomado e desmineralizado simultaneamente na mesma solução de tratamento aquosa (isto é, um banho)
25 ou subseqüentemente na mesma ou duas soluções de tratamento separadas (isto é, um ou dois banhos). Em uma forma de realização preferida, a desengomagem e desmineralização são realizadas simultaneamente na mesma solução de tratamento (isto é, um banho). O processo da invenção pode ser realizado usando-se equipamento de engomagem/desengomagem, p. ex., sistemas de almofada, caixas-J, jatos, sacudidores etc. Em geral, não é necessário equipamento de processamento adicional.

De acordo com a invenção, desengomagem e desmineralização simultâneas são realizadas incubando-se tecido engomado em uma solução de tratamento aquosa tendo um pH na faixa entre 1 e 7, solução de tratamento

aquosa esta compreendendo uma alfa-amilase ácida. Em uma forma de realização preferida, o pH durante a incubação é na faixa entre 1 e 4, especialmente entre pH 2 e 4.

Os artigos tecidos são a forma predominante de construção de tecidos. O processo de tecedura exige uma “engomagem” do fio de urdidura para protegê-lo da abrasão. Amidos, não modificados e modificados, polivinil álcool (PVA), carbóxi metil celulose (CMC), ceras e aglutinantes acrílicos e misturas dos mesmos são exemplos de agentes de engomagem tipicamente usados. O agente de engomagem pode, de acordo com a presente invenção, ser um agente de engomagem baseado em amido ou baseado em derivado de amido, porém pode também conter um ou mais agentes de engomagem baseado em não-amido ou baseados em derivados de amido. O(s) agente(s) de engomagem são em geral removidos após o processo de tecedura como a primeira etapa de preparação dos artigos tecidos.

Um ou mais de outros agentes incluindo estabilizantes, tensoativos, agentes umectantes, agente dispersante, agentes seqüestrantes e agentes emulsificantes, ou misturas dos mesmos, podem estar presentes durante um processo de desengomagem da invenção. O tecido engomado é permitido incubar na solução de tratamento aquosa por um período de tempo suficientemente longo para realizar a desengomagem do tecido engomado. O período ótimo é dependente do tipo de regime de processamento e da temperatura e pode variar de cerca de 15 minutos a diversos dias, p. ex., 48 horas. Um processo da invenção é preferivelmente realizado em uma temperatura na faixa de 5 a 90°C, em particular de 20 a 90°C, dependente do regime de processamento.

O regime de processamento pode ser em batelada ou contínuo, com o tecido sendo contatado pela corrente de tratamento aquosa em forma de largura aberta ou de corda.

Operações contínuas podem utilizar um saturador, por meio do

que uma largura igual aproximada de solução de tratamento por peso de tecido é aplicada ao tecido, seguido por uma câmara de residência aquecida, onde a reação química ocorre. Uma seção de lavagem então prepara o tecido para a próxima etapa de processamento. A fim de assegurar uma elevada
 5 brancura ou uma boa umectabilidade e resultante tingibilidade, a(s) enzima(s) de desengomagem e outros agentes devem ser totalmente removidas.

Os processos de batelada podem ocorrer em um banho (solução de tratamento), por meio do que o tecido é contatado com, p. ex., aproximadamente 8 – 15 vezes seu peso de solução de tratamento aquosa.

10 Após um período de incubação, a solução de tratamento aquosa é drenada, o tecido é enxaguado e a próxima etapa de processamento é iniciada. Processos-PB descontínuos (isto é, processos de Batelada Tampão) envolvem um saturador, por meio do qual um peso igual aproximado de solução de tratamento aquosa por peso de tecido é aplicado ao tecido, seguido por um
 15 período de permanência, que no caso do processo-CPB (isto é, processo de Batelada Tampão frio) poderia ser um ou mais dias. Por exemplo, um processo CPB pode ser realizado entre 20 – 40°C por 8 – 24 h ou mais em um pH na faixa de entre 1 e 7, preferivelmente em um pH na faixa entre 1 e 4, especialmente entre pH 2 e 4. Além disso, um processo-PB pode ser realizado
 20 entre 40 – 90°C por 1 – 6 horas em um pH na faixa entre em torno de 1 e 7, preferivelmente entre em torno de 1 e 5, mais preferivelmente entre 1 e 4, especialmente entre pH 2 e 4.

Em uma forma de realização, o processo de desengomagem da invenção pode ser realizado usando-se uma quantidade eficaz de alfa-amilase, preferivelmente alfa-amilase ácida e um ácido tal como ácido acético ou ácido
 25 sulfúrico ou similar.

Enzimas

Alfa-amilases

As alfa-amilase(s) usadas no processo da invenção pode ser

qualquer alfa-amilase, preferivelmente de origem bacteriana ou fúngica. Em uma forma de realização preferida a alfa-amilase é uma alfa-amilase ácida ou alfa-amilase híbrida descrita no WO 2005/003311, que é por este meio incorporado aqui por referência.

5 Em uma forma de realização preferida, a alfa-amilase inclui um módulo de ligação de carboidrato (CBM) como definido no WO 2005/003311, preferivelmente uma família 20 CBM como definido no WO 2005/003311.

10 Especificamente contemplados são os CMBs, incluídos os selecionados do grupo consistindo de *Aspergillus kawachii* descritos na SEQ ID NO: 2; *Bacillus flavothermus* descrito na SEQ ID NO: 5; *Bacillus* sp descrito na SEQ ID NO: 6; *Alcaliphilic Bacillus* descrito na SEQ ID NO: 7; *Hormoconis resinae* descrito na SEQ ID NO: 8; *Lentinula edodes* descrito na SEQ ID NO: 9; *Neurospora crassa* descrito na SEQ ID NO: 10; *Talaromyces*
15 *byssochlamydiodes* descrito na SEQ ID NO: 11 ; *Geosmithia cylindrospora* descrito na SEQ ID NO. 12; *Scorias spodiota* descrito na SEQ ID NO: 13, *Eupenicillium ludwigii* descrito na SEQ ID NO: 14; *Aspergillus japonicus* descrito na SEQ ID NO. 15; *Penicillium* cf. *miczynskii* descrito na SEQ ID NO: 16; Mz 1 *Penicillium* sp, descrito na SEQ ID NO: 17; *Thysanospore* sp.
20 disclosed na SEQ ID NO: 18; *Humicola grisea* var *thermoidea* descrito na SEQ ID NO: 19; *Aspergillus niger* descrito na SEQ ID NO: 20; ou *Althea rolfsii* descrito na SEQ ID NO: 21.

Alfa-amilases Fúngicas

25 Em uma forma de realização, a alfa-amilase fúngica é de origem fúngica de levedura ou filamentosa. Em uma forma de realização preferida, a alfa-amilase fúngica é uma alfa-amilase ácida.

As alfa-amilases preferidas incluem, por exemplo, alfa-amilases obteníveis de *Aspergillus* species, em particular de *Aspergillus niger*, *A. oryzae* e *A. awamori*, *A. kawachii*, tal como a alfa-amilase ácida

descrita como SWISSPROT P56271, ou descrita mais detalhadamente no WO 89/01969 (Exemplo 3). A alfa-amilase ácida madura tem a sequência de amino ácido mostrada como 22-511 da SEQ ID NO: 4, codificada pela sequência de DNA mostrada na SEQ ID NO: 3 ou a sequência de amino ácido mostrada na SEQ ID NO: 38. Também preferidas são as seqüências de alfa-amilase tendo mais do que 50%, tal como mais do que 60%, mais do que 70%, mais do que 80% ou mais do que 90%, mais do que 95%, mais do que 96%, mais do que 97%, mais do que 98% ou mesmo mais do que 99% de identidade com a sequência de amino ácido mostrada na SEQ ID NOS: 4 ou 38, respectivamente.

Em outra forma de realização preferida, a sequência de alfa-amilase é derivada de uma alfa-amilase ácida de *A. oryzae*. Mais preferivelmente, a sequência de alfa-amilase tem mais do que 50%, tal como mais do que 60%, mais do que 70%, mais do que 80% ou mais do que 90%, mais do que 95%, mais do que 96%, mais do que 97%, mais do que 98%, ou mesmo mais do que 99% de identidade com a sequência de amino ácido mostrada na SEQ ID NO: 4 ou 38, respectivamente.

Em outra forma de realização preferida, a sequência de alfa-amilase é derivada de uma alfa-amilase ácida de *A. oryzae*. Mais preferivelmente, a sequência de alfa-amilase tem mais do que 50%, tal como mais do que 60%, mais do que 70%, mais do que 80% ou mais do que 90%, mais do que 95%, mais do que 96%, mais do que 97%, mais do que 98%, ou mais do que 99% de identidade com a seqüência amino ácida mostrada na SEQ ID NO: 39.

Em uma forma de realização, a alfa-amilase é a alfa-amilase de *Aspergillus kawachii* descrita na SEQ ID NO: 37, que na forma de tipo selvagem contém um domínio de ligação de carboidrato (CBD) também mostrado na SEQ ID NO: 2.

Em uma forma de realização preferida, a alfa-amilase é uma

alfa-amilase tendo mais do que 50%, tal como mais do que 60%, mais do que 70%, mais do que 80% ou mais do que 90%, mais do que 95%, mais do que 96%, mais do que 97%, mais do que 98%, ou mesmo mais do que 99% de identidade com a seqüência amino ácida mostrada nas SEQ ID NOS: 43, 44, 46 ou 47, respectivamente.

A alfa-amilase pode estar presente em uma concentração de 1-3.000 AFAU/kg de tecido, preferivelmente 10-1.000 AFAU/kg de tecido, especialmente 100-500 AFAU/kg de tecido ou 1-3.000 AFAU/L solução de tratamento, preferivelmente 10-1.000 AFAU/L solução de tratamento, especialmente 100-500 AFAU/L solução de tratamento.

Alfa-amilases Bacterianas

Em uma forma de realização a alfa-amilase é de origem bacteriana. Em uma forma de realização preferida a alfa-amilase bacteriana é uma alfa-amilase ácida.

A alfa-amilase bacteriana é preferivelmente derivada de uma cepa de *Bacillus*, tal como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, ou outros *Bacillus* sp, tal como *Bacillus* sp. NCIB 12289, NCIB 12512 (WO 95/26397), NCIB 12513 (WO 95/26397), DSM 9375 (WO 95/26397), DSMZ 12648 (WO 00/60060), DSMZ 12649 (WO 00/80060), KSM AP 1378 (WO 97/00324), KSM K36 ou KSM K38 (EP 1.022.334). Preferidos são as alfa-amilases do *Bacillus* sp. descritas em WO 95/26397 como SEQ ID NOS. 1 e 2, respectivamente, a alfa-amilase AA560 descrita como SEQ ID NO: 2 no WO 00/60060 (i.e., SEQ ID NO: 40 aqui), e a alfa-amilase #707 descrita por Tsukamoto et al., em Biochemical and Biophysical Research Communications, 151, pp. 25-31 (1988).

Em uma forma de realização da invenção a alfa-amilase bacteriana é a alfa-amilase SP722 descrita como SEQ ID NO: 2 no WO 95/26397 ou a alfa-amilase AA560 (SEQ ID NO: 40 aqui).

Em uma forma de realização preferida, a alfa-amilase precursora tem uma ou mais deleções nas posições ou correspondendo às seguintes posições: D183 e G184, preferivelmente em que dita variante de alfa-amilase tem ainda uma substituição na posição ou correspondendo à
5 posição N195F (usando-se a numeração da SEQ ID NO: 40).

Em outra forma de realização preferida, a alfa-amilase precursora tem uma ou mais das seguintes deleções/substituições ou correspondendo às seguintes deleções/substituições:

Delta (R81-G182); Delta (D183-G184); Delta (D183-
10 G184)+N195F; R181Q+N445Q+K446N; Delta (D183-G184)+R181Q, Delta (D183-G184) e uma ou mais das seguintes substituições ou correspondendo a: R118K, N195F, R320K, R458K, especialmente em que a variante tem as seguintes mutações: $\Delta(D183+G184)+R118K+N196F+R320K+R458K$ (empregando-se a numeração de SEQ ID NO: 40).

15 Em outra forma de realização preferida, a alfa-amilase é a alfa-amilase AA560 mostrada na SEQ ID NO: 40, compreendendo ainda uma ou mais das seguintes substituições M9L, M202L, V214T, M323T, M382Y, E345R ou a alfa-amilase A560 com todas as seguintes substituições: M9L, M202L, V214T, M323T, M382Y ou M9L, M202L, V214T, M323T e E345R.

20 Produtos de alfa-amilase comercialmente disponíveis ou produtos compreendendo alfa-amilases incluem produto vendido sob os seguintes nomes comerciais: NATALASE™, STAINZYME™ (Novozymes A/S), Bioamylase - D(G), BiOAMYLASE™ L (Biocon Índia Ltd.), KEIMZYME™ AT 9000 (Biozym Ges. m.b.H. Áustria). PURASTAR™ ST,
25 PURASTAR™ HPAmL, PURAFECT™ OxAm, RAPIDASE™ TEX (Genencor Int. Inc. USA), KAM (Kao, Japan).

A alfa-amilase pode estar presente em uma concentração de de cerca de 0.05-150 KNU/L solução de tratamento, preferivelmente 1-100 KNU/L solução de tratamento, especialmente 2-20 KNU/L solução de

tratamento ou 0.05-150 KNU/Kg de tecido, preferivelmente, 1-100 KNU/kg de tecido, especialmente 2-20 KNU/kg de tecido.

Enzima Híbrida

A alfa-amilase pode ser em uma forma de realização preferida
 5 uma alfa-amilase compreendendo um domínio de ligação de carboidrato (CBD). Tal alfa-amilase com um CBD pode ser uma enzima tipo selvagem (vide, p. ex., *Aspergillus kawachii* acima) ou uma enzima híbrida (proteína de fusão) como será ainda descrito abaixo. As enzimas híbridas ou uma enzima
 10 tipo selvagem geneticamente modificada como referida aqui incluem espécies compreendendo uma sequência de amino ácido de uma enzima de alfa-amilase (EC 3.2.1.1) ligada (isto é, covalentemente ligada) a uma sequência de amino ácido compreendendo um domínio de ligação de carboidrato (CBD).

As enzimas híbridas contendo CBD, bem como descrições
 15 detalhadas da preparação e sua purificação, são conhecidas na técnica [vide, p. ex., WO 90/00609, WO 94/241158 e WO 95/16782, bem como Greenwood e al., *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 44: 1295 – 1305]. Elas podem, p. ex., ser preparadas por transformação em uma célula hospedeira uma construção de DNA compreendendo pelo menos um fragmento de DNA
 20 codificando o domínio de ligação de carboidrato ligado, com ou sem um ligador, a uma sequência de DNA codificando a enzima de interesse e cultivando-se a célula hospedeira transformada para expressar o gene fundido. O produto recombinante resultante (enzima híbrida) – com frequência referida na técnica como uma “proteína de fusão” – pode ser descrita pela seguinte
 25 fórmula geral:

A-CBD-MR-X

Na última fórmula, A-CBD pe o terminal-N ou a região do terminal-C de uma sequência de amino ácido compreendendo pelo menos o domínio de ligação de carboidrato (CBD) sozinho. MR é a região

intermediária (o “ligador”) e X é a sequência dos resíduos amino ácidos de um polipeptídeo codificado por uma sequência de DNA codificando a enzima (ou outra proteína) a que o CBD é para ser ligado.

O componente A pode estar ausente (de modo que A-CBD é um CBD sozinho, isto é, não compreende resíduos amino ácidos que não aqueles constituindo o CBD) ou pode ser uma sequência de um ou mais resíduos amino ácidos (funcionando como uma extensão terminal do CBD sozinho). O ligador (MR) pode ser uma ligação ou um curto grupo de ligação compreendendo de cerca de 2 a cerca de 100 átomos de carbono, em particular de 2 a 40 átomos de carbono. Entretanto, MR é preferivelmente uma sequência de cerca de 2 a cerca de 100 resíduos amino ácidos, mais preferivelmente de 2 a 40 resíduos amino ácidos, tais como de 2 a 15 resíduos amino ácidos.

O componente X pode constituir a região de terminal-N ou terminal-C da enzima híbrida total.

Será assim evidente pelo acima que o CBD de uma enzima híbrida do tipo em questão pode ser posicionado terminalmente-C, terminalmente-N ou internamente na enzima híbrida.

Sequência do Ligador

A sequência do ligador pode ser qualquer sequência de ligador adequada. Nas formas de realização preferidas, a sequência de ligador é derivada da *Athelia rolfsii* glicoamilase, da *A. niger* glicoamilase, da *A. kawachii* alfa-amilase tal como uma sequência de ligador selecionada do grupo consistindo do ligador de *A. niger* glicoamilase: TGGTTTTATPTGSGSVTSTSKTTATASKTSTSTSSTA (SEQ ID NO: 22), ligador da *A. kawachii* alfa-amilase: T T T T T T A A A T S T S K A T T S S S S S A A A T T S S S (SEQ ID NO: 23), ligador da *Athelia rolfsii* glicoamilase: G A T S P G G S S G S (SEQ ID NO: 24), e the PEPT linker: P E P T P E P T (SEQ ID NO: 25). Em outra forma de realização preferida, as

enzimas híbridas têm uma sequência de ligador que difere das seqüências amino ácidas mostradas na SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, ou SEQ ID NO: 25 em não mais do que 10 posições, não mais do que 9 posições, não mais do que 8 posições, não mais do que 7 posições, não mais do que 6 posições, não mais do que 5 posições, não mais do que 4 posições, não mais do que 3 posições, não mais do que 2 posições, ou mesmo não mais do que 1 posição.

Domínio de ligação de carboidrato

Um domínio de ligação de carboidrato (CBD) ou, como com frequência referido, um módulo de ligação de carboidrato (CBM), é uma sequência de amino ácido de polipeptídeo, que se liga preferencialmente a um poli ou oligossacarídeo (carboidrato), freqüentemente – mas não necessariamente exclusivamente – a uma sua forma insolúvel em água (incluindo cristalina).

Os CDBs derivados de enzimas de degradação de amido são com frequência referidos como domínios de ligação de amido (SBD) ou módulos de ligação de amido (SBM). Os SBDs são CDBs que podem ocorrer em certas enzimas amilolíticas, tais como certas glicoamilases ou em enzimas tais como ciclodextrina glicanotransferases ou em alfa-amilases. Igualmente, outras sub-classes de CBDs abrangeriam, p. ex., domínios de ligação de celulose (CBDs de enzimas celulolíticas), domínios de ligação de quitina (CBDs que tipicamente ocorrem em quitinases), domínios de ligação de xilano (CDBs que tipicamente ocorrem em xilanases), domínios de ligação de manano (CDBs que tipicamente ocorrem em mananases).

Os CDBs são encontrados como partes integrais de grandes polipeptídeos ou proteínas consistindo de duas ou mais regiões de sequência de amino ácido de polipeptídeo, especialmente em enzimas hidrolíticas (hidrolases), que tipicamente compreendem um domínio catalítico contendo o sítio ativo para hidrólise de substrato e um domínio de ligação de carboidrato

(CDB) para ligar-se ao substrato de carboidrato em questão. Tais enzimas podem compreender mais do que um domínio catalítico e um, dois ou três CDBs e, opcionalmente, compreendem ainda uma ou mais regiões de sequência de amino ácido de polipeptídeo ligando os CBD(s) com o(s) domínio(s) catalítico(s), uma região do último tipo sendo indicada como um “ligador”. Exemplos de enzimas hidrolíticas compreendendo um CBD – alguns dos quais já foram mencionados acima – são celulasas, xilanases, mananases, arabinofuranosidases, acetilesterases e quitinases. Os CDBs foram também encontrados em algas, p. ex., na alga vermelha *Porphyra purpurea* na forma de uma proteína de ligação de polissacarídeo não-hidrolítica.

Nas proteínas/polipeptídeos em que os CDBs ocorrem (p. ex., enzimas, tipicamente enzimas hidrolíticas) um CBD pode ser localizado no término N ou C ou em uma posição interna.

Essa parte de um polipeptídeo ou proteína (p. ex., enzima hidrolítica) que constitui um CBD por si tipicamente consiste de mais do que certa de 30 e menos do que cerca de 250 resíduos amino ácidos.

O “Módulo de Ligação de Carboidrato da Família 20” ou um módulo de CBM-20 é no contexto da invenção definido como uma sequência de aproximadamente 100 amino ácidos tendo pelo menos 45% de homologia com o Módulo de Ligação de Carboidrato (CBM) do polipeptídeo descrito na figura 1 por Joergensen e al. (1997) em *Biotechnol. Lett.* 19: 1027 – 1031. O CBM compreende os últimos 102 amino ácidos do polipeptídeo, isto é, a subsequência de amino ácido 582 ao amino ácido 683. A numeração das Famílias da Glicosídeo Hidrolase aplicada nesta descrição segue a concepção de Coutinho, PM, & Henrissat B. (1999) CAZy - Carbohydrate-Active Enzymes server at URL; <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html> ou, alternativamente, Coutinho, P.M. & Henrissat, B. 1999; The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes; an integrated database approach. Em "Genetics, Biochemistry e Ecology of Cellulose

Degradation", K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita e T. Kimura eds., Uni Publishers Co., Tokyo, pp. 15 - 23, e Bourne, Y, & Henrissat B. 2001; Glycoside hydrolases and glycosyltransferases; families e functional modules, Current Opinion in Structural Biology 11:593-600.

5 Exemplos de enzimas que compreendem um CBD adequado para uso no contexto da invenção são alfa-amilases, alfa-amilases maltogênicas, celulasas, xilanases, mananases, arabinofuranosidades, acetilesterases e quitinases. Outros CBDs de interesse em relação à presente invenção incluem CDBs derivados de glicoamilases (EC 3.2.1.3) ou de
10 CGTases (EC 2.4.1.19).

Os CDBs derivados de fontes fúngicas, bacterianas ou vegetais geralmente serão adequados para uso no contexto da invenção. Preferidos são CBDs de origem fúngica, mais preferivelmente de *Aspergillus* sp, *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp. ou *Rhizopus* sp. Com relação a isto, técnicas adequadas
15 para isolar os genes pertinentes são bem conhecidas na técnica.

Preferidos para a invenção são os CBDs da Família de Módulo de Ligação de Carboidrato 20. CBDs da Família de Módulo de Ligação de Carboidrato 20 adequados para a invenção podem ser derivados de glicoamilases de *Aspergillus awamori* (SWISSPROT Q12537), *Aspergillus*
20 *kawachii* (SWISSPROT P23176), *Aspergillus niger* (SWISSPROT P04064), *Aspergillus oryzae* (SWISSPROT P36914), de alfa-amilases de *Aspergillus kawachii* (EMBL:#AB008370), *Aspergillus nidulans* (NCBI AAF17100.1), de beta-amilases do *Bacillus cereus* (SWISSPROT P36924), ou de CGTases de *Bacillus circulans* (SWISSPROT P43379). Preferido é um CBD da alfa-
25 amilase de *Aspergillus kawachii* (EMBL:#AB008370) bem como os CBDs tendo pelo menos 50%, 80%, 70%. 80% ou mesmo pelo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com o CBD de uma alfa-amilase de *Aspergillus kawachii* (EMBL:#A8008370), isto é, um CBD tendo pelo menos 50%, 60%, 70%, 80% ou mesmo pelo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou

99% de identidade com a sequência de amino ácido da SEQ ID NO: 2. Também preferidos para a invenção são os CBDs da Família do Módulo de Ligação de Carboidrato 20, tendo as sequências amino ácidas mostradas na SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8 e SEQ ID NO: 7 e descritos no pedido PCT no. PCT/DK2004/000458 (ou pedido de patente dinamarquesa PA 2003 00949) como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3 respectivamente. Outros CBDs preferidos incluem os CBDs da glicoamilase de *Hormoconis* sp, tais como de *Hormoconis resinae* (sin. fungo *Creosoto* ou *Amorphotheca resinae*), tal como o CBD de SWISSPROT:Q03045: (SEQ ID NO: 8), de *Lentinula* sp. tal como de *Lentinula edodes* (cogumelo shiitake) tal como o CBD of SPTREMBL:Q9P4C5 (SEQ ID NO: 9), de *Neurospora* sp. tal como de *Neurospora crassa* tal como o CBD de SWISSPROT:P14804 (SEQ ID NO: 10) de *Talaromyces* sp, tal como de *Talaromyces byssochlamyodioides*, tal como o CBD de NN005220 (SEQ ID NO: 11), de *Geosmithia* sp, tal como de *Geosmithia cylindrospora*, tal como o CBD of NN48286 (SEQ ID NO: 12), de *Scorias* sp, tal como de *Scorias spongiosa*, tal como o CBD de NN007096 (SEQ ID NO: 13), de *Eupenicillium* sp, tal como de *Eupenicillium ludwigii*, tal como o CBD de NN005968 (SEQ ID NO: 14), de *Aspergillus* sp. tal como de *Aspergillus japonicus* tal como the CBD de NN001136 (SEQ ID NO: 15), de *Penicillium* sp, tal como de *Penicillium cf. miczynskii* tal como o CBD de NN48891 (SEQ ID NO: 16), de Mz1 *Penicillium* sp. tal como o CBD de NN48690 (SEQ ID NO: 17), de *Thysanophora* sp. tal como o CBD de NN48711 (SEQ ID NO: 18), e de *Humicola* sp. tal como de *Humicola grisea* var .*thermoidea* tal como o CBD de SPTREMBL: Q12623 (SEQ ID NO: 19). CBDs muitíssimo preferidos incluem os CBDs da glicoamilase de *Aspergillus* sp. tal como de *Aspergillus niger*, tal como SEQ ID NO: 20, e *Athelia* sp. tal como de *Athelia rolfsii*, tal como SEQ ID NO: 21. Também preferidos de acordo com a invenção são qualquer CBD tendo pelo menos 50%, 60%, 70%, 80% ou mesmo pelo

menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade com qualquer uma das sequências amino ácidas de CBD antes mencionadas.

Além disso, os CDBs da Família do Módulo de Ligação de Carboidrato 20 podem ser encontrados em URL: [http://afmb.cnrs-](http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html)
 5 [mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html](http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html).

Uma vez uma sequência de nucleotídeo codificando a região de ligação do substrato (ligação de carboidrato) tenha sido identificada, como cDNA ou DNA cromossomal, ela pode ser manipulada em uma variedade de maneiras para fundi-la a uma sequência de DNA codificando a enzima de
 10 interesse. O fragmento de DNA codificando a sequência de amino ácido de ligação de carboidrato e o DNA codificando a enzima de interesse são então ligados com ou sem um ligador. O DNA ligado resultante pode então ser manipulado em uma variedade de maneiras, para obter-se expressão.

Em uma forma de realização, a alfa-amilase compreendida no
 15 híbrido é uma alfa-amilase descrita acima na seção “Alfa-amilase”. Em uma forma de realização preferida, a alfa-amilase é de origem fúngica. Em uma forma de realização mais preferida, a alfa-amilase é uma alfa-amilase ácida.

Em uma forma de realização preferida, o domínio de ligação de carboidrato e/ou sequência de ligador é de origem fúngica. O domínio de
 20 ligação de carboidrato pode ser derivado de uma alfa-amilase, porém pode também ser derivado de uma proteína, p. ex., enzimas tendo atividade de glicoamilase.

Em uma forma de realização a alfa-amilase é derivada de uma cepa de *Aspergillus*, ou *Athelia*. Em uma forma de realização, a alfa-amilase é
 25 derivada de uma cepa de *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus niger*. Em uma forma de realização específica, a alfa-amilase é a alfa-amilase ácida de *A. oryzae* descrita na SEQ ID NO: 39. Em uma forma de realização específica, a sequência de ligador pode ser derivada de uma cepa de *Aspergillus*, tal como a alfa-amilase de *A. kawachii* (SEQ ID NO: 23) ou a glicoamilase de *A.*

rolfsii (SEQ ID NO: 24). Em uma forma de realização, o CBD é derivado de uma cepa de *Aspergillus* ou *Athelia*. Em uma forma de realização específica, o CBD é a alfa-amilase de *A. kawachii* mostrada na SEQ ID NO: 1 ou a glicoamilase de *A. rolfsii* mostrada na SEQ ID NO: 21.

5 Preferida é a forma de realização em que a enzima híbrida compreende uma sequência de alfa-amilase derivada do domínio catalítico da alfa-amilase ácida de *A. niger*, tendo a sequência mostrada na SEQ ID NO: 38 e/ou uma seqüência de ligador derivada da alfa-amilase de *A. kawachii*, mostrada na SEQ ID NO: 23 ou da glicoamilase de *A. rolfsii* mostrada na
10 SEQ ID NO: 24 e/ou o CBD é deriado da alfa-amilase de *A. kawachii* mostrada na SEQ ID NO: 2, da glicoamilase de *A. rolfsii* mostrada na sequência SEQ ID NO: 21 ou da glicoamilase de *A. niger* mostrada na SEQ ID NO: 22.

Em uma forma de realização preferida, a enzima híbrida
15 compreende o domínio catalítico da alfa-amilase ácida de *A. niger*, tendo a sequência mostrada na SEQ ID NO: 38, o ligador de alfa-amilase de *A. kawachii* mostrado na SEQ ID NO: 23 e o CBD da alfa-amilase de *A. kawachii* mostrado na SEQ ID NO: 2.

Em uma forma de realização específica, a enzima híbrida é a
20 parte madura da sequência de amino ácido mostrada na SEQ ID NO: 28 (domínio catalítico da alfa-amilase ácida de *A. niger*-ligador de alfa-amilase de *A. kawachii*-CBD da glicoamilase de *A. niger*), SEQ ID NO: 30 (domínio catalítico da alfa-amilase ácida de *A. niger*-ligador de alfa-amilase de *A. kawachii*-CBD da glicoamilase de *A. rolfsii*) ou SEQ ID NO: 32 (domínio
25 catalítico da alfa-amilase ácida de *A. oryzae*-ligador de alfa-amilase de *A. kawachii*-CBD de alfa-amilase de *A. kawachii*) ou SEQ ID NO: 34 (domínio catalítico da alfa-amilase ácida de *A. niger*-ligador de glicoamilase de *A. rolfsii*-CBD de glicoamilase de *A. rolfsii*) ou SEQ ID NO: 36 (domínio catalítico da alfa-amilase ácida de *A. oryzae*-ligador de glicoamilase de *A.*

rolfsii- CBD de glicoamilase de *A. rolfsii*) ou o híbrido consistindo do domínio catalítico da alfa-amilase ácida de *A. niger* (SEQ ID NO: 4 ou 38, respectivamente)-ligador de glicoamilase de *A. kawachii* (SEQ ID NO: 23)-CBD de glicoamilase de *A. kawachii* (SEQ ID NO: 2) ou uma enzima híbrida que tenha uma sequência de amino ácido tendo pelo menos 50%, 60%, 70%, 80% ou mesmo pelo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com qualquer uma das seqüências amino ácidas antes mencionadas.

Em outra forma de realização preferida a enzima híbrida tem uma sequência de amino ácido que difere da sequência de amino ácido mostrada na SEQ ID NO: 28 (domínio catalítico da alfa-amilase ácida de *A. niger*-ligador de alfa-amilase de *A. kawachii*-CBD de glicoamilase de *A. niger*), SEQ ID NO: 30 (domínio catalítico da alfa-amilase ácida de *A. niger*-ligador de alfa-amilase de *A. kawachii*- CBD de glicoamilase de *A. rolfsii*), SEQ ID NO: 32 (domínio catalítico da alfa-amilase ácida de *A. oryzae*-ligador de alfa-amilase de *A. kawachii*-CBD de alfa-amilase de *A. kawachii*), SEQ ID NO: 34 (domínio catalítico da alfa-amilase ácida de *A. niger*-CBD de glicoamilase de *A. rolfsii*) ou SEQ ID NO: 36 (Domínio catalítico da alfa-amilase ácida de *A. oryzae*-domínio catalítico da alfa-amilase ácida de *A. niger* (SEQ ID NOS: 4 ou 38, respectivamente)-ligador de glicoamilase de *A. kawachii* (SEQ ID NO: 23)-CBD de glicoamilase de *A. kawachii* (SEQ ID NO: 2) em não mais do que 10 posições, não mais do que 9 posições, não mais do que 8 posições, não mais do que 7 posições, não mais do que 6 posições, não mais do que 5 posições, não mais do que 4 posições, não mais do que 3 posições, não mais do que 2 posições, ou mesmo não mais do que 1 posição.

Preferivelmente, a enzima híbrida compreende uma sequência de CBD tendo pelo menos 50%, 60%, 70%, 80% ou mesmo pelo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com qualquer uma das

seqüências amino ácidas mostradas na SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 ou SEQ ID NO: 21. Mesmo mais preferida a enzima híbrida compreende uma sequência de CBD tendo uma sequência de amino ácido mostrada na SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 ou SEQ ID NO: 21, em ainda outra forma de realização preferida, a sequência de CBD tem uma sequência de amino ácido que difere da sequência de amino ácido mostrada na SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 ou SEQ ID NO: 21 em não mais do que 10 posições amino ácidas, não mais do que 9 posições, não mais do que 8 posições, não mais do que 7 posições, não mais do que 8 posições, não mais do que 5 posições, não mais do que 4 posições, não mais do que 3 posições, não mais do que 2 posições, ou mesmo não mais do que 1 posição.

Em uma forma de realização muitíssimo preferida, a enzima híbrida compreende um derivado de CBD de uma glicoamilase de *A. rolfsii*, tal como a glicoamilase de AHU 9627 de *A. rolfsii* descrito na Patente U.S. No. 4.727.026.

25 Enzimas de lavagem ácida

Qualquer enzima de lavagem de ácido pode ser usada de acordo com a presente invenção. A enzima de lavagem de ácido pode ser uma enzima ácida selecionada do grupo consistindo de pectinase, celulase, lipase, protease, xiloglicanase, cutinase e uma mistura das mesmas. Uma enzima de

lavagem é “ácida” no contexto da presente invenção, quando o pH ótimo sob as condições presentes durante desengomagem e lavagem simultaneamente é abaixo de 7, tal como entre 1 – 7, preferivelmente abaixo 5, tal como entre 1 – 5, especialmente abaixo de 4, tal como entre 1 – 4.

5 Várias enzimas de lavagem são conhecidas como:

Poligalacturonase (EC 3.2.1.15) catalisa a hidrólise aleatória das ligações 1,4-alfa-D-galactosidurônicas em pectato e outras galacturonanas. Exemplos de outros nomes são: Pectina depolimerase; pectinase; endopoligalacturonase; endo-poligalacturonase; e
10 endogalacturonase. O nome sistemático é pol(1,4-alfa-D-galacturonida)glicanoidrolase.

A pectina liase (EC 4.2.2.10) catalisa a clivagem eliminativa de (1,4)-alfa-D-galacturonan metil éster para fornecer oligossacarídeos com grupos 4-deóxi-6-O-metil-alfa-D-galact-4-enuronisila em suas extremidades
15 não redutoras. Exemplos de outros nomes são: Pectina transeliminase; transeliminase polimetilgalacturônica; e pectina metiltranseliminase. O nome sistemático é (1,4)-6-O-metil-alfa-D-galacturonano liase.

A pectato liase (EC 4.2.2.2) catalisa a clivagem eliminativa de (1,4)-alfa-D-galacturonano para fornecer oligossacarídeos com grupos 4-deóxi-alfa-D-enuronosila em suas extremidades não redutoras. Exemplos de
20 outros nomes são: pectato transeliminase; transeliminase poligalacturônica; e endopectina metiltranseliminase. O nome sistemático é (1,4)-alfa-D-galacturonano liase.

A pectinesterase (EC 3.1.1.11) catalisa a reação: pectina + n
25 $H_2O = n$ metanol + pectato. Exemplos de outros nomes são: Pectina demetoxilase; pectina metilesterase; e pectina metil esterase. O nome sistemático é pectina pectilidrolase.

A pectato disssacarídeo-liase (EC 4.2.2.9) catalisa a clivagem eliminativa de 4-(4-deóxi-alfa-D-galact-4-enuronosil)-D-galacturonato da

extremidade redutora do pectato, isto é, pectina desesterificada. Exemplos de outros nomes são: Pectato exo-liase; ácido exopéctico transeliminase; exopectato liase; e ácido exopoligalactorônico-trans-eliminase. O nome sistêmico é liase de dissacarídeo da extremidade redutora de (1-4)-alfa-D-galacturonano.

A numeração EC é de acordo com as Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry e Molecular Biology on the Nomenclature e Classification of Enzyme-Catalysed Reactions, publicadas em Enzyme Nomenclature 1992 (Academic Press, San Diego, California, com Supplement 1 (1993), Supplement 2 (1994), Supplement 3 (1995), Supplement 4 (1997) e Supplement 5 (em Eur. J. Biochem. 1994, 223: 1-5; Eur. J. Biochem. 1995, 232: 1-6; Eur. J. Biochem. 1996, 237: 1-5; Eur. J. Biochem, 1997, 250: 1-6 e Eur. J. Biochem. 1999, 264: 610-650: respectivamente) .

Em uma forma de realização preferida, a pectinase ácida é uma pectato liase, uma pectina liase, uma poligalactoronase ou uma pligalactoronato liase.

O termo “pectinase” inclui qualquer enzima da pectinase ácida. As pectinases são um grupo de enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas de substâncias pécticas, principalmente poli-1,4-alfa-D-galacturonida e seus derivados (vide referência Sakai et al., Pectin, pectinase and propectinase: production, properties and applications, em: Advances in Applied Microbiology, Vol. 39, pp. 213-294 (1993)) cuja enzima é entendida incluir uma proteína madura ou uma sua forma precursora ou um seu fragmento funcional, que essencialmente tem a atividade da enzima de comprimento total. Além disso, a expressão enzima de pectinase destina-se a incluir homólogos ou análogos de tais enzimas.

Preferivelmente, a pectinase ácida é uma enzima que catalisa a clivagem aleatória das ligações alfa-1,4-glicosídicas no ácido péctico, também

chamado ácido poligalacturônico, por transeliminação, tal como a poligalacturonato liase da classe enzimática (EC 4.2.2.2) (PGL), também conhecida como poli(1,4-alfa-D-galacturonida) liase, também conhecida como pectato liase. Também preferida é uma enzima de pectinase, que catalisa a hidrólise aleatória das ligações alfa-1,4-glicosídicas no ácido péctico, tal como a poligalactoronase da classe enzimática (EC 3.2.1.15) (PG), também conhecida como endo-PG. Também preferida é uma enzima de pectinase, tal como polimetilgalacturonato liase (EC 4.2.2.10) (PMGL), também conhecida como Endo-PMGL, também conhecida como poli(metioxigalactoronida) liase, também conhecida como pectina liase, que catalisa a clivagem aleatória das ligações alfa-1,4-glicosídicas da pectina. Outras pectinases preferidas são galactanases (EC 3.2.1.89), arabinanases (EC 3.2.1.99), pectina esterases (EC 3.1.1.11) e mananases (EC 3.2.1.78).

Para fins da invenção, a fonte das enzimas acima incluindo pectina liase, pectato liase e pectinesterase não é crítica, p. ex., as enzimas podem ser obtidas de uma planta, um animal ou um microorganismo tal como uma bactéria ou um fungo, p. ex., um fungo filamentoso ou uma levedura. As enzimas podem, p. ex., ser obtidas destas fontes pelo uso de técnicas de DNA recombinante, como é sabido na técnica. As enzimas podem ser enzimas naturais ou tipo selvagem ou qualquer seu mutante, variante ou fragmento exibindo a atividade enzimática pertinente, bem como enzimas sintéticas, tais como enzimas embaralhadas e enzimas de consenso. Tais enzimas geneticamente construídas podem ser preparadas como é geralmente conhecido na técnica, p. ex., por mutagênese direcionada ao sítio, por PCR (usando-se um fragmento PCR contendo a mutação desejada como um dos imprimadores das reações PCR), ou por Mutagênese Aleatória. A preparação das proteínas de consenso é descrita, p. ex., na EP 897985.

A pectinase pode ser um componente ocorrendo em um sistema enzimático produzido por um dado microorganismo, tal como um

sistema enzimático principalmente compreendendo diversos diferentes componentes de pectinase, incluindo aqueles identificados acima.

Alternativamente, a pectinase pode ser um único componente, isto é, um componente essencialmente livre de outras enzimas de pectinase, 5 que podem ocorrer em um sistema enzimático produzido por um dado microorganismo, o único componente tipicamente sendo um componente recombinante, isto é, produzido pela clonagem de uma sequência de DNA codificando o único componente e subsequente célula transformada com a sequência de DNA e expressa em um hospedeiro. Tais enzimas 10 recombinantes úteis, especialmente pectinase, pectina liases e poligalacturonases são descritas em detalhes em, p.ex., WO 93/020193, WO 02/092741, WO 03/095638 e WO 2004/092479 (da Novozymes A/S), que são por este meio incorporadas por referência em sua totalidade, incluindo as listagens de sequência. O hospedeiro é preferivelmente um hospedeiro 15 heterólogo, porém o hospedeiro pode, sob certas condições, também ser o hospedeiro homólogo.

Em uma forma de realização preferida, a pectinase usada de acordo com a presente invenção é derivada do gênero *Aspergillus*.

Em uma ainda preferida forma de realização, a pectinase é a 20 protopectinase tendo uma sequência de amino ácido SEQ ID NO: 1 de JP 11681877 ou a protopectinase tendo uma sequência de amino ácido gerada por deleção, substituição ou inserção de um amino ácido ou diversos amino ácidos da sequência de amino ácido e tendo uma atividade no mesmo nível do ou um nível superior ao nível da atividade da protopectinase com a sequência 25 de amino ácido de SEQ ID NO: 1 de JP 11682877.

A pectinase, tal como especialmente pectato liase, pode preferivelmente estar presente em uma concentração na faixa de 1 – 1500 APSU/kg de tecido, preferivelmente 10 – 1200 APSU/kg de tecido, especialmente 100 – 1000 APSU/kg de tecido.

As liases de pectato ácidas comercialmente disponíveis de acordo com a presente invenção incluem Pectinex® BE XXL, Pectinex® BE Colour, Pectinex® ultra; Pectinex™ Ultra SP-L, Pectinex® Yield Mash, Pectinex® XXLM Pectinex® Smash XXL, Pectinex® Smash, Pectinex™ AR da Novozymes A/S, Dinamarca.

Proteases

Qualquer protease adequada para uso nas soluções ácidas pode ser usada. As proteases adequadas incluem aquelas de origem animal, vegetal ou microbiana. A origem microbiana é preferida. Mutantes química ou genericamente modificados são incluídos. A protease pode ser uma serina protease, preferivelmente uma protease microbiana ácida ou uma protease semelhante a tripsina. Exemplos de proteases ácidas são subtilisinas, especialmente aquelas derivadas de Bacillus, preferivelmente Bacillus lentus ou Bacillus clausii, p. ex., subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 e subtilisina 168 (descrita no WO 89/06279).

Enzimas de protease comercialmente disponíveis preferidas incluem aquelas vendidas sob os nomes comerciais ALCALASE™, SAVINASE™ 16 L Tipo Ex, PRIMASE™, DURAZYM™, e ESPERASE™ (Novozymes A/S, Dinamarca), aquelas vendidas sob o nome comercial OPTICLEAM™, OPTIMASE™, PROPARASE™, PURAFECT™, PURAFECT™ MA e PURAFECT™ OX, PURAFECT™ OX-1 e PURAFECT™ OX-2 pela Genencor International Inc., (USA).

Em uma forma de realização do processo da invenção, a protease pode estar presente em uma concentração de 0,001-10 KNPU/L, preferivelmente 0,1-1 KNPU/L. especialmente em torno de 0,3 KNPU/L ou 0.001-10 KNPU/kg de tecido, preferivelmente 0,1-1 KNPU/kg de tecido, especialmente em torno de 0.3 KNPU/kg de tecido.

Lipases

Qualquer lipase adequada para uso em soluções ácidas pode

ser usada. Lipases adequadas incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Mutantes química ou geneticamente modificados são incluídos.

Exemplos de lipases úteis incluem enzimas de lipase ácida representativas incluindo Lipolase.TM., Lipolase.TM. Ultra, Palatase.TM. A, 5 Palatase.TM. M e Lipozima.TM, comercialmente disponíveis na Novo industri A/S. Estas enzimas de lipase ácida são enzimas de lipase 1,3-específicas, que hidrolisam o ácido graxo na posição 1 e 3 do triglicerídeo. Outra enzima de lipase ácida representativa é a Lipase de Levedura-BCC comercialmente disponível na Bio-Cat, Inc. Esta enzima é derivada de uma 10 cepa selecionada de *Candida cylindracea* e é uma enzima de lipase não-específica, que hidrolisa o ácido graxo em todas três posições do triglicerídeo.

Em uma forma de realização do processo da invenção, uma enzima de lipase pode estar presente em uma concentração de 0,01 – 100 LU/L de solução de tratamento, preferivelmente 1 – 10 LU/L de solução de 15 tratamento, especialmente em torno de 1 LU/L solução de tratamento ou de 0.01-100 LU/kg de tecido, preferivelmente 1-10 LU/kg de tecido, especialmente em torno de 1 LU/kg de tecido.

Celulases

No presente contexto, o termo “celulase ou “enzima 20 celulolítica” refere-se a uma enzima que catalisa a degradação da celulose em glicose, celobiose, triose e outros celo-oligossacarídeos. A celulose é um polímero de glicose ligado por ligações beta-1,4-glicosídicas. As cadeias de celulose formam numerosas ligações hidrogênio intra e intermoleculares, que resultam na formação de microfibrilas de celulose insolúveis. A hidrólise 25 microbiana da celulose em glicose envolve as seguintes três maiores classes de celulases: endo-1,4-beta-glicanases (EC 3.2.1.4), que clivam as ligações beta-1,4-glicosídicas aleatoriamente por todas as moléculas de celulose; celobioidrolases (EC 3.2.1.91) (exoglicanases), que digerem a celulose da extremidade não-redutora; e beta-glicosidases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam a

celobiose e celodextrinas de baixa massa molecular para liberar glicose. A maioria das celulasas consiste de um domínio de ligação de celulose (CBD) e um domínio catalítico (CD) separado por um ligador rico em prolina e resíduos hidróxi amino ácidos. No relatório e reivindicações, o termo “endoglicanase”
5 é destinado a indicar enzimas com atividade celulolítica, especialmente atividade endo-1,4-beta-glicanase, que são classificadas em EC 3.2.1.4 de acordo com a Enzyme Nomenclature (1992) e são capazes de catalisar (endo)hidrólise de ligações 1,4-beta-D-glicosídicas em celulose, liquenina e beta-D-glicanos de cereais, incluindo ligações-1,4 de beta-D-glicanos,
10 também contendo ligações-1,3. Qualquer celulase adequada para uso em soluções ácidas pode ser usada. Celulasas adequadas incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Mutantes química ou genericamente modificados são incluídos. Celulasas adequadas são descritas na Patente U.S. No. 4.435.307, que descreve celulasas fúngicas produzidas de *Humicola insolens*. Celulasas especialmente adequadas são as celulasas tendo benefícios de cuidados de cor. Exemplos de tais celulasas são as celulasas descritas no pedido de patente Européia No. 0 495 257, WO 91/17243 e WO 96/29397.

A enzima de celulase ácida específica para hidrólise da celulose polimérica produzida por bactéria *Acetobacter* pode ser derivada de
20 certas cepas de *Trichoderma reesei* ou *Aspergillus niger*, ou seus mutantes ou variantes, natural ou artificialmente induzidos. Como aqui usado, *Trichoderma reesei* indica microorganismos conhecidos por esse nome, bem como aqueles microorganismos classificados sob os nomes *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichoderma viride*. Qualquer enzima de celulase ou
25 complexo de enzima que seja específico para hidrólise da celulose produzida por bactérias *Acetobacter* pode ser usada.

Uma enzima de celulase ácida representativa é o complexo de Concentrado Celulase Tr e celulase ácida de multi-enzima, que é comercialmente disponível na Solvay Enzymes, Inc. O Concentrado de

Celulase Tr é um complexo de celulase de grau alimentício obtido por fermentação controlada de uma cepa selecionada de *Trichoderma reesei*. Este complexo de enzima consiste de tanto exoglicanases como endoglicanases que diretamente atacam a celulose nativa, os derivados de celulose nativa e derivados de celulose solúveis. Este complexo de enzima especificamente hidrolisa as ligações beta-D.4-glicosídicas de celulose bacteriana, em particular a celulose bacteriana polimérica produzida pela bactéria *Acetobacter*, bem como seus oligômeros e derivados (Patente U.S. No. 5.975.095).

Outra enzima de celulase representativa comercialmente disponível na Solvay enzymes, Inc. é o complexo de Celulase TRI e celulase líquida de multi-enzimas. O complexo de enzima de celulose de celulase TRI é derivado de *Trichoderma reesei* da mesma maneira que o complexo de enzima Concentrado Celulase Tr, porém é preparado e vendido em forma líquida. Sua atividade contra a celulose bacteriana foi demonstrada ser equivalente àquela do complexo de enzima e Concentrado de Celulase Tr.

Outras enzimas adequadas para uso na presente invenção incluem enzima de Celluzyme Acid P e Celluclast 1,5 L, ambas comercialmente disponíveis na Novo Nordisk; Multifect. TM. Celulase 300 enzima, comercialmente disponível na Genencor International e Rapidase RTM. Acid Cellulase enzyme, comercialmente disponível na Gist-Brocades B. V. Ainda outras enzimas de celulase ou complexos de enzima de celulase são adequadas para uso na presente invenção, desde que elas exibam atividade hidrolítica específica direcionada à ligação beta-glicosídica característica da celulose bacteriana polimérica produzida por microorganismos tais como bactérias *Acetobacter* (Patente U.S. No. 5.975.095).

Em uma forma de realização do processo da invenção, a celulase pode ser usada em uma concentração na faixa de 0,001 – 10 g de proteína enzimática/l solução de tratamento, preferivelmente 0,005 – 5 g de

proteína enzimática/l de solução de tratamento, especialmente 0.01-3 g proteína enzimática/l solução ou de 0.001-10 g proteína enzimática/kg de tecido, preferivelmente 0.005-5 g proteína enzimática/kg de tecido, especialmente 0,01-3 g proteína enzimática/kg de tecido. Em uma forma de
 5 realização a celulose é usada em uma concentração de 0,1-1,000 ECU/g de tecido, preferivelmente 0,5-200 ECU/g de tecido, especialmente 1-500 ECU/g de tecido.

Cutinase

Uma cutinase é uma enzima capaz de degradar a cutina, cf., p.
 10 ex., Lin T S & Kolattukudy P E, J. Bacteriol., 1978, 133(2): 942-951. As cutinases, por exemplo, diferem das lipases clássicas pelo fato de que nenhuma ativação mensurável em torno da concentração crítica de micelas (CMC) do substrato de tributirina é observada. Além disso, as cutinases são consideradas pertencentes a uma classe de esterases de serina. A cutinase
 15 pode também ser uma cutinase derivada de *Humicola insolens* descrita no WO 96/13580. A cutinase pode ser uma variante tal como uma das variantes descritas no WO 00/34450 e WO 01/92502, que são por este meio incorporados por referência.

Exemplos de cutinases são aqueles derivados de *Humicola insolens* (Patente U.S. No. 5.827.719); de uma cepa de *Fusarium*, p. ex., *F. roseum culmorum* ou, particularmente, *F. solani pisi* (WO 90/09446; WO 94/14964, WO 94/03578). A cutinase pode também ser derivada de uma cepa de *Rhizoctonia*, p. e., *R. solani*, ou uma cepa de *Alternaria*, p. ex., *A. brassicicola* (WO 94/03578) ou suas variantes, tais como aquelas descritas em
 20 WO 00/34450 ou WO 01/92502. A cutinase pode também ser de origem bacteriana, tal como uma cepa de *Pseudomonas*, preferivelmente *Pseudomonas mendocina* descrita no WO 01/34899.

A cutinase pode ser adicionada em uma concentração de 0,001
 – 25.000 microgramas de proteína enzimática/grama de tecido,

preferivelmente 0,01-10.000 microgramas proteína enzimática/g de tecido, especialmente 0,05-1.000 microgramas proteína enzimática/g de tecido.

Xiloglicanase

A xiloglicanase é uma enzima específica de xiloglicano, capaz de catalisar a solubilização de xiloglicano em oligossacarídeos de xiloglicano. De acordo com IUBMB Enzyme Nomenclature (2003) uma xiloglicanase é classificada como EC 3.1.1.151. Pauly et al, (Glycobiology, 1999, 9:93 -100) descreve uma endo-beta-1,4-glicanase específica de xiloglicano de *Aspergillus aculeatus*. Uma xiloglicanase usada de acordo com a presente invenção pode ser derivada de microorganismos tais como fungos ou bactérias. Exemplos de xiloglicanases úteis são endoglicanases hidrolisantes de xiloglicano da família 12, em particular endoglicanases hidrolisantes de xiloglicano da família 12 obtidas de, p. ex., *Aspergillus aculeatus* como descrito no WO 94/14953. Outro exemplo útil é uma xiloglicanase produzida por *Trichoderma*, especialmente EGIII. A xiloglicanase pode também ser derivada de uma bactéria do gênero *Bacillus*, incluindo *Bacillus licheniformis*, *Bacillus agaradhaerens* ou *Bacillus firmus*. A xiloglicanase pode também ser uma endoglicanase com atividade de xiloglicanase e baixa atividade em relação à celulose insolúvel e alta atividade em relação à celulose solúvel, p. ex., endoglicanases da família 7 obtidas de, p. ex., *Humicola insolens*.

A xiloglicanase pode ser adicionada em uma concentração de 0,001 – 25.000 µg de proteína enzimática/grama de tecido, preferivelmente 0,01-10.000 microgramas proteína enzimática/g de tecido, mais preferivelmente 0,05-1.000 microgramas proteína enzimática/g de tecido, em particular 0,5-500 microgramas proteína enzimática/grama de tecido.

Composição da Invenção

No segundo aspecto a invenção refere-se a uma composição adequada para uso no processo da invenção. A composição pode ser uma

composição sólida ou líquida (aquosa) e pode ser uma composição concentrada ou uma composição pronta para uso.

Assim, neste aspecto, a invenção refere-se a uma composição compreendendo uma alfa-amilase ácida e uma enzima de lavagem de ácido.

5 As enzimas compreendidas podem preferivelmente ser as mencionadas na seção “Enzimas” acima.

Em uma forma de realização, a alfa-amilase ácida derivada de uma cepa de *Bacillus* sp, preferivelmente de uma cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *Bacillus* sp. NCIB 12289, NCIB 10 12512, NCIB 12513 ou DSM 9375, ou DSMZ no. 12849, KSM AP1378, ou KSM K36 ou KSM K38.

A bacillus alfa-amilase pode ser uma variante tendo uma ou mais deleções nas posições D183 e G184, respectivamente, e pode ainda ter uma substituição na posição N195F (usando-se a numeração de SEQ ID NO: 15 4). A variante de *Bacillus* alfa-amilase pode também ser uma tendo uma ou mais deleções na posição D183 e G184 e pode ainda ter uma ou mais das seguintes substituições: R118K, N195F, R320K, R458K (empregando-se a numeração da SEQ ID NO: 6).

20 As enzima(s) de lavagem é(são) selecionadas do grupo consistindo de: pectinase, celulase, lipase, protease, cutinase, xiloglicanase ácida e misturas dos mesmos.

Em uma formas de realização preferida, a pectinase ácida é uma pectato liase, preferivelmente uma pectato liase derivada de uma cepa de *Bacillus*, preferivelmente uma cepa de *B. licheniformis*, *B. alcalophilus*, 25 *Bacillus pseudoalcalophilus* e *Bacillus clarikia*, especialmente a espécie *Bacillus licheniformis*. Outros agentes adequados para o processo a ser realizado podem ser adicionados separadamente ou ser compreendidos na composição da invenção. Exemplos de tais agentes incluem agentes estabilizante, tensoativo, umectante, dispersante, seqüestrante e emulsificante

e misturas dos mesmos.

Embora a alfa-amilase ácida e a enzima de lavagem de ácido possam ser adicionadas como tal, prefere-se que seja formulada em uma composição adequada. Assim, as enzimas podem ser usadas na forma de um
5 granulado, preferivelmente um granulado não-empoante, um líquido, em particular um líquido estabilizado, uma lama ou em uma forma protegida. Granulados livres de pó podem ser produzidos, p. ex., como descrito nas Patentes U.S. Nos. 4.106.991 e 4.661.452 (ambas de Novozimes A/S) e podem opcionalmente ser revestidas por métodos conhecidos na técnica.

10 As preparações enzimáticas líquidas pode, por exemplo, ser estabilizadas adicionando-se um poliol, tal como, p. ex., propileno glicol, um açúcar ou álcool de açúcar ou ácido acético, de acordo com métodos estabelecidos. Outros estabilizadores de enzima são bem conhecidos na técnica. Enzimas protegidas podem ser preparadas de acordo com o método
15 descrito na EP 238 216.

Em princípio, a composição da invenção compreendendo uma alfa-amilase ácida e uma enzima de lavagem pode conter qualquer outro agente a ser usado no processo combinado da invenção.

A composição da invenção compreende em uma forma de
20 realização preferida pelo menos um outro componente selecionado do grupo consistindo de estabilizadores, tensoativos, agentes umectantes, agentes dispersantes, agentes seqüestrantes e agentes emulsificantes. Todos tais outros componentes adequados para uso têxtil são bem conhecidos na técnica.

Tensoativos adequados incluem os mencionados na seção
25 “Detergente” acima. O agente umectante serve para melhorar a umectabilidade da fibra, por meio do que uma rápida e uniforme desengomagem e lavagem podem ser obtida. O agente emulsificante serve para emulsificar impurezas hidrofóbicas presentes no tecido. O agente dispersante serve para evitar que impurezas extraídas se redepositem no

tecido. O agente seqüestrante serve para remover íons tais como Ca, Mg e Fe, que podem ter um impacto negativo sobre o processo e exemplos preferidos incluem soda cáustica (hidróxido de sódio) e cinza de soda (carbonato de sódio).

5 Uso da Composição da Invenção

No terceiro aspecto a invenção refere-se ao uso da composição da invenção em um processo de desengomagem e lavagem simultâneas, preferivelmente o processo da invenção. Em uma forma de realização preferida, a composição da invenção é usada em um processo da invenção.

10 A invenção descrita e reivindicada aqui não é destinada a limitar o escopo pelas formas de realização específicas aqui descritas, uma vez que estas formas de realização são ilustrações de diversos aspectos da invenção. Quaisquer formas de realização equivalentes destinam-se a situarem-se dentro do escopo desta invenção. Na realidade, várias

15 modificações da invenção, além daquelas mostradas e descritas aqui, tornar-se-ão evidentes para aqueles hábeis na técnica pela descrição precedente. Tais modificações são também destinadas a situar-se dentro do escopo das reivindicações anexas. No caso de conflito, a presente descrição incluindo definições regulará.

20 Várias referências são aqui citadas, cujas descrições são incorporadas por referência em suas totalidades.

Materiais & Métodos

Enzimas

25 - Amilase Ácida A: Alfa-amilase ácida tipo selvagem, derivada de *A. niger* descrito na SEQ ID NO: 38.

- Amilase Ácida B: alfa-amilase híbrida mostrada na SEQ ID NO: 48, compreendendo um domínio catalítico (CD) de alfa-amilase de *Rhizomucor pusillus* tendo um domínio de ligação de carboidrato (CBD) de *A. niger*.

- Pectinase ácida A (Pectinex BEE XXL, Novozymes (A/S): uma preparação de enzima líquida pectolítica, produzida por *Aspergillus species*.

5 - Pectinase ácida B (Pectinex Ultra; Novozymes A/S): uma preparação de enzima pectolítica altamente ativa, contendo uma faixa de atividades hemicelulolíticas, produzidas por uma cepa selecionada de *Aspergillus aculeatus*.

- Pectinase ácida C (Pectinex Yield Mash, Novozymes A/S)

- Pectinase ácida D (Pectinex XXL, Novozymes A/S)

10 - Pectinase ácida E (Pectinex Smash XXL, Novozymes A/S).

Os números de classificação enzimática (números EC) referidos na presente especificação com reivindicações são de acordo com as Recommendations (1992) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Academic Press
15 Inc, 1992.

Tecido

- 460U Interlock Knits (Testfabrics, Inc.)

- Vlisco fabric (de Vlisco Helmond B. V.)

Tampão

20 Tampão de Citrato

1) 10 mM tampão de Citrato (pH 3,0)

1,954 g de monoidrato de ácido cítrico e 0,206 g de diidrato de Citrato de Sódio são dissolvidos em 1 l de água deionizada.

2) 10 mM de tampão de Citrato (pH 4,0)

25 1,376 g de monoidrato de ácido cítrico 1,015 g de diidrato de Citrato de Sódio são dissolvidos em 1 L de água deionizada.

Métodos:

Determinação da homologia

Para fins da presente invenção, o grau de homologia é

determinado como o grau de identidade entre duas sequências amino ácidas, como determinado pelo método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151 – 153), usando-se o software LASERGENE™ MEGALiGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) com uma tabela de identidade e os seguintes parâmetros de múltiplos alinhamento: Perda de vão de 10 e perda de comprimento de vão de 10. Os parâmetros de alinhamento duplo foram Ktuple=1 , perda de vão=3, windows=5, e diago-nals=5.

Atividade de alfa-amilase ácida (Ensaio AFAU)

Quando usada de acordo com a presente invenção, a atividade de qualquer alfa-amilase ácida pode ser medida em AFAU (Unidades de Alfa-amilase Fúngica Ácida), que são determinadas em relação a um padrão de enzima. 1 AFAU é definida como a quantidade de enzima que degrada 5260 mg de matéria seca de amido por hora sob as condições padrão abaixo mencionadas.

A alfa-amilase ácida, uma endo-alfa-amilase (1,4-alfa-D-glican-glicano-hidrolase, E.C. 3.2.1.1) hidrolisa as ligações alfa-1,4-glicosídicas nas regiões internas da molécula de amido para formar dextrinas e oligossacarídeos com diferentes comprimentos de cadeia. A intensidade da cor formada com iodo é diretamente proporcional à concentração de amido. A atividade de amilase é determinada usando-se colorimetria inversa como uma redução da concentração de amido sob as condições analíticas especificadas.

	ALFA-AMILASE	
AMIDO + IODO	----->	DEXTRINAS+ OLIGOSSACARÍDEOS
$\lambda = 590 \text{ nm}$	$40^\circ, \text{pH } 2,5$	
azul/violeta	$t = 23 \text{ s}$	descoloração

Condições padrão/condições de reação:

Substrato:	Amido solúvel, ap. 0,17 g/l
Tampão:	Citrato, aprox. 0,03 M
Iodo (12):	0,03 g/l
CaCl ₂ :	1,85 mM
pH:	2,50 ± 0,05

Temperatura Incubação:	40°C
Tempo de reação:	23 segundos
Comprimento de onda:	590 nm
Concentração enzima:	0,025 AFAU/ml
5 Faixa trabalho enzima:	0,03 – 0,04 AFAU/ml

Um folheto EB-SM-0259.02/01 descrevendo este método analítico mais detalhadamente é disponível sob pedido à Novozimas A/S, Dinamarca, folheto este sendo por este meio incluído por referência.

Atividade de alfa-amilase (FAU)

10 A atividade de alfa-amilase pode ser determinada usando-se (4,6-etilideno(G7)-p-nitrofenil(G1)- α ,D-maltoeptaosídeo (etilideno-G7PNP) como substrato. Este método é baseado na decomposição de etilideno-G7PNP pela enzima em glicose e no p-nitrofenol colorido-amarelo. A taxa de formação do p-nitrofenol pode ser observada por Konelab 30. Esta é uma
15 expressão da taxa de reação e, desse modo, da atividade enzimática.

A atividade enzimática é determinada em relação a um padrão enzimático. 1 FAU é definida como a quantidade de enzima que degrada 5.260 mg de matéria seca de amido por hora sob as condições padrão abaixo mencionadas.

Condições de Reação	
Temperatura	37°C
pH	7,15
Concentração de substrato	1,86 mM
comprimento de onda	405 nm
Tempo de reação	5 min
Tempo de Medição	2 min
Concentração de enzima	0,46 – 2,29 mFAU(F)/ml

20 Um folheto EB-SM-0216.02 descrevendo este método analítico mais detalhadamente é disponível sob pedido à Novozimes A/S, Dinamarca, folheto este sendo por este meio incluído por referência.

Determinação da ATIVIDADE DA PECTINA TRANSELIMINASE (UPTE)

25 A atividade da pectinase ácida pode ser determinada degradando-se uma solução de Obipectina em relação a um padrão de enzima

sob as condições dadas abaixo:

Reação:

Concentração de substrato: 0,5% Obipectina

Temperatura: 30°C

5 pH: 5,4

Tempo de reação: 10 minutos

Absorbância: 238 nm

10 Uma unidade de pectina transeliminase (UPTE) é definida como a quantidade de enzima que eleva a absorbância em 0,01 unidade de absorbância por minuto sob condições padrão.

Um folheto EB-SM-0368.02/01, descrevendo este método analítico mais detalhadamente é disponível sob pedido à Novozimes A/S, Dinamarca, folheto este sendo por este meio incluído por referência.

Determinação da atividade de Poligalacturonase (PGU)

Condições de reação	
Tampão	Fosfato, 70 mM; Citrato 30 mM
Ácido poligalacturônico	19 g/l
pH	3,5
Temperatura	30°C
Tempo	30 minutos
Poligalacturonase	400 PGU/l
Concentração da Amostra	9 PGU/ml

15 Sob degradação do ácido poligalacturônico, a viscosidade reduzir-se-á, que é proporcional à atividade de Poligalacturonase das amostras desconhecidos.

20 Um folheto EB-SM-0615.02 descrevendo este método analítico mais detalhadamente é disponível sob pedido na Novozimes A/S, Dinamarca, folheto este sendo por este meio incluído por referência.

Desengomagem (Método Tegewa)

25 O resíduo de goma de amido é determinado visualmente comparando-se uma tira de amostra de tecido tingido de iodo com um conjunto padrão de fotos com escala 1 – 9, em que 1 é azul escuro e 9 não tem coloração de cor. A solução colorida de iodo é feita dissolvendo-se 10 g KI

em 10 ml de água, adicionando-se 0,635 g I₂ e 200 ml de etanol em água deionizada, para produzir uma solução total de 1 l. Uma amostra de tecido é cortada e imersa na solução de iodo por 60 segundos e enxaguada em água deionizada por cerca de 5 segundos. A amostra de tecido é classificada por

5 pelo menos dois profissionais após água em excesso da amostra ser comprimida para fora. Um número médio é fornecido. O método e escalas padrão obteníveis de Verband TEGEWA, Karistrasse 21, Frankfurt a.M., Alemanha.

Remoção de pectina

10 O resíduo de pectina no tecido foi determinado quantitativamente. O princípio é que vermelho de rutênio ligue-se a compostos polianiônicos como pectina não metilada. O nível de pectina no tecido é proporcional à concentração de vermelho de rutênio no tecido de algodão, que é linearmente proporcional à função Kulbelka-Munk (isto é,

15 K/S). A refletância de cor (R) do tecido tingido de vermelho de rutênio foi medida a 540 nm (Macbeth colorimeter, Model # CE-7000) e automaticamente calculada em um valor K/S por:

$$K/S = (1-R)^2/2R).$$

A % de remoção de pectina foi calculada usando-se a seguinte

20 fórmula:

$$\% \text{-remoção pectina} = 1 - \% \text{ Pectina Res.} = 1 - 100^* (K/S - K/S_0) / (K/S_{100} - K/S_0)$$

em que K/S₁₀₀ era de tecido com 100% de pectina, tipicamente tecido não tratado original, enquanto K/S₀ era do tecido com 0% de pectina

25 residual, tipicamente tecido muito lavado e branqueado. Com base em informação de John H. Luft e descrita em um artigo "Ruthenium red and Violet I. Chemistry" 1971, a solução de tingimento foi preparada dissolvendo-se 0,2 g/l de vermelho de rutênio, 10, g/l de cloreto de amônio, 2,5 ml/l de 28% de solução de hidróxido de amônio, 1,0 g/l de Silwet L-77 e 1,0 g/l de

Tergitol 15-S-12 em água destilada, para produzir uma solução total de 1 litro. A solução foi produzida diariamente antes do uso. Durante o tingimento, 100 ml de solução corante foi usada para 1 grama de tecido. As tiras de amostra de tecido foram incubadas em solução vermelho de rutênio por 15 minutos em temperatura ambiente. A tira de amostra foi enxaguada em um esticador e então enxaguada em água destilada (100 ml/1 g de tecido) a 60°C por 10 minutos. A refletância de cor foi medida após secar.

Umectabilidade do tecido

A umectabilidade do tecido foi medida usando-se um método de teste de gota de acordo com o método de teste AATCC 79-1995. Uma gota de água foi permitida cair de uma altura fixada (1 cm) sobre a superfície retesada de um espécime de teste. O tempo necessário para a reflexão especular da gota d'água desaparecer foi medido e registrado como tempo de umectação.

Teste de absorção

A altura de absorção dos têxteis é um dos indicadores para absorbância. Cortar uma tira de amostra de tecido retangular de 25 cm (direção da urdidura e da trama) x 4 cm. Se a amostra não for disponível neste tamanho para testar, ajustar o método para adaptar-se à amostra. Usando-se uma caneta a prova d'água/a prova de corante, riscar uma linha através do topo da amostra 1,5 cm a partir do topo da tira de amostra e 3 cm a partir da base da amostra. Riscar uma linha através da amostra 19 cm a partir da base da tira de amostra. Fixar um grampo de papel com um peso na base do tecido. Colocar o topo da tira de amostra no centro do grampo de termômetro, de modo que a linha fique na base do grampo. Encher um béquer cerca de metade (pelo menos 5 cm acima da base do copo) com 1 g/l de solução de corante (p. ex., azul reativo). Ajustar o grampo com a tira de amostra até a superfície da solução de corante ficar em nível com a linha na base do tecido. Dar partida no cronômetro logo que a tira de amostra estiver em posição.

Medir a altura que a solução de corante tiver sido absorvido completamente da superfície da solução de corante após 30 min. Remover a tira de amostra e permitir que seque ao ar em uma superfície plana.

EXEMPLOS

5 Exemplo 1

Lavagem de tecido de algodão com pectinase ácida A

Um tecido de algodão 100% 460U foi comprado da Test Fabrics. As tiras de amostra de tecido foram cortadas a cerca de 2 g cada.

Dois tampões foram produzidos para este estudo. O tampão
10 pH 3 foi produzido dissolvendo-se 1,954 g de monoidrato de ácido cítrico e 0,206 g de deidrato de citrato de sódio em 1 litro deionizado. O tampão de pH 4 foi produzido dissolvendo-se 1,376 g de monoidrato de ácido cítrico e 1,015 g de deidrato de citrato de sódio em 1 litro desionizado. A lavagem foi conduzida com um Lab-O-Mat. O béquer foi enchido com 40 ml de tampão e
15 dois pedaços de tecido pré-cortado.

1. Pré-enxágue: O agente umectante, Leophan, foi adicionado ao tampão em uma concentração de 0,25 g/l. Em seguida a temperatura foi aumentada para 40°C para pré-enxágue. Após 10 min, o líquido foi drenado.

2. Biolavagem: O béquer com tecidos pré-enxaguados foi
20 enchido com 40 ml de tampão. Pectinase ácida foi adicionada a cada béquer como especificado. No ínterim, o segundo agente umectante, Keirlon Jet B, foi dosado a uma concentração de 1 g/l. A temperatura foi elevada a 55°C e mantida por 30 min.

3. Inativação: Após o tempo requerido alcançado, adicionar o
25 Dekol NS da máquina/béquer então elevar a temperatura a 95°C e realizar por 15 min, diminuída a temperatura a 70°C, drenada.

4. Enxágue quente: Enchido de água e incubado a 70°C por 10 min

5. Enxágue frio: enchido de água fria e enxaguado por 10 min

6. Retirada de água por giro dos tecidos e secagem por ar.

7. Pectina residual medida e tempo de umectação dos tecidos tratados.

O resultado do teste é mostrado na Tabela 1.

5 Exemplo 2

Lavagem de tecido de algodão com Pectinase Ácida B

A mesma tira de amostra de tecido e tampões foram preparados como no Exemplo 1. Pectinase Ácida B tinha diferente composição de enzima em comparação com a Pectinase Ácida A. O desempenho de remoção de pectina foi mostrado na Tabela 1. Ambas as enzimas apresentaram bom desempenho em pH's ácidos.

Tabela 1

pH	Tipo enzima	Dose Enzima	Remoção pectina (%) (média)
4	Nenhuma enzima	0	24,7
	Pectinase Ácida A	9 UPTE/g tecido	46,8
	Pectinase Ácida A	90 UPTE/g tecido	61,8
	Pectinase Ácida B	13 PGU/g tecido	60,4
	Pectinase Ácida B	130 PGU/g tecido	95,6
3	Nenhuma enzima	0	24,0
	Alfa-amilase Ácida B	130 PGU/g tecido	91,2

(ml/kg)	0	0,5	5,00
pH	24,7 %	46,8 %	61,8 %
Pectinex Yield Mash, pH 4	24,7 %	47,2 %	79,8 %
Pectinex Ultra, pH 4	24,7 %	60,4 %	95,6 %
Pectinex XXL, pH 4	24,7 %	30,4 %	69,5 %
Pectinex Smash XXL, pH 4	24,7 %	32,9 %	88,9 %
Pectinex BE XXL, pH 3	24,0 %		91,2 %

Exemplo 3

15 Desengomagem e biolavagem simultâneas de Batelada Tampão frio com Amilase Ácida A e Pectinase Ácida A

O tecido Vilisco (100 % algodão) era da Vilisco e cortado a 5 cm * 15 cm. O tampão pH 3 e pH 4 foram preparados em seguida aos procedimentos descritos no Exemplo 1. 10 ml de tampão foram adicionados a um béquer, Keirlon Jet B foi adicionado a uma concentração de 2 g/l. As enzimas (as doses foram listadas na Tabela 2) foram adicionadas à solução de

impregnação e misturadas bem. 2 tiras de amostra fixadas do mesmo tecido em um par de fórceps. Imersão das tiras de amostra no banho de impregnação por 30 segundos e enchê-la com o pader (Mathis Inc. U.S.A.). Imersão repetida e espremedura por mais um tempo para assegurar uma absorção de 100% de umidade. Colocar as tiras de amostra em duas camadas de saco plástico, pressionar para fora o ar e colocar o saco em temperatura ambiente. Após 24 h, remover as amostras do saco plástico. Fixar as amostras nos fórceps e imergi-las em um banho de água a 90°C por 30 segundos e espremer com pader. Repetir a imersão e espremer duas vezes. Enxaguar o tecido em água de torneira fria por pelo menos 60 segundos e espremer-lhe a água manualmente. Em seguida secar ao ar o tecido e medir TGEWA, pectina residual, tempo de umectação e teste de absorção. O resultado do teste foi mostrado na Tabela 2.

Exemplo 4

15 Desengomagem e biolavagem simultâneas de Batelada Tampão com Amilase Ácida A e Pectinase Ácida A

O mesmo tecido e sistema tampão foram usados como Exemplo 3. Adicionados 100 ml de solução de impregnação em cada béquer e colocados no Lab-o-Mat, aquecidas as soluções a 60°C. Retiradas as enzimas de béquer e adicionadas de acordo com Tabela 2 para a solução de impregnação e misturadas bem. Fixadas 2 tiras de amostra do mesmo tecido em um par de fórceps. Imergidas as tiras de amostra no banho de impregnação por 30 segundos e tamponadas com o pader. Imersão e compressão repetidas por mais uma vez para assegurar uma captação de 100% de umidade. Colocadas as tiras de amostra em duas camadas de saco plástico, pressionado para fora o ar e colocado o saco no banho de água pré-ajustado a 60°C. Após 2 horas, removidas as amostras do saco plástico. Fixadas as amostras nos fórceps e imergi-las em um banho de água a 90°C por 30 segundos e espremidas com pader. Repetida a imersão e espremedura duas vezes.

Enxaguado o tecido em água de bica fria por pelo menos 60 segundos e espremida para fora a água manualmente. Em seguida secado por ar o tecido e medido TEGEWA, pectina residual, tempo de umectação e teste de absorção. O resultado do teste foi mostrado na Tabela 2.

5 Tabela 2

	Amilase	Pectinase A	Desengomagem (TEGEWA)	Remoção de pectina	Tempo de umectação (s)	Absorção g (cm)
Tecido bruto	0	0	1	0	> 60 S	NA
Batelada Tampão a Frio (pH 3); 25° C	50 AFAU/L	36000 UPTE/L	7	72,6 %	5	9
Batelada Tampão a Frio (pH 4); 25° C			7	68,2 %	6	9
batelada tampão (pH 3), 60° C			9	73,3 %	6	9
batelada tampão (pH 4), 60° C			6,5	69,9 %	4	9

Exemplo 5

Desengomagem e biolavagem de Batelada Tampão a frio com Amilase Ácida A e Pectinase Ácida B

Os procedimentos foram os mesmos descritos no Exemplo 3, exceto que a Pectinase Ácida B foi usada. O resultado do teste é mostrado na Tabela 3.

Exemplo 6

Desengomagem e biolavagem de Batelada Tampão com Amilase Ácida A e Pectinase Ácida B

Os procedimentos foram os mesmos descritos no Exemplo 4, exceto que a Pectinase Ácida B foi usada. O resultado do teste é mostrado na Tabela 3.

Tabela 3

	Amilase	Pectinase B	Desengomagem (TEGEWA)	Remoção de pectina	Tempo de umectação (s)	Absorção g (cm)
Batelada Tampão a Frio (pH 3); 25° C	50 AFAU/ L	52000 PGU/L	7	76,5 %	5	10
Batelada Tampão a Frio (pH 4); 25° C			7	75,4 %	2	10
batelada tampão (pH 3), 60° C			9	75,4 %	5	11
batelada tampão (pH 4), 60° C			6,5	72,6 %	4	9,5

Exemplo 7Desengomagem e biolavagem simultâneas batela-tampão a frio com Amilase Ácida B e Pectinase Ácida A

5 Os procedimentos foram os mesmos descritos no Exemplo 3, exceto que a Amilase Ácida A foi substituída por Amilase Ácida B. o resultado do teste é mostrado na Tabela 4.

Exemplo 8Desengomagem e biolavagem simultâneas Batelada Tampão com Amilase Ácida B e Pectinase Ácida A

10

Os procedimentos foram os mesmos descritos no Exemplo 4, exceto que a Amilase Ácida A foi substituída por Amilase Ácida B. O resultado do teste é mostrado na Tabela 4.

Tabela 4

	Amilase B	Pectinase A	Desengomagem (TEGEWA)	Remoção de pectina	Tempo de umectação (s)	Absorção g (cm)
Batelada Tampão a Frio (pH 3); 25° C	50 AFAU/L	36000 UPTE/L	9	69,9 %	6	9,5
Batelada Tampão a Frio (pH 4); 25° C			9	58,1 %	5	8,5
batelada tampão (pH 3), 60° C			8,5	71,1 %	10	10
batelada tampão (pH 4), 60° C			9	62,1 %	5	10

Exemplo 9Desengomagem e biolavagem simultâneas Batelada Tampão a frio com Amilase Ácida B e Pectinase Ácida B

Os procedimentos foram os mesmos descritos no Exemplo 3, exceto que a Amilase Ácida A foi substituída por Amilase Ácida B e a Pectinase Ácida A foi substituída por Pectinase Ácida B. O resultado do teste é mostrado na Tabela 6.

Exemplo 10

10 Desengomagem e biolavagem simultâneas Batelada Tampão a frio com Amilase Ácida B e Pectinase Ácida B

Os procedimentos foram os mesmos descritos no Exemplo 4, exceto que a Amilase Ácida A foi substituída por Amilase Ácida B e a Pectinase Ácida A foi substituída pela Pectinase Ácida B. O resultado do teste é mostrado na Tabela 5.

15 Tabela 5

	Amilase B	Pectinase B	Desengomagem (TEGEWA)	Remoção de pectina	Tempo de umectação (s)	Absorção g (cm)
Batelada Tampão a Frio (pH 3); 25° C	50 AFAU/L	52000 UPTE/L	8	74,5 %	13	9,5
Batelada Tampão a Frio (pH 4); 25° C			8,5	65,7 %	2	105
batelada tampão (pH 3), 60° C			9	75,2 %	4	9,5
batelada tampão (pH 4), 60° C			7,25	69,4 %	9	9

Exemplo 11Desengomagem de tecido de algodão com Alfa-amilase A ácida tipo selvagem

Um tecido de 100% de algodão (270 g/m²) foi da Borås Wärfveri Kingsfors AB, Suécia. Ele foi produzido em 2003 com construção Cupper 3/1. O tecido continha 28 linhas/cm de fio de urdidura e 14 fios/cm de fio de trama. O fio de urdidura tem Ne 11 e o de urdidura tem Ne 8. Ambos os

fios tinham a extremidade aberta. A captação de engomamento seco sobre o fio de urdidura foi de 8%. O engomamento continha principalmente Kollotex 5, Solvitose XO e cera de sebo de carne de vaca com emulsificante. Kollotex 5 é um éster de amido de batata de baixa viscosidade. Solvitose XO é um éter de amido de alta viscosidade com DS de cerca de 0,07. As tiras de amostra de tecido foram cortadas a cerca de 25 g cada.

O tampão pH 3 foi produzido dissolvendo-se 11,53 g de 85% de ácido fosfórico em 4,5 litros de água pura, titulando-se com 5 N NaOH a pH 2,95, em seguida adicionando-se água a 5 litros. Após adicionar 2 g/l de tensoativo não-iônico (um agente umectante) no tampão, o pH do tampão foi medido como 3,05 a 25°C. A dose de enzimas foi adicionada como listado na tabela 6.

O tratamento de desengomagem foi conduzido em um Lab-o-mat (Werner Mathis). Uma solução tampão de 250 ml foi adicionada em cada béquer. Uma dada quantidade de enzima de alfa-amilase foi adicionada. Uma tira de amostra de tecido (25 g) foi colocada em cada béquer. O béquer foi fechado e colocado no Lab-o-mat. Os béqueres foram aquecidos a 5°C/min a 50°C por um sistema de aquecimento infra-vermelho equipado dentro do Lab-o-mat. Os béqueres foram girados a 30 rpm, 50°C por 45 minutos. Após o tratamento com enzima, a tira de amostra de tecido foi sequencialmente lavada com água no mesmo béquer três vezes a 95, 75 e 40°C, respectivamente.

Após secar durante a noite no ar, a tira de amostra de tecido foi tingida com uma solução de iodo. A amostra de tecido tingida foi visualmente comparada com as fotos padrão TGEWA com escala 1-9, onde 1 é escuro e 9 não tem coloração de cor. Assim, o número superior indica uma melhor remoção de amido. A avaliação visual foi feita por pelo menos três profissionais e um valor TEGWA médio foi fornecido para cada amostra de tecido. Os resultados são mostrados na Tabela 6.

O resíduo dos íons metálicos sobre o tecido foi também avaliado. O tecido foi primeiro cortado através de uma peneira de 1 mm com um moinho Thomas-Wiley. Pasta de tecido 4,00 ($\pm 0,01$) g foi misturada com 80 ml de 1 g/l solução de EDTA. A mistura foi incubada a 70°C e 200 rpm em um agitador (novo Brunswick Scientific Co. Inc. Series 25) por 15 horas. Após esfriado por cerca de 30 minutos, a mistura foi centrifugada a 2500 rpm a 20°C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado para análise de teor de metal com um espectrofotômetro de absorção atômica Perkinelmer.

Tabela 6

Tipo de enzima	Enzima (AFAU/kg tecido)	Valor de TEWA (média)	Teor metálico (mg/L)	
			Mn	Fe
Nenhuma enzima	0	1,3	0,23	3,91
Alfa-amilase A ácida	27,5	2,3	n/a	n/a
	275	3,8	0,20	2,72
	1100	5,2	n/a	n/a

n/a = não medido.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para desengomagem e lavagem combinadas de um tecido engomado contendo amido ou derivados de amido durante a manufatura de um tecido, caracterizado pelo fato de compreender incubar dito tecido engomado em uma solução de tratamento aquosa, tendo um pH na faixa entre 1 e 7, solução de tratamento aquosa esta compreendendo uma amilase ácida e pelo menos uma enzima de lavagem ácida.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de dita solução de tratamento aquosa ter um pH na faixa entre 1 e 5, preferivelmente entre 1 e 4.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de dita enzima de lavagem ser celulase ácida, pectinase ácida, lipase ácida, xilanase ácida e/ou protease ácida ou uma mistura das mesmas.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de a amilase ácida ser de origem bacteriana ou fúngica, tal como origem de fungo filamentoso.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de a amilase ácida ser derivada de uma cepa de *Aspergillus*, preferivelmente *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus kawachii*, ou uma cepa de *Rhizomucor*, preferivelmente *Rhizomucor pusillus*, ou uma cepa de *Meripilus*, preferivelmente uma cepa de *Meripilus giganteus*.

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de uma amilase ácida de *Aspergillus* ser a alfa-amilase de *Aspergillus niger* ácida descrita na SEQ ID NO: 38, ou uma variante da mesma.

7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de a amilase ácida de *Rhizomucor* ser a alfa-

amilase de *Rhizomucor pusillus* descrita na SEQ ID NO: 48 ou uma variante da mesma.

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de a amilase ácida, preferivelmente uma alfa-amilase fúngica ácida, estar presente em uma concentração de 1-3.000 AFAU/kg de tecido, preferivelmente 10 – 1.000 AFAU/kg de tecido, especialmente 100-500 AFAU/kg de tecido ou 1 – 3.000 AFAU/l de solução de tratamento, preferivelmente 10-1.000 AFAU/l de solução de tratamento, especialmente 100-500 AFAU/l de solução de tratamento.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de a amilase ácida bacteriana ser derivada de uma cepa do gênero *Bacillus*, preferivelmente derivada de uma cepa de *Bacillus* sp., mais preferivelmente uma cepa de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, ou *Bacillus* sp., tal como *Bacillus* sp. NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513, DSM 9375, DSMZ 12648, DSMZ 12649, KSM K36 ou ou KSM K38.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de a alfa-amilase ser a alfa-amilase híbrida mostrada na SEQ ID NO: 48, compreendendo um domínio catalítico (CD) da alfa-amilase de *Rhizomucor pusillus*, tendo um domínio de ligação de carboidrato (CBD) de *A. niger*.

11. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de dita pectinase ácida ser uma pectato liase ácida, uma pectina liase ácida, uma poligalacturonase ácida e/ou uma poligalacturonato liase ácida.

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de dita pectinase ácida ser Pectinex® BE XXL, Pectinex® BE Colour, Pectinex® Ultra; Pectinex® Ultra SP-L, Pectinex® Yield Mash, Pectinex® XXL, Pectinex® Smash XXL, Pectinex® Smash, Pectinex™ AR ou qualquer misturas delas.

13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de dita pectinase ácida ser derivada do gênero *Aspergillus* ou *Bacillus*.

5 14. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de dita pectinase ácida ser adicionada à ou após adição da amilase ácida.

15. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de ser realizado em uma temperatura na faixa de 5 – 90°, em particular 20 a 90°C.

10 16. Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de o processo ser realizado em uma temperatura entre 25 e 60°C por um período de tempo adequado, preferivelmente entre 2 e 24 horas.

17. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de o pH ser na faixa entre pH 2 a 4.

15 18. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de o tecido ser feito de fibras de origem natural ou produzidas pelo homem.

20 19. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de o tecido ser tecido de algodão, denim, linho, rami, viscose, liocel ou acetato de celulose.

20. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de o tecido ser feito de fibras de origem animal, em particular seda ou lã.

25 21. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato de o tecido ser produzido de fibras de poliéster produzidas pelo homem ou de origem natural, tais como poli(etileno tereftalato) ou poli(ácido láctico).

22. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de o tecido ser feito de fibras de náilon, acrílico

ou poliuretano.

23. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de o tecido ser um tecido ou roupa contendo poliéster, consistindo de essencialmente 100% de poliéster.

5 24. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de o tecido de poliéster ser uma mistura de poliéster, tal como uma mistura de poliéster e celulósico, incluindo misturas de poliéster e algodão; uma mistura de poliéster e lã; uma mistura de poliéster e seda; uma mistura de poliéster e acrílico; uma mistura de poliéster e náilon;
10 um poliéster, mistura de náilon e poliuretano; uma mistura de poliéster e poliuretano, raiom (viscose), acetato de celulose e tencel.

25. Composição, caracterizada pelo fato de compreender uma amilase ácida e uma enzima de lavagem ácida.

26. Composição de acordo com a reivindicação 25,
15 caracterizada pelo fato de a amilase ácida bacteriana ser derivada de uma cepa do gênero Bacillus, preferivelmente derivada de uma cepa de Bacillus sp, mais preferivelmente uma cepa de Bacillus licheniformis, Bacillus licheniformis, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis, ou Bacillus sp., tal como Bacillus sp. NCIB 12289, NCIB
20 12512, NCIB 12513, DSM 9375, DSMZ 12648, DSMZ 12649, KSM AP1378, KSM K36 ou KSM K38.

27. Composição de acordo com a reivindicação 25 ou 26, caracterizada pelo fato de dita amilase ácida ser derivada de Aspergillus niger ou Rhizomucor pusillus ou misturas dos mesmos.

25 28. Composição de acordo com as reivindicações 25 ou 26, caracterizada pelo fato de dita enzima de lavagem ácida ser selecionada do grupo consistindo de celulase ácida, pectinase ácida, lipase ácida, xilanase ácida e/ou protease ácida, e misturas dos mesmos.

29. Composição de acordo com qualquer uma das

reivindicações 25 a 28, caracterizada pelo fato de dita pectinase ácida ser derivada de uma cepa de Aspergillus ou Bacillus.

30. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 29, caracterizada pelo fato de dita pectinase ácida ser
5 Pectinex® BE XXL, Pectinex® BE Colour, Pectinex® Ultra; Pectinex™ Uitra SP-L, Pectinex® Yield Mash, Pectinex® XXL, Pectinex® Smash XXL, Pectinex® Smash e/ou Pectinex™ AR.

31. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 30, caracterizada pelo fato de dita composição
10 compreender ainda estabilizador, tensoativo, agente umectante, agentes dispersantes, agentes seqüestrantes e agentes emulsificantes ou uma mistura dos mesmos.

32. Uso de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 25 a 31, caracterizado pelo fato de ser para desengomagem
15 e lavagem simultâneas.

RESUMO**“PROCESSO PARA DESENGOMAGEM E LAVAGEM COMBINADAS DE UM TECIDO ENGOMADO, E, COMPOSIÇÃO”**

5 A presente invenção refere-se a processos para desengomagem e limpeza combinadas de um tecido engomado contendo amido ou derivados de amido, durante a manufatura do tecido, processo este compreendendo incubar dito tecido engomado em uma solução de tratamento aquosa, tendo um pH na faixa entre 1 e 7, solução de tratamento aquosa esta compreendendo uma amilase ácida e pelo menos uma outra enzima ácida facilitando ditas
10 outras etapas de processamento. A presente invenção refere-se ainda a composições usadas em ditos processos e ao uso de dita composição.