



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

(21) PI 0808513-7 A2



* B R P I 0 8 0 8 5 1 3 A 2 *

(22) Data de Depósito: 04/03/2008
(43) Data da Publicação: 19/08/2014
(RPI 2276)

(51) Int.Cl.:
C12N 15/56
C12N 9/28
C12P 19/14
A23L 1/305
C11D 3/386
D06M 16/00

(54) Título: VARIANTES DE ALFA-AMILASE DE ESPÉCIES DE BACILLUS ALCALIFÍLICO, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO VARIANTES DE ALFA-AMILASE E MÉTODOS DE USO

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 09/03/2007 US 60/905,811

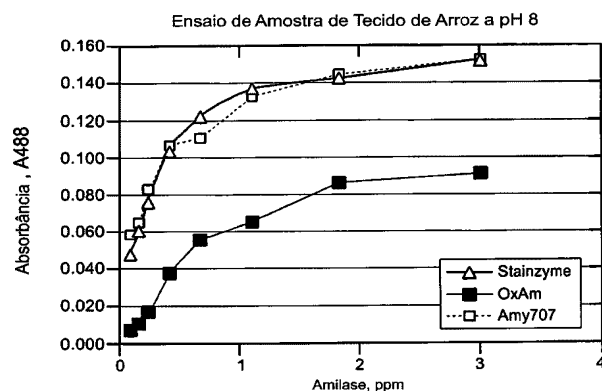
(73) Titular(es): Danisco Us Inc., Genencor Division

(72) Inventor(es): Brian E. Jones, Casper Vroemen, Claudine Chang, Corey Naab, Hans de Nobel, Marc Kolkman, Walter Weyler

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2008055780 de 04/03/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/112459de 18/09/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"VARIANTES DE ALFA-AMILASE DE ESPÉCIES DE *BACILLUS* ALCALIFÍLICO, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO VARIANTES DE ALFA-AMILASE E MÉTODOS DE USO"**.

5 Pedidos Relacionados

Este pedido de patente reivindica prioridade do Pedido de Patente Provisório U.S. No. de Série 60/905,811, intitulado "Alkaliphilic Bacillus Species α -Amylase Variants, Compositions Comprising α -Amylase Variants, And Methods of Use", depositado em 09 de março de 2007.

10 Listagem de Sequência

Encontra-se anexa uma listagem de sequência SEQ ID NOS 1-3, que está aqui incorporada por referência em sua totalidade para todos os fins.

Campo da Invenção

15 A presente invenção refere-se a uma alfa-amilase do *Bacillus* sp. No. 707 e variantes da mesma, assim como composições e usos para as mesmas.

Antecedentes

20 Amido consiste em uma mistura de amilose (15 – 30% p/p) e amilopectina (70 - 85% p/p). Amilose consiste em cadeias lineares de unidades de glicose alfa-1,4-ligadas que têm um peso molecular (PM) de cerca de 60.000 a cerca de 800.000. Amilopectina é um polímero ramificado que contém pontos de ramificações α -1,6 a cada 24 - 30 unidades de glicose, seu PM pode ser tão alto quanto 100 milhões.

25 Açúcares de amido, na forma de xaropes de dextrose concentrados, são atualmente produzidos por um processo catalisado por enzima que envolve: (1) liquefação (ou diluição) de amido sólido com uma alfa-amilase em dextrinas que têm um grau médio de polimerização de cerca de 7 – 10, e (2) sacarificação do amido liquefeito restante (ou seja, hidrolisato
30 de amido) com amiloglicosidase (também chamada glicoamilase ou GA). O xarope resultante tem um alto teor de glicose. Muito do xarope de glicose, que é comercialmente produzido, é subsequentemente enzimaticamente

isomerizado a uma mistura de dextrose/frutose conhecida como isoxarope.

Alfa-amilases (EC 3.2.1.1) hidrolisam amido, glicogênio e polisacarídeos relacionados através da clivagem de ligações alfa-1,4-glicosídicas internas em randômicas. Esta classe de enzima tem um número de aplicações comerciais importantes em, por exemplo, liquefação de amido, desengomagem de têxtil, modificação de amido na indústria de papel e celulose, e para a produção de cerveja. Estas enzimas também podem ser usadas para remover manchas de amido durante lavagem de louça e lavagem de roupa e nas indústrias de açúcar, cerveja, álcool e têxtil. Alfa-amilases são isoladas a partir de uma ampla variedade de fontes bacterianas, fúngicas, vegetais e animais. Industrialmente, muitas alfa-amilases importantes são aquelas isoladas a partir de Bacilos.

Uma alfa-amilase caracterizada é aquela de um *Bacillus* alcalifílico sp. no. 707. *Bacillus* sp. no. 707 produz principalmente cinco tipos de enzimas que exibem atividade de hidrólise de amido. Seus pesos moleculares são estimados serem aproximadamente 110, 95, 85, 75 e 60 kDa. A. Tsukamoto *et al.*, "Nucleotide sequence of the maltohexaose-producing amylase gene from an alkalophilic *Bacillus* sp. #707 and structural similarity to liquefying type α -amylase," *Biochem. & Biophys. Res. Comm.* 151(1): 25-31 (1988). A alfa-amilase identificada tem 518 aminoácidos de comprimento com um peso molecular estimado de 59.007,5 Daltons. Tsukamoto *et al.* (1988). Os primeiros 33 aminoácidos agem como o peptídeo de sinal que está envolvido na secreção de proteína exportada. A forma extracelular teria, portanto, 485 aminoácidos com um peso molecular médio de 55.372 Daltons. O ácido nucleico que codifica a enzima foi clonado e caracterizado como discutido em K. Kimura *et al.*, "Cloning of a gene for maltohexaose producing amylase of an alkalophilic *Bacillus* and hyper-production of the enzyme in *Bacillus subtilis* cells," *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 372-377 (1988). A alfa-amilase é uma amilase G6 ou amilase que produz maltohexaose (E.C. 3.2.1.98) e pertence à família de glicosídeo hidrolase 13. A sequência de aminoácido da alfa-amilase de *Bacillus* sp. no. 707 é 65,5%, 65,9% e 66,3% idêntica àquelas de alfa-amilases de liquefação de *Bacillus amyloliquefaci-*

ens (BAA), *Bacillus licheniformis* (BLA) e *Bacillus stearothermophilus*, respectivamente. R. Kanai et al., "Biochemical and crystallographic analyses of maltohexaose-producing amylase from alkalophilic *Bacillus* sp. 707," *Biochemistry* 43: 14047-14056 (2004). Portanto, presume-se que a amilase G6 de *Bacillus* sp. no. 707 difere estruturalmente daquela de amilases G4. R. Kanai et al. 2004).

Assim, há uma necessidade por variantes de alfa-amilase de *Bacillus* sp. no. 707, em que haja características e/ou taxas de produção melhoradas. Produção aumentada irá levar a, entre outras coisas, custos reduzidos, margens de custo melhoradas, economia da capacidade da planta e produtos de atividade superior. Adicionalmente, atividade específica aumentada pode, do mesmo modo, melhorar as margens de custo através da necessidade de, por exemplo, menos enzima.

Sumário

Deste modo, proporciona-se aqui uma composição e métodos de uso de tais composições usando uma alfa-amilase com características melhoradas para uso nos ditos métodos e composições.

Por exemplo, um aspecto contempla uma composição para lavagem de louça manual ou automática, que compreende uma alfa-amilase de *Bacillus* sp. no.707 ou variante da mesma, e um ou mais de um tensoativo, builder detergente, um agente complexante, um polímero, um sistema alvejante, um estabilizante, um intensificador de espuma, um supressor de espuma, um sabão, um agente anticorrosão, um agente de suspensão de sujeira, um agente de redeposição antissujeira, um corante, um bactericida, um hidrótopo, um inibidor de mancha e um perfume. As composições para lavagem de louça podem ser uma composição usada para lavagem de louça manual ou automática.

Outro aspecto contempla um aditivo para detergente de lavanderia que compreende uma alfa-amilase de *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma.

Outro aspecto contempla um detergente para lavanderia que compreende o aditivo para detergente acima listado, e que adicionalmente

compreende um ou mais do seguinte e um ou mais de um tensoativo, builder detergente, um agente complexante, um polímero, um sistema alvejante, um estabilizante, um intensificador de espuma, um supressor de espuma de sabão, um agente anticorrosão, um agente de suspensão de sujeira, um agente de redeposição antissujeira, um corante, um bactericida, um hidrótopo, um
 5
 10
 15
 20
 25
 30

Ainda outro aspecto contempla um ácido nucleico isolado que codifica uma alfa-amilase de *Bacillus* sp. no. 707 ou uma variante da mesma, em que a variante tem uma substituição ou eliminação de resíduo selecionada a partir do grupo que consiste em substituições de M202, M208, S255, R172 e/ou M261 de SEQ ID NO: 3. A variante M202 pode ser uma variante de substituição selecionada a partir do grupo que consiste em M202L, M202V, M202S, M202T, M202I, M202Q e M202W. A variante S255 pode ser a substituição de S255N. A substituição de R172 pode ser R172Q
 Também contempladas são variantes com combinações destas substituições. Também contemplados são polipeptídeos de alfa-amilase (com e sem a sequência de sinal) com estas substituições na sequência de polipeptídeo

Outro aspecto contempla um vetor que compreende um ácido nucleico que codifica qualquer das variantes acima mencionadas. Também contempladas são células isoladas em que o ácido nucleico é inserido, por exemplo, através de um vetor. A célula hospedeira isolada pode ser um micro-organismo, por exemplo, tal como uma bactéria ou fungo. A bactéria pode ser uma bactéria Gram positiva selecionada a partir do grupo que consiste em *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. thuringiensis*, *Streptomyces lividans* ou *S. murinus*; ou uma bactéria Gram negativa, em que a dita bactéria Gram negativa é uma espécie *Escherichia coli* ou *Pseudomonas*.

Outro aspecto contemplado é o uso dos polipeptídeos descritos aqui para lavagem de louça ou lavagem de lavanderia. Estas variantes de polipeptídeo podem estar opcionalmente na forma de um granulado não dispersivo, microgranulado, líquido estabilizado ou enzima protegida. Outros

pecto contempla que o aditivo para detergente ou composição detergente também compreende uma enzima selecionada a partir do grupo que consiste em: uma celulase, uma protease, uma aciltransferase, uma aminopeptidase, uma amilase, uma carbo-hidrase, uma carboxipeptidase, uma catalase, 5 uma quitinase, uma cutinase, uma ciclodextrina glicosiltransferase, uma desoxirribonuclease, uma esterase, uma α -galactosidase, uma β -galactosidase, uma glicoamilase, α -glicosidase, uma β -glicosidase, uma haloperoxidase, uma invertase, uma lacase, uma lipase, uma manosidase, uma oxidase, uma enzima pectinolítica, uma peptidoglutaminase, uma peroxidase, uma fitase, 10 uma polifenoloxidase, uma enzima proteolítica, uma ribonuclease, uma transglutaminase, uma xilanase, uma pululanase, uma isoamilase, uma carragenase ou qualquer combinação das enzimas. Outras amilases contempladas para uso na composição incluem duas ou mais outras α -amilases, uma β -amilase, uma isoamilase ou uma glicoamilase.

15 Também contemplados são métodos de limpeza de têxteis e louças e outras superfícies duras usando quaisquer das composições acima mencionadas.

Outro aspecto contempla o uso da α -amilase descrita aqui ou qualquer das variantes de α -amilase em uma composição para desengomar 20 têxtil, em que a composição é uma solução aquosa. Também contemplados são métodos de desengomas têxteis usando as ditas composições.

Uma modalidade adicional contempla uma composição para processamento de amido que compreende uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma em uma solução aquosa. Também contemplado é o método de uso de tal composição para processar amido. O método 25 e a composição podem ainda compreender uma glicoamilase, uma isoamilase, uma pululanase, fitase ou uma combinação das mesmas. Ainda, outro aspecto contempla uma composição para hidrólise de biofilme que compreende uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma em uma 30 solução ou gel, e opcionalmente também compreende uma celulase, uma hemicelulase, uma xilanase, uma lipase, uma protease, uma pectinase, um agente antimicrobiano ou qualquer combinação dos mesmos. Também con-

templados são métodos de hidrólise de biofilmes usando as ditas composições.

5 Outro aspecto contemplado é uma composição para sacarificar amido que compreende uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma em uma solução. Portanto, também contemplado é um método de sacarificar amido que compreende administrar a composição da reivindicação 33 por um período suficiente para sacarificar o dito amido.

10 Outro modalidade contemplada é uma composição para liquefazer amido que compreende uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma em uma solução. Também contemplado é um método de liquefação de um amido que compreende administrar a composição de uso de tal composição por um período suficiente para liquefazer o dito amido.

15 Em ainda um outro aspecto, uma composição para assar é contemplada usando uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma em uma solução ou em um gel. Também contemplado é um método de assar usando tal composição para assar.

Breve Descrição dos Desenhos

20 Os desenhos anexos estão incorporados e constituem uma parte deste relatório descritivo, ilustram as modalidades. As figuras são ilustrativas das modalidades descritas.

Figura 1. Ensaio de Amostra de Tecido de Arroz a pH 8,0 comparando Stainzyme® (▲), OxAm (■) (Purastar®), e a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 (□).

25 Figura 2. Ensaio de Amostra de Tecido de Arroz a pH 10,1 comparando Stainzyme® (rosa ■), OxAm (▲) (Purastar®) e a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 (laranja ■).

Figura 3. A Figura 3 ilustra a sequência de DNA que codifica peptídeo de sinal Pre-LAT (SEQ ID NO: 1). A Figura 3 ilustra o gene da α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 nativo (SEQ. ID. NO: 2).

30 Figura 4. Diagrama de plasmídeo pICatH.

Figura 5. Diagrama do plasmídeo pICatH contendo a sequência de gene Amy707.

Figura 6. Ilustra os resultados de um ensaio Terg-o-tometer. Composições detergentes compreendendo Tide Active (1,8 g/L), Tide Inactivated (1,8 g/L) ou AATCC (1,5 g/L) foram testadas na presença de α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 (0,1 ppm) ou Stainzyme® (0,1 ppm). Em algumas amostras, Prime Purafect® (0,5 ppm) também estava presente. O ensaio foi conduzido em um tampão HEPES a 5 mM, com dureza de água de 102,6 mg/l (6 gpg (grãos por galão)), a 23,3°C (74 °F) a um pH de 7,5. As amostras testadas foram coloridas com algodão de amido (EMPA161, 16-02). SRI percentual (% de SRI) significa índice percentual de remoção de mancha ou o percentual de mancha removida a partir de um processo de limpeza. A remoção de mancha foi calculada através da medição de uma amostra de tecido não suja, uma amostra de tecido totalmente suja e a amostra de tecido suja após algum tratamento de limpeza ter sido administrado. As medições são feitas através de reflectometria usando espaço de cor CIEL L*a*b*.

O % de SRI é calculado através de uma razão da diferença entre a cor das amostras limpas e sujas e a diferença entre a cor das amostras não sujas e sujas. "dE" significa a raiz quadrada da soma dos quadrados das diferenças de cada componente de cor no espaço de cor CIEL L*a*b*. Cada cor perceptível pode ser representada por uma coordenada L*a*b* no espaço de cor.

"L*" representa o valor da escala cinza ou clara sobre uma escala de 0 a 100, preto puro a branco puro. "a*" representa o desvio de magenta a verde, e que os valores positivos grandes representam uma tonalidade muito magenta e os valores negativos grandes representam uma tonalidade muito verde. "b*" representa o desvio de amarelo a azul, onde valores positivos grandes representam uma tonalidade muito amarela e valores positivos grandes representam uma tonalidade muito azul. Quando ambos os valores de a* e b* são 0, há uma ausência de cor, deixando cores cinzas puras com sua clareza definida pelo valor L*. As amostras testadas foram ou CS-2 (072, com manchas de cacau), CS-37 (005 com manchas de ovos inteiros), ou algodão de amido colorido (EMPA161, 13,02).

Figura 7. Resultados do ensaio Launder-o-meter conduzido com 5 g/L IEC A* com alvejante, à dureza de água de 205,2 mg/l (12 gpg) e 4,4°C

(40 °F). α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 e Stainzyme® estavam presentes na quantidade de 0,1 ppm. Composições foram testadas em 5 diferentes amostras tingidas.

5 Figura 8. Ilustra o desempenho da lavagem de louça automática sob condições Europeias de α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707, Stainzyme® e OxAm (Purastar®). O desempenho da lavagem para remoção de leite de arroz é medido em capacidade de remoção de sujeira em comparação a mg de proteína ativa.

10 Figura 9. Ilustra o desempenho da lavagem de louça automática sob condições Europeias de α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707, Stainzyme® e OxAm (Purastar®). O desempenho da lavagem para remoção de amido misturado é medido em capacidade de remoção de sujéria em comparação a mg de proteína ativa.

15 Figura 10. Um ensaio foi preparado na variante M202→L (M202L) de α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 na presença ou ausência de alvejante a 20°C. A absorvância do ensaio de limpeza foi medida a 488 nm com quantidade crescente de enzima (medida em partes por milhão, ppm). A variante M202L foi comparada à α -amilase do tipo selvagem do *Bacillus* sp. no. 707.

20 Descrição Detalhada

O seguinte se refere a compostos, composições, métodos de fazer tais compostos e métodos de uso de tais compostos e composições, em que os compostos são uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variantes da mesma. Foi observado que a forma de α -amilases do *Bacillus* sp. no. 25 707, assim como variantes das mesmas possuem um alto desempenho em, por exemplo, testes de lavagem de louça e lavanderia.

A α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 tem um pH ótimo a 8,8 e é estável por uma ampla faixa de pH (isto é, pH 4,7 a 10,8). O polipeptídeo tem uma temperatura ótima de 45°C. A enzima tem atividade em temperaturas inferiores, por exemplo, 15 – 20°C. Após incubação por 30 minutos a 30 temperaturas acima de 55°C, a enzima retém menos do que 20% de sua atividade.

1. Abreviações e Definições

De acordo com esta descrição detalhada, as abreviações e definições a seguir se aplicam. Deve ser notado que, conforme usadas aqui, as formas singulares "um", "uma", e "o", "a" incluem os referentes plurais, a menos que o contexto claramente indique de outra forma. Dessa forma, por exemplo, referência a "uma enzima" inclui uma pluralidade de tais enzimas e referência a "a formulação" inclui referência a uma ou mais formulações e equivalentes das mesmas conhecidas para aqueles versados na técnica, e assim por diante.

A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como comumente entendido por alguém versado na técnica. Os termos a seguir são proporcionados abaixo.

1.1 Definições

"Amilase" se destina a incluir qualquer amilase, tais como glicamilases, α -amilases, β -amilases e α -amilases do tipo selvagem de bactérias tal como *Bacillus* sp., tal como *B. licheniformis* e *B. subtilis*. "Amilase" deve significar uma enzima que é, entre outras coisas, capaz de catalizar a degradação do amido. Amilases são hidrolases que clivam as ligações α -D-(1 \rightarrow 4) O-glicosídicas em amido. De modo geral, α -amilases (EC 3.2.1.1; α -D-(1 \rightarrow 4)-glucano glucano-hidrolase) são definidas como endoenzimas que clivam ligações α -D-(1 \rightarrow 4) O-glicosídicas dentro da molécula de amido em um modo randômico. Em contraste, as exoenzimas amilolíticas, tais como β -amilases (EC 3.2.1.2; α -D-(1 \rightarrow 4)-glucano malto-hidrolase) e algumas amilases específicas de produto como α -amilase maltogênica (EC 3.2.1.133) clivam a molécula de amido da extremidade de não redução do substrato. β -Amilases, α -gliases (EC 3.2.1.20; α -D-glicosídeo glico-hidrolase), glicamilases (EC 3.2.1.3; α -D-(1 \rightarrow 4)-glucano glico-hidrolase) e amilases específicas de produto podem produzir malto-oligossacarídeos de um comprimento específico a partir de amido.

" α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707" é uma α -amilase derivada do *Bacillus* sp.no. 707. O gene que codifica a α -amilase pode ser o gene do tipo

selvagem ou um polinucleotídeo códon-otimizado que codifica a α -amilase. Por "variantes da α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707" se entende uma variante da α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 do tipo selvagem, que inclui uma substituição, adição ou eliminação de sequências da sequência de polipeptídeo principal da *Bacillus* sp. no. 707. A α -amilase madura do *Bacillus* sp. no. 707 é (orientação amino para carbóxi) (SEQ ID NO: 3):

	hhngtngtmm qyfeywlpnd gnhwnrlnsd asnlkskgit avwippawkg	50
	asqndvgyga ydlydlgefn qkgtvrtkyg trsqlqaavt slknngiqvy	100
	gdvmmnhkkgg adatemvrv evnpnnrnge vtgeytieaw trfdfpgrgn	150
10	thssfkwry hfdgvdwqs rrlnnriykf rghgkawdwe vdtengnydy	200
	lmyadidmdh pevvnelrnw gvwyntltgl dgfridavkh ikysftrdwi	250
	nhvrsatgkn mfavaefwkn dlgaienylq ktnwnhsvfd vplhynlyna	300
	sksggnydmr nifngtvvqr hpshavtfvd nhdsqpeeal esfveewfkg	350
	layaltltre qgypsvfygd yygipthgvp amrskidpil earqkyaygk	400
15	qndyldhhni igwtregnta hpnsqglatim sdgaggskwm fvgrnkagqv	450
	wsditgnrtg tvtinadgwg nfvnggsvs iwvnk	485

Como usado aqui, "enzima principal" e "polipeptídeo principal" significa o polipeptídeo do *Bacillus* sp. no. 707. Por "ácido nucleico principal" se entende uma sequência de ácido nucleico que codifica o dito polipeptídeo principal. A α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 pode adicionalmente incluir mutações na sequência de sinal do polipeptídeo principal, ou em outro lugar no polipeptídeo principal da α -amilase. Desse modo, a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 pode estar na forma de uma proteína de fusão que contém um polipeptídeo heterólogo de α -amilase. Também pode incluir quimeras (isto é, a combinação de pelo menos duas alfa-amilases). Por exemplo, a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 pode compreender o peptídeo de sinal de outra α -amilase, tal como *B. licheniformis* (LAT). Veja, por exemplo, Figura 3A, que ilustra uma sequência de codificação para o peptídeo de sinal LAT. Também contemplados são mais de um aminoácido substituído pela primeira alanina (qualquer substituição exceto valina), tal como, por exemplo, uma, duas ou mais treoninas. O termo "variante" é usado permutavelmente com o termo "mutante". Variantes devem incluir polipeptídeos assim como

os ácidos nucleicos que codificam substituições, transversões, inserções e eliminações para a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707. Variantes podem incluir sequências que são complementares às sequências que são capazes de hibridizar as sequências de nucleotídeo apresentadas aqui. Por exemplo, 5 uma sequência de ácido nucleico variante é complementar a sequências capazes de hibridização sob condições estringentes (por exemplo, 50°C e 0,2X SSC {1X SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M citrato e Na₃, pH 7,0}) às sequências de nucleotídeo apresentadas aqui. O termo ácido nucleico variante abrange sequências que são complementares a sequências que são 10 capazes de hibridização sob altas condições estringentes (por exemplo, 65°C e 0,1X SSC {1X SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M citrato de Na₃, pH 7,0}) às sequências de nucleotídeo apresentadas aqui.

Os termos "recuperado", "isolado" e "separado", como usados aqui, se referem a um composto, proteína, célula, ácido nucleico ou aminoácido que é removido de pelo menos um componente com o qual está naturalmente associado e encontrado na natureza. 15

Por "purificado" deve ser entendido que o material está em um estado relativamente puro, por exemplo, pelo menos cerca de 90% puro, ou pelo menos cerca de 95% puro ou pelo menos cerca de 98% puro.

Por "termoestável" deve ser entendida a capacidade da enzima de reter atividade após exposição a temperaturas elevadas. A termoestabilidade de uma enzima, tal como uma enzima α -amilase, é medida por sua meia vida. A meia-vida ($t_{1/2}$) é o tempo em minutos, horas ou dias durante o qual metade da atividade da enzima é perdida sob condições definidas. O 20 valor da meia vida é calculado através da medição da atividade residual da α -amilase. 25

Por "faixa de pH" deve ser entendida a capacidade da enzima de exibir atividade catalítica a partir de condições ácidas a básicas abarcando 5 ou mais unidade de pH.

Conforme usado aqui, "pH estável" se refere à capacidade da enzima de reter atividade por uma ampla faixa de pHs por um período determinado de tempo (por exemplo, 15 min., 30 min., 1 hora). 30

Conforme usada aqui, "sequência de aminoácido" é sinônimo com o termo "polipeptídeo" e/ou o termo "proteína". Em alguns casos, o termo "sequência de aminoácido" é sinônimo com o termo "peptídeo". Em alguns casos, o termo "sequência de aminoácido" é sinônimo com o termo "enzima". O código convencional de uma letra ou três letras para resíduos de aminoácido é usado aqui.

O termo "ácido nucleico" abrange DNA, RNA, de filamento único ou duplo e modificações químicas do mesmo. Os termos "ácido nucleico" e "polinucleotídeo" podem ser usados aqui permutavelmente.

Conforme usado aqui, "sequência de nucleotídeo" ou "sequência de ácido nucleico" se refere a uma sequência de oligonucleotídeo ou sequência de polinucleotídeo que codifica um peptídeo da α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma, e fragmentos e derivados dos mesmos (tais como porções dos mesmos). A sequência de nucleotídeo pode ser de origem genômica, sintética ou recombinante, e pode ser de filamento duplo ou único, ou representando o filamento no senso ou antissenso. Conforme usado aqui, o termo sequência de nucleotídeo inclui DNA genômico, cDNA, DNA sintético e RNA. Por exemplo, o DNA pode ser uma sequência de cDNA que codifica uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma. Visto que o código genético está degenerado, mais do que um códon pode ser usado para codificar um aminoácido particular, e a presente invenção abrange sequências de nucleotídeo que codificam uma sequência de aminoácido em particular.

Por "homólogo", deve ser entendida uma entidade que tem um certo grau de identidade com as sequências de aminoácido em questão e as sequências de nucleotídeo em questão. Uma sequência homóloga é tomada para incluir uma sequência de aminoácido pelo menos 75%, 80%, 85% ou 90% idêntica, ou pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à sequência em questão. Tipicamente, homólogos irão compreender os mesmos sítios ativos como a sequência de aminoácido em questão.

Conforme usado aqui, "hibridização" deve incluir o processo pelo qual um filamento de ácido nucleico se junta com um filamento complemen-

tar através de pareamento de bases, assim como o processo de amplificação como realizado em tecnologias da reação em cadeia de polimerase (PCR). A α -amilase ou ácido nucleico variante da mesma pode existir como DNA ou RNA de filamento único ou duplo, um heterodúplex de RNA/DNA ou um copolímero de RNA/DNA.

Conforme usado aqui, "sintético" deve se referir àquilo que é produzido por síntese enzimática ou química *in vitro*. Isso inclui, mas não está limitado a, ácidos nucleicos que codificam α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variantes da mesma feitos com uso de códon ótimo para organismos hospedeiros, tais como leveduras metilotrópicas *Pichia*, *Hansenula*, *Streptomyces*, *Trichoderma* (por exemplo, *T. reesei*) ou outros hospedeiros de expressão.

Por "dureza de água" deve ser entendida a quantidade de cálcio e magnésio na água para fins de lavagem (1,4 – 1,8 mmol/L) e uma quantidade para fins de lavagem de louça.

Conforme usados aqui, os termos "transformado", "estavelmente transformado" e "transgênico" usados em referência a uma célula significam que a célula tem uma sequência de ácido nucleico não nativa (por exemplo, heteróloga) integrada a seu genoma ou como um plasmídeo episossomal que é mantido através de múltiplas gerações.

O termo "introduzido", no contexto de inserir uma sequência de ácido nucleico em uma célula, significa "transfecção" ou "transformação" ou "transdução" e inclui referência à incorporação de uma sequência de ácido nucleico a uma célula eucariótica ou procariótica, em que a sequência de ácido nucleico pode ser incorporada ao genoma da célula (por exemplo, cromossomo, plasmídeo, plastídeo ou DNA mitocondrial), convertida em uma replicação autônoma ou transitoriamente expressa (por exemplo, mRNA transfetado).

Conforme usada aqui, "célula transformada" deve incluir células que foram geneticamente alteradas através do uso de técnicas de DNA recombinante. Transformação tipicamente ocorre através da inserção de uma ou mais sequências de nucleotídeo em uma célula. A sequência de nucleoti-

deo inserida pode ser uma sequência de nucleotídeo heteróloga (isto é, é uma sequência que não é natural à célula que será transformada, tal como uma sequência de DNA que codifica uma proteína de fusão ou uma sequência não nativa).

5 Conforme usado aqui, "operavelmente ligado" deve significar que os componentes descritos estão em uma relação que os permite funcionar em seu modo pretendido. Uma sequência regulatória operavelmente ligada a uma sequência de codificação está conectada de modo que a expressão da sequência de codificação é alcançada sob condições compatíveis com as
10 sequências de controle.

 Conforme usado aqui, "biologicamente ativo" se refere a uma sequência que tem uma função estrutural similar (porém não necessariamente ao mesmo grau), e/ou função regulatória similar (porém não necessariamente ao mesmo grau) e/ou função bioquímica similar
15 (porém não necessariamente ao mesmo grau) da sequência de ocorrência natural.

 "Cepa hospedeira" ou "célula hospedeira" significa um hospedeiro adequado para um vetor de expressão ou construção de DNA que compreende um polinucleotídeo que codifica uma enzima alfa-amilase
20 variante, de acordo com a presente descrição. Especificamente, cepas hospedeiras são de preferência células bacterianas. Em uma modalidade preferida da invenção, "célula hospedeira" significa tanto as células quanto os protoplastos criados a partir das células de uma cepa microbiana e particularmente um *Bacillus* sp.

25 o termo "marcador seletivo" se refere a um gene capaz de expressão em um hospedeiro que permite a facilidade de seleção daqueles hospedeiros que contêm um vetor ou ácido nucleico introduzido. Exemplos de marcadores selecionáveis incluem, mas não estão limitados a, antimicrobianos (por exemplo, higromicina, bleomicina ou cloranfenicol) e/ou
30 genes que conferem uma vantagem metabólica, tal como uma vantagem nutricional sobre a célula hospedeira.

 O termo "cultura" se refere ao cultivo de uma população de

células microbianas sob condições adequadas em um meio líquido ou sólido. Em uma modalidade, cultura se refere à bioconversão fermentativa de um substrato de amido contendo amido granular em um produto final (tipicamente em um recipiente ou reator). Fermentação é a quebra enzimática e anaeróbica de substâncias orgânicas por micro-organismos para produzir compostos orgânicos mais simples. Embora a fermentação ocorra sob condições anaeróbicas, não há a intenção de que o termo esteja unicamente limitado a condições anaeróbicas estritas, visto que a fermentação também ocorre na presença de oxigênio.

Um "gene" se refere a um segmento de DNA que está envolvido na produção de um polipeptídeo e inclui regiões precedentes e posteriores às regiões de codificação, assim como sequências intervenientes (íntrons) entre segmentos codificadores individuais (éxons).

Um "vetor" se refere a uma sequência de polinucleotídeo designada para introduzir ácidos nucleicos em um ou mais tipos de célula. Vetores incluem vetores de clonagem, vetores de expressão, vetores ponte, plasmídeos, partículas de fago, cassetes e semelhantes.

Um "vetor de expressão", conforme usado aqui, significa uma construção de DNA que compreende uma sequência de DNA que está operavelmente ligada a uma sequência de controle adequada capaz de efetuar expressão do DNA em um hospedeiro adequado. Tais sequências de controle podem incluir um promotor para efetuar transcrição, uma sequência operadora opcional para controlar transcrição, uma sequência que codifica sítios adequados de ligações ribossômicas no mRNA, melhoradores e sequências que controlam o término de transcrição e tradução.

Um "promotor" é uma sequência regulatória que está envolvida na ligação de RNA polimerase para iniciar a transcrição de um gene. O promotor pode ser um promotor induzível ou um promotor constitutivo. Um promotor preferido usado na invenção é alfa-amilase do *Bacillus licheniformis* (AmyL).

O termo "operavelmente ligado" se refere a justaposição, em que os elementos estão em um arranjo que os permite estarem

funcionalmente relacionados. Desse modo, como usado aqui, "operavelmente ligado" significa que os componentes descritos estão em uma relação que os permite funcionar em seus modos pretendidos. Por exemplo, uma sequência regulatória operavelmente ligada a uma sequência de codificação está conectada de modo que a expressão a sequência de codificação é alcançada sob condições compatíveis com as sequências de controle.

"Sob controle transcricional" é um termo bem entendido na técnica que indica que a transcrição de uma sequência de polinucleotídeo, usualmente uma sequência de DNA, depende dela estar operavelmente ligada a um elemento que contribui para a iniciação de, ou promove a transcrição.

"Sob controle translacional" é um termo bem entendido na técnica que indica um processo regulatório que ocorre após mRNA ter sido formado.

Uma "sequência de sinal" significa uma sequência de aminoácidos limite à porção N-terminal de uma proteína, o que facilita a secreção da forma madura da proteína fora da célula. A definição de uma sequência de sinal é uma funcional. A forma madura da proteína extracelular carece da sequência de sinal que é clivada durante o processo de secreção.

Conforme usado aqui quando descrevendo proteínas e genes que as codificam, o termo para o gene fica em itálico, (por exemplo, o gene que codifica amyL (*B. licheniformis* AA) pode ser denotado como *amyL*). O termo para a proteína geralmente não fica em itálico e a primeira letra é geralmente maiúscula, (por exemplo, a proteína codificada pelo gene *amyL* pode ser denotada como AmyL ou amyL). De modo similar, o gene da amilase e proteína do *Bacillus* sp. cepa 707 proporcionados aqui são *amy707* e Amy707, respectivamente.

O termo "heterólogo" com referência a um polinucleotídeo ou proteína se refere a um polinucleotídeo ou proteína que não ocorre naturalmente em uma célula hospedeira. Em algumas modalidades, a proteína é uma proteína industrial comercialmente importante. O termo se destina a

abranger proteínas que são codificadas por genes de ocorrência natural, genes mutados e/ou genes sintéticos.

O termo "endógeno" com referência a um polinucleotídeo ou proteína se refere a um polinucleotídeo ou proteína que ocorre naturalmente na
5 célula hospedeira.

Conforme usado aqui, o termo "expressão" se refere ao processo através do qual um polipeptídeo é produzido com base na sequência de ácido nucleico de um gene. O processo inclui ambas transcrição e tradução.

Conforme usado aqui, o termo "atividade específica" significa
10 uma unidade de enzima definida como o número de mols de substrato convertido em produto através de uma preparação de enzima por unidade de tempo sob condições específicas. Atividade específica é expressa como unidades (U)/mg de proteína.

"ATCC" se refere a *American Type Culture Collection* localizado
15 em Manassas, Va 20108 (ATCC).

"NRRL" se refere ao *Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research* (e anteriormente conhecido como *USDA Northern Regional Research Laboratory*), Peoria, Ill.

Conforme usado aqui, o termo "compreendendo" e seus cognatos são usados em seu sentido inclusivo; ou seja, equivalente ao termo "incluindo" e seus cognatos correspondentes.
20

1.2 Abreviações

As abreviações a seguir se aplicam, a menos que indicado de outra forma:

25	AE	etoxilato de álcool
	AEO	etoxilato de álcool
	AEOS	etoxissulfato de álcool
	AES	etoxissulfato de álcool
	AFAU	unidades de α -amilase fúngica de ácido
30	AGU	unidade de atividade de glicoamilase
	AOS	sulfonato de α -olefina
	AS	sulfato de álcool

	BAA	α -amilase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	BLA	<i>Bacillus licheniformis</i> (ou LAT)
	BSA	albumina de soro bovino
	cDNA	DNA complementar
5	CMC	carboximetilcelulose
	DNA	ácido desoxirribonucleico
	DP3	grau de polimerização com três subunidades
	DPn	grau de polimerização com n subunidades
	DS	sólidos secos
10	DTMPA	ácido dietiltriaminopenta-acético
	EC	comissão de enzima para classificação de enzima
	EDTA	ácido etilenodiaminotetra-acético
	EO	óxido de etileno
	F&HC	tecido e cuidados domésticos
15	FAU	unidade de amilase fúngica
	GA	glicoamilase
	gpg	grãos por galão
	HFCS	xarope de milho de alta frutose
	HFSS	xarope à base de milho de alta frutose
20	IKW	Industrieverband Koerperpflege- und Waschmittel e.V.
	IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
	LAS	alquilbenzenossulfonato linear
	LOM	Launder-O-meter
	LU	unidade de Liquiphon
25	PM	peso molecular
	MWU	unidade Wohlgemuth modificada
	NOBS	nonanoiloxibenzenossulfonato
	NTA	ácido nitrilotriacético
	PCR	reação em cadeia de polimerase
30	PEG	polietilenoglicol
	PVA	poli(vinil álcool)
	PVP	poli(vinilpirrolidona)

	RNA	ácido ribonucleico
	SAS	alcano sulfonatos secundários
	TAED	tetra-acetiletilenodiamina
	TCA	ácido trocloroacético
5	TSB	caldo tríptico de soja
	UFC	concentrado de ultrafiltração
	p/v	peso/volume
	p/p	peso/peso
	wt	tipo selvagem

10 1.3 Nomenclatura

Na presente descrição e reivindicações, os códigos convencionais de uma letra e três letras para resíduos de aminoácido são usados. Para facilidade de referência, variantes de alfa-amilase da invenção são descritas através do uso da nomenclatura a seguir:

15 aminoácido(s) original(ais): posição(ões): aminoácido(s) substituído(s)

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

Ser242Ala ou S242A

20 uma eliminação de alanina na posição 30 é mostrada como:

Ala30* ou A30* ou ΔA30

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

Ala30AlaLys ou A30AK

25 Uma eliminação de um alongamento consecutivo de resíduos de aminoácido, tais como resíduos de aminoácido 30-33, é indicada como (30-33)* ou Δ(A30-N33) ou Δ30-33. Uma eliminação de dois aminoácidos consecutivos, tais como resíduos de aminoácido R180-S181, é indicada como ΔRS ou Δ180-181.

30 Onde uma alfa-amilase específica contém uma "eliminação" em comparação com outras alfa-amilases e uma inserção é feita em tal posição, isto é indicado como:

*36Asp ou *36D

para inserção de um ácido aspártico na posição 36.

Mutações múltiplas são separadas por sinais de mais, isto é:

Ala30Asp+Glu34Ser ou A30N+E34S

5 representam mutações nas posições 30 e 34 substituindo alanina e ácido glutâmico por asparagina e serina, respectivamente.

Quando um ou mais resíduos de aminoácido alternativos podem ser inseridos em uma dada posição, isto é indicado como:

A30N,E ou

10 A30N ou A30E

Além disso, quando uma posição adequada para modificação é identificada aqui sem qualquer modificação específica sendo sugerida, deve ser entendido que qualquer resíduo de aminoácido pode ser substituído pelo resíduo de aminoácido presente na posição. Desse modo, por exemplo, quando uma modificação de uma alanina na posição 30 é mencionada, porém não especificada, deve ser entendido que a alanina pode ser eliminada ou substituída por qualquer outro aminoácido, isto é, qualquer um dentre:

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

Ainda, "A30X" significa qualquer uma das seguintes substituições:

A30R, A30N, A30D, A30C, A30Q, A30E, A30G, A30H, A30I, A30L, A30K, A30M, A30F, A30P, A30S, A30T, A30W, A30Y ou A30 V;

ou em resumo:

A30R,N,D,C,Q,E,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V.

15 Se a enzima principal—usada para a numeração—já tem o resíduo de aminoácido em questão sugerido para substituição naquela posição, a nomenclatura a seguir é usada:

"X30N" ou "X30N,V"

no caso onde, por exemplo, um dentre N ou V está presente no tipo selvagem. Desse modo, significa que outras enzimas principais correspondentes são substituídas por "Asn" ou "Val" na posição 30.

1.4 Características de Resíduos de Aminoácido

Aminoácidos carregados:

Asp, Glu, Arg, Lys, His

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

5 Asp, Glu

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

Arg, Lys, His

Aminoácidos neutros:

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

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

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

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

Thr, Ser, Cys, Gln, Asn

1.5 Homologia (Identidade)

Um polinucleotídeo ou polipeptídeo que tem um certo percentual (por exemplo, 80%, 83%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com outra sequência significa que, quando alinhado, estes percentuais de bases ou resíduos de aminoácido são os mesmos se comparando as duas sequências. Este alinhamento e homologia ou identidade percentual podem ser determinados usando programas de software conhecidos na técnica, por exemplo, aqueles descritos em CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel et al. (eds) 1987, Supplement 30, seção 7.7.18). Programas preferidos incluem o Vector NTI Advance™ 9.0 (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA), GCG Pileup program, FASTA (Pearson et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:2444–2448) e BLAST (BLAST Manual, Altschul et al., Natl Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, Md., e Altschul et al., (1997) *NAR* 25:3389–3402). Outro programa de alinhamento preferido é ALIGN Plus (Scientific

and Educational Software, PA), de preferência usando parâmetros padrão. Outro programa de software de sequência que encontra uso é o TFASTA Data Searching Program disponível no Pacote de Software Sequencial Versão 6.0 (Sequence Software Package Version) (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI).

A homologia pode ser determinada como o grau de identidade entre as duas sequências que indicam uma derivação da primeira sequência a partir da segunda. A homologia pode ser adequadamente determinada por meio de programas de computador conhecidos na técnica, tal como GAP proporcionado no pacote de programa GCG (descrito acima). Desse modo, Gap GCG v8 pode ser usado com matriz de pontuação padrão para identidade e os seguintes parâmetros padrão: penalidade de criação GAP de 5.0 e penalidade de extensão GAP de 0.3, respectivamente para comparação de sequência acídica nucléica, e penalidade de criação GAP de 3.0 e penalidade de extensão GAP de 0.1, respectivamente, para comparação de sequência de proteína. GAP usa o método de Needleman and Wunsch, (1970), J.Mol. Biol. 48:443-453, para fazer alinhamentos e para calcular a identidade.

Um alinhamento estrutural entre Amy707 (SEQ ID NO: 1) e, por exemplo, outra alfa-amilase pode ser usado para identificar posições equivalentes/correspondentes em outras alfa-amilases que têm um alto grau de homologia, por exemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% ou 99%, com Amy707. Um método de obter o dito alinhamento estrutural é usar o programa Pile Up do pacote GCG usando valores padrão de penalidades gap, isto é, uma penalidade de criação gap de 3,0 e penalidade de extensão gap de 0,1. Outros métodos de alinhamento estrutural incluem a análise de cluster hidrofóbica (Gaboriaud et al., (1987), FEBS LETTERS 224, pp. 149-155) e rosca reversa (Huber, T; Torda, AE, PROTEIN SCIENCE Vol. 7, No. 1 pp. 142-149 (1998)).

1.6 Hibridização

A sonda de oligonucleotídeo usada na caracterização de Amy707, acima, pode ser adequadamente preparada à base da sequência de aminoácido ou nucleotídeo total ou parcial da α -amilase em questão.

Condições adequadas para testar a hibridização envolvem pré-impregnação em 5X SSC e pré-hibridização por 1 hora a 40°C em uma solução de formamida a 20%, 5X solução de Denhardt, fosfato de sódio a 40 mM, pH 6,8 e 50 mg de DNA de timo de vitelo sonicado desnaturado, seguida por hibridização na mesma solução suplementada com ATP a 100 mM por 18 horas a 40°C, seguida por lavagem três vezes do filtro em 2X SSC, SDS a 0,2% a 40°C por 30 minutos (baixa estrincência), de preferência a 50°C (média estrincência), mais preferivelmente a 65°C (alta estrincência), ainda mais preferivelmente a 75°C (muito alta estrincência). Mais detalhes sobre o método de hibridização podem ser encontrados em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a. Ed., Cold Spring Harbor, 1989.

No presente contexto, "derivado de" se destina não apenas a indicar uma alfa-amilase produzida ou produzível por uma cepa do organismo em questão, mas também uma alfa-amilase codificada por uma sequência de DNA isolada de tal cepa e produzida em um organismo hospedeiro transformado com a dita sequência de DNA. Finalmente, o termo se destina a indicar uma alfa-amilase, que é codificada por uma sequência de DNA de origem sintética ou de cDNA e que tem as características de identificação da alfa-amilase em questão. O termo também se destina a indicar que a alfa-amilase principal pode ser uma variante de uma alfa-amilase de ocorrência natural, ou seja, uma variante, que é o resultado de uma modificação (inserção, substituição, eliminação) de um ou mais resíduos de aminoácido da alfa-amilase de ocorrência natural.

Aquele versado na técnica irá reconhecer que sequências abrangidas pela invenção também são definidas pela capacidade de hibridizar sob condições estridentes de hibridização com a sequência de *amy707* exemplificada (por exemplo, SEQ ID NO: 3 mostrada na Figura 3). Um ácido nucleico é hibridizável para outra sequência de ácido nucleico quando uma única forma filamentada do ácido nucleico pode anelar para o outro ácido nucleico sob condições apropriadas de temperatura e força iônica da solução. Condições de hibridização e lavagem são bem conhecidas na técnica (Veja, por exemplo, Sambrook (1989) *supra*, particularmente capítulos 9 e

11). Em algumas modalidades, condições estringentes correspondem a uma T_m de 65°C e 0,1xSSC, SDS a 0,1%.

1.7 Alfa-Amilases Principais

De acordo com a presente descrição, alfa-amilase de Amy707, como definida acima, pode ser usada como a alfa-amilase principal (isto é, espinha dorsal). Em uma modalidade preferida, a alfa-amilase principal é derivada de *Bacillus* sp. cepa 707, por exemplo, uma daquelas referidas acima, tal como a alfa-amilase 707 que tem uma sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO: 1 (veja Figura 1).

1.8 Propriedades Alteradas

A seção a seguir descreve a relação entre mutações, que estão presentes em uma variante descrita aqui acima, e alterações desejáveis em propriedades (relativas àquelas de uma alfa-amilase 707 principal), quem pode resultar das mesmas.

Conforme mencionado acima, a invenção se refere a uma alfa-amilase derivada de *Bacillus* sp cepa 707 e mutantes da mesma com propriedades alteradas.

Alfa-amilases 707 principais especificamente contempladas em conexão com as propriedades alteradas especificamente contempladas são a alfa-amilase 707 principal mencionada acima e alfa-amilases híbridas principais que compreendem pelo menos uma porção de uma alfa-amilase 707.

A alfa-amilase do *Bacillus* sp cepa 707 (SEQ ID NO: 1) é usada como o ponto de partida, porém posições correspondentes em outras alfa-amilases de *Bacillus* tendo um alto grau de homologia devem ser entendidas como divulgadas e especificamente contempladas também.

Em um aspecto, a invenção se refere a uma variante com propriedades alteradas, conforme mencionado acima.

No primeiro aspecto, uma variante de uma alfa-amilase de cepa de *Bacillus* sp. principal, compreendendo pelo menos uma, ou pelo menos duas das alterações a seguir:

- (a) truncação do terminal C,
- (b) substituição do aminoácido 202 (isto é, M202), usando SEQ

ID NO: 1 para numeração, ou

(c) eliminação de pelo menos dois resíduos selecionados a partir do grupo que consiste em R181, G182, H182 e G184, usando SEQ ID NO: 1 para numeração, e em que a variante tem atividade de alfa-amilase.

5 1.8.1 Estabilidade

No contexto da variante descrita acima, mutações (incluindo substituições e eliminação de aminoácido) de importância com relação ao alcance de estabilidade alterada (isto é, superior ou inferior), em particular estabilidade melhorada, especialmente em altas temperaturas (isto é, 70 –
10 120°C) e/ou pH extremo (isto é, pH baixo ou alto, isto é, pH 4 – 6 ou pH 8 – 11, respectivamente), em particular em concentrações livres de cálcio (isto é, solto, portanto, em solução) abaixo de 60 ppm, incluem quaisquer das mutações listadas na seção "Propriedades Alteradas". A estabilidade pode ser determinada como descrito na seção "Métodos" abaixo.

15 1.8.2 Estabilidade de Ca²⁺

Estabilidade de Ca²⁺ alterada significa que a capacidade da enzima sob esgotamento de Ca²⁺ foi melhorada, isto é, capacidade superior ou inferior. No contexto das variantes presentemente descritas, mutações (incluindo substituições ou eliminações de aminoácido) de importância com
20 respeito ao alcance da estabilidade de Ca²⁺ alterada, em particular estabilidade de Ca²⁺ melhorada, isto é, estabilidade superior ou inferior, em pH especialmente alto (isto é, pH 8 – 10,5) incluem quaisquer das mutações listadas na seção "Propriedades Alteradas".

1.8.3 Atividade Específica

25 Em um aspecto adicional, mutações importantes (incluindo substituições e eliminações de aminoácido) com respeito à obtenção de variantes que exibem atividade específica alterada, em particular atividade específica aumentada ou diminuída, especialmente em temperaturas de 10 – 60°C, de preferência 20 – 50°C, especialmente 30 – 40°C, incluem quaisquer das mutações listadas na seção "Propriedades Alteradas". A atividade específica
30 pode ser determinada conforme descrito na seção "Métodos" abaixo.

1.8.4 Estabilidade de Oxidação

As variantes descritas podem ter estabilidade de oxidação alterada, em particular estabilidade de oxidação superior, em comparação com a alfa-amilase principal. Estabilidade de oxidação aumentada é vantajosa em, por exemplo, composições detergentes; e estabilidade de oxidação diminuída pode ser vantajosa em composição para liquefação de amido. A estabilidade de oxidação pode ser determinada conforme descrito na seção "Métodos" abaixo.

1.8.5 Perfil de pH Alterado

Posições e mutações importantes com respeito à obtenção de variantes com perfil de pH alterado, em particular atividade melhorada, em pH especialmente alto (isto é, pH 8 – 10,5) ou pH baixo (isto é, pH 4 – 6) incluem mutações de resíduos de aminoácidos próximos aos resíduos de sítio ativo.

Mutações/substituições específicas preferidas são aquelas listadas acima na seção "Propriedades Alteradas" para as posições em questão. Ensaios adequados são descritos na seção "Métodos" abaixo.

1.8.6 Desempenho de Lavagem

Posições e mutações importantes com respeito à obtenção de variantes com desempenho de lavagem melhorado em pH especialmente alto (isto é, pH 8,5 – 11) incluem as mutações/substituições específicas listadas acima na seção "Propriedades Alteradas" para as posições em questão. O desempenho de lavagem pode ser testado conforme descrito na seção "Métodos" abaixo.

2. Alfa-Amilase de *Bacillus* sp. no. 707, Variantes da mesma e Métodos de Produção das mesmas

Assim, um aspecto proporciona sequência de alfa-amilase de *Bacillus* sp. no. 707 na criação de formas recombinantes que incluem outras substituições, eliminações, transversões, inserções de aminoácidos anteriormente determinados, e combinações das mesmas para produzir variantes da α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707. Estas variantes podem ter reforço de produção adicional, estabilidade de pH aumentada, estabilidade de temperatura aumentada, requisitos reduzidos para Ca^{2+} , atividade específica aumen-

tada, desempenho de lavagem ou lavagem de louça aumentado, solubilidade aumentada, estabilidade de armazenamento aumentada ou combinações dos mesmos. Métodos de recombinantemente gerar as variantes podem ser realizados usando as sequências e vetores proporcionados, ou usando outras modalidades conhecida na técnica.

2.1 Clonagem de uma Sequência de DNA que Codifica uma α -Amilase

A sequência de DNA que codifica uma α -amilase principal pode ser isolada a partir de qualquer célula ou micro-organismo que produz a α -amilase em questão, usando vários métodos bem conhecidos na técnica.

10 Primeiro, um DNA genômico e/ou livraria de cDNA deve ser construída usando DNA cromossômico ou RNA mensageiro do organismo que produz a α -amilase a ser estudada. Então, se a sequência de aminoácido da alfa—amilase é conhecida, sondas de olinucleotídeo rotuladas, homólogas podem ser sintetizadas e usadas para identificar clones que codificam α -amilase a partir de uma livraria genômica do organismos em questão. De modo alter-

15 nativo, uma sonda de oligonucleotídeo rotulada contendo sequências homólogas a um gene de α -amilase conhecido pode ser usada como uma sonda para identificar clones que codificam α -amilase, usando condições de hibridização e lavagem de estringência inferior.

20 Ainda, outro método para identificar clones que codificam α -amilase envolve a inserção de fragmentos de DNA genômico em um vetor de expressão, tal como um plasmídeo, bactérias negativas para α -amilase com a livraria de DNA genômico resultante, e então plaquear as bactérias transformadas em ágar contendo um substrato para α -amilase, desse modo

25 deixando que os clones que expressam a α -amilase sejam identificados.

De modo alternativo, a sequência de DNA que codifica a enzima pode ser preparada sinteticamente através de métodos padrão estabelecidos, por exemplo, o método de fosfoamidita descrito por S. L. Beaucage e M. H. Caruthers (1981) ou o método descrito por Matthes *et al.* (1984). No

30 método de fosfoamidita, olinucleotídeos são sintetizados, por exemplo, em um sintetizador de DNA automático, purificados, anelados, conectados ou clonados em vetores apropriados.

Por fim, a sequência de DNA pode ser de origem sintética e genômica mista, de origem de cDNA e sintética mista e de origem de cDNA, preparada através da conexão de fragmentos de origem de cDNA ou genômico, sintético (conforme apropriado, os fragmentos correspondendo a várias partes da sequência de DNA inteira), de acordo com técnicas padrão. A sequência de DNA também pode ser preparada através de reação em cadeia de polimerase (PCR) usando iniciadores específicos, por exemplo, conforme descrito na Patente US No. 4,683,202 ou R. K. Saiki *et al.* (1988).

2.2 Mutagênese direcionada por sítio

Uma vez que uma sequência de DN que codifica uma α -amilase foi isolado, e sítios desejáveis para mutação identificados, mutações podem ser introduzidas usando oligonucleotídeos sintéticos. Estes oligonucleotídeos contêm sequências de nucleotídeo flanqueando os sítios de mutação desejados; nucleotídeos mutantes são inseridos durante síntese de oligonucleotídeo. Em um método específico, uma abertura de filamento único de DNA, unindo a sequência que codifica α -amilase, é criada em um vetor que carrega o gene de α -amilase. Então o nucleotídeo sintético, que porta a mutação desejada, é anelado para uma porção análoga do DNA de filamento único. A abertura restante é então preenchida com DNA polimerase I (fragmento Klenow) e a construção é conectada usando ligase T4. Um exemplo específico deste método é descrito em Moringa *et al* (1984). A Patente US No. 4,760,025 descreve a introdução de oligonucleotídeos que codificam mutações múltiplas através da realização de pequenas alterações do cassete. Entretanto, uma variedade ainda maior de mutações pode ser introduzida de uma vez através do método Morinaga, porque uma multiplicidade de oligonucleotídeos, de vários comprimentos, pode ser introduzida.

Outro método de introduzir mutações em sequências de DNA que codificam α -amilase é descrito em Nelson e Long (1989). Ele envolve a geração de 3 etapas de um fragmento de PCR que contém a mutação desejada introduzida através do uso de um filamento de DNA quimicamente sintetizado como um dos primers nas reações de PCR. A partir do fragmento gerado por PCR, um fragmento de DNA que carrega a mutação pode ser

isolado por clivagem com endonucleases de restrição e reinserido em um plasmídeo de expressão.

3. Produção de Variantes de α -Amilase

Uma sequência de DNA que codifica a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma produzida através de métodos descritos aqui, ou através de quaisquer métodos alternativos conhecidos na técnica, pode ser expressa, em forma de enzima, usando um vetor de expressão que tipicamente inclui sequências de controle que codificam um promotor adequado, operador, sítio de ligação ao ribossomo, sinal de iniciação de tradução e, opcionalmente, um gene repressor e/ou vários genes ativadores.

O vetor de expressão recombinante que carrega a sequência de DNA que codifica uma variante de α -amilase pode ser qualquer vetor que possa ser convenientemente submetido a procedimentos de DNS recombinante, e a escolha de vetor irá muitas vezes depender da célula hospedeira à qual ele deve ser introduzido. Desse modo, o vetor pode ser um vetor de replicação autonomamente, isto é, um vetor que existe como uma entidade extracromossomal, cuja replicação é independente da replicação cromossomal, por exemplo, um plasmídeo, um bacteriófago ou um elemento extracromossomal, minocromossomo ou um cromossomo artificial. De modo alternativo, o vetor pode ser um que, quando introduzido em uma célula hospedeira, é integrado ao genoma da célula hospedeira e se replica com o(s) cromossomo(s) ao qual ele foi integrado. O gene integrado também pode ser amplificado pra criar múltiplas cópias do gene no cromossomo através do uso de uma construção amplificável impulsionada por seleção de antibiótico ou outra pressão seletiva, tal como genes regulatórios essenciais ou por complementação através do efeito de dose de genes essenciais do caminho metabólico.

No vetor, a sequência de DNA deve estar operavelmente conectada a uma sequência promotora adequada. O promotor pode ser qualquer sequência de DNA que exiba atividade transcricional na célula hospedeira de escolha e pode ser derivado de genes que codificam proteínas ou homólogas ou heterólogas à célula hospedeira. Promotores exemplares para dire-

cionar a transcrição da sequência de DNA que codifica uma variante de α -amilase, especialmente em um hospedeiro bacteriano, são os promotores do operon lac de *E. coli*, o gene agarase de *Streptomyces coelicolor* dagA ou promotores celA, os promotores do gene da α -amilase do *Bacillus licheniformis* (amyL), os promotores do gene da amilase maltogênica do *Bacillus stearothermophilus* (amyM), os promotores da α -amilase do *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), os promotores dos genes xylA e xylB do *Bacillus subtilis*, etc. Para transcrição em um hospedeiro fúngico, exemplos de promotores úteis são aqueles derivados do gene que codifica amilase de *Aspergillus oryzae* TAKA, proteinase aspártica de *Rhizomucor miehei*, α -amylase neutra de *Aspergillus niger*, α -amylase estável em ácido de *A. niger*, glicoamilase de *A. niger*, lipase de *Rhizomucor miehei*, protease alcalina de *A. oryzae*, triose fosfato isomerase de *A. oryzae* ou acetamidase de *A. nidulans*. Quando o gene que codifica a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma é expresso em uma espécie bacteriana, tal como *E. coli*, um promotor adequado pode ser selecionado, por exemplo, a partir de um promotor bacteriófago incluindo um promotor T7 e um promotor do fago lambda. Exemplos de promotores adequados para a expressão em uma espécie de levedura incluem, mas não estão limitados aos promotores Gal 1 e Gal 10 de *Saccharomyces cerevisiae* e os promotores AOX1 ou AOX2 de *Pichia pastoris*. Para expressão em *Trichoderma reesei*, o promotor CBHII pode ser usado.

O vetor de expressão também pode compreender um terminador de transcrição adequado e, em eucariontes, sequências de poliadenilação operavelmente conectadas à sequência de DNA que codifica a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma. Sequências de terminação e poliadenilação adequadamente, porém não necessariamente, são derivadas das mesmas fontes que os promotores.

O vetor pode ainda compreender uma sequência de DNA que possibilita que o vetor se replique na célula hospedeira. Exemplos de tais sequências são as origens de replicação de plasmídeos pBR322, pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1, pICatH (Figura 4, Genencor

International, Inc.), pHPLT e pIJ702, assim como vetores construídos a partir de elementos essenciais conhecidos para aqueles versados na técnica.

O vetor também pode compreender um marcador selecionável, por exemplo, um gene cujo produto complementa um defeito na célula hospedeira, tal como os genes *dal* de *B. subtilis* ou *B. licheniformis*, ou um gene que confere resistência a antibiótico, tal como resistência à ampicilina, canamicina, cloranfenicol ou tetraciclina. Além disso, o vetor pode compreender marcadores de seleção de *Aspergillus*, tal como *amdS*, *argB*, *niaD* e *xxsC*, um marcador que origina a resistência à higromicina, ou a seleção pode ser realizada por co-transformação, tal como conhecido na técnica. Veja, por exemplo, Pedido de Patente Publicação Internacional No. WO 91/17243.

Embora a expressão intracelular ou fermentação de estado sólido possa ser vantajosa em alguns aspectos, por exemplo, quando usando certas bactérias ou fungos como células hospedeiras, geralmente a expressão da enzima é extracelular e no meio de cultura. Em geral, a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 e variantes da mesma mencionadas aqui compreendem um formato de polipeptídeo de sinal que permite a secreção da enzima expressa no meio de cultura. Se desejável, o peptídeo do polipeptídeo de sinal pode ser substituído por um polipeptídeo de sinal diferente, convenientemente alcançada pela substituição das sequências de DNA que codificam o polipeptídeo de sinal respectivo. Os polipeptídeos de sinal são tipicamente caracterizados por terem três domínios, um domínio N-terminal, um domínio H e um domínio C-terminal e variam de 18 a 35 resíduos de comprimento. Eles podem ser de qualquer α -amilase de sinal do tipo selvagem ou outra proteína secretada de uma bactéria ou de um eucarionte.

O vetor de expressão tipicamente inclui os componentes de um vetor de clonagem, tal como, por exemplo, um elemento que permite replicação autônoma do vetor no organismo hospedeiro selecionado e um ou mais marcadores fenotipicamente detectáveis para fins de seleção. O vetor de expressão normalmente compreende sequências de nucleotídeo de controle, tal como um promotor, operador, sítio de ligação ao ribossomo, sinal de ini-

ciação de tradução e opcionalmente um gene repressor ou um ou mais genes ativadores. Geralmente, todas as sequências de sinal usadas irão direccionar o material para o meio de cultura de célula para coleção de enzima mais fácil e, se aplicável, purificação.

5 Os procedimentos usados para conectar a construção de DNA que codifica a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707, variante da mesma, o promotor, terminador e outros elementos, respectivamente, e para inseri-los nos vetores adequados que contêm a informação necessária para replicação, são bem conhecidos para pessoas versadas na técnica (cf., por exemplo,
10 Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a. ed., Cold Spring Harbor, 1989 e 3a. ed., 2001).

Uma célula isolada, ou compreendendo um constructo de DNA ou um vetor de expressão, é vantajosamente usada como uma célula hospedeira na produção recombinante da α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou
15 variante da mesma. A célula pode ser transformada com o constructo de DNA que codifica a variante, convenientemente por integração da construção de DNA (em uma ou mais cópias) no cromossomo hospedeiro. Esta integração é geralmente uma vantagem, visto que a sequência de DNA é mais provável de ser estavelmente mantida na célula. A integração dos constructos
20 de DNA no cromossomo hospedeiro pode ser realizada de acordo com métodos convencionais, por exemplo, por recombinação homólogo ou heteróloga. De modo alternativo, a célula pode ser transformada com um vetor de expressão, conforme descrito acima em conexão com diferentes tipos de células hospedeiras.

25 Exemplos de organismos hospedeiros bacterianos adequados são espécies de bactéria Gram positiva, tal como *Bacillaceae*, incluindo *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus thuringiensis*; espécies de *Streptomyces*, tal como *Streptomyces murinus*; espécies bacterianas de ácido láctico incluindo *Lactococcus* spp., tal como *Lactococcus lactis*; *Lactobacillus* spp. incluindo *Lactobacillus reuteri*; *Leuconostoc* spp.; *Pedio-*
30

coccus spp. e *Streptococcus* spp. De modo alternativo, cepas de uma espécie de bactéria Gram negativa pertencente a *Enterobacteriaceae*, incluindo *E. coli*, ou a *Pseudomonadaceae*, podem ser selecionadas como o organismo hospedeiro. Um organismo hospedeiro de levedura adequado pode ser selecionado a partir da espécie de leveduras biotecnologicamente relevante, tal como, porém não limitada a espécie de levedura tal como *Pichia* sp., *Hansenula* sp. ou *Kluyveromyces*, espécie *Yarrowinia* ou uma espécie de *Saccharomyces*, incluindo *Saccharomyces cerevisiae* ou uma espécie pertencente a *Schizosaccharomyces*, tal como, por exemplo, espécie *S. pombe*.

Uma cepa da espécie de levedura metilotrópica *Pichia pastoris* pode ser usada como o organismo hospedeiro. De modo alternativo, o organismo hospedeiro pode ser uma espécie *Hansenula*. Organismos hospedeiros adequados entre fungos filamentosos incluem espécies de *Aspergillus*, por exemplo, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus tubigenensis*, *Aspergillus awamori* ou *Aspergillus nidulans*. De modo alternativo, cepas de uma espécie *Fusarium*, por exemplo, *Fusarium oxysporum* ou de uma espécie *Rhizomucor*, tal como *Rhizomucor miehei*, podem ser usadas como o organismo hospedeiro. Outras cepas adequadas incluem espécies *Thermomyces* e *Mucor*.

Espécies de levedura exemplares incluem uma espécie *Saccharomyces* ou *Schizosaccharomyces*, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. O fungo filamentoso pode vantajosamente pertencer a uma espécie *Aspergillus*, por exemplo, *A. oryzae* ou *A. niger*. Células fúngicas podem ser transformadas por um processo que envolve formação de protoplasto e transformação/transfecção dos protoplastos seguida por regeneração da parede celular de uma maneira conhecida *per se*. Um procedimento adequado para transformação de células hospedeiras de *Aspergillus* inclui, por exemplo, aqueles descritos em EP 238023.

Em ainda um outro aspecto, um método para produzir uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma é proporcionado, cujo método compreende cultivar uma célula hospedeira, conforme descrito acima, sob condições conducentes para a produção da variante e recuperação

da variante a partir das células e/ou meio de cultura.

O meio usado para cultivar as células pode ser qualquer meio convencional adequado para o crescimento da célula hospedeira em questão e obtenção da expressão da α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma. Meios adequados e componentes de meios estão disponíveis a partir de fornecedores comerciais (por exemplo, Difco®) ou podem ser preparados de acordo com receitas publicadas (por exemplo, conforme descrito em catálogos da American Type Culture Collection). O meio usado será aquele mais adequado para a célula hospedeira sendo usada. Por exemplo, os meios discutidos abaixo para cultura de *Bacillus licheniformis*. O meio de crescimento neste caso pode consistir em sólidos de maceração de milho e farinha de soja como fontes de compostos orgânicos, junto com sais inorgânicos como uma fonte de sódio, potássio, fosfato, magnésio e sulfato, assim como elementos traço. Tipicamente, uma fonte de carboidrato tal como glicose também é parte do meio inicial. Uma vez que a cultura se estabeleceu e começa a crescer, o carboidrato é colocado no tanque para manter a cultura, conforme é conhecido na técnica. Amostras são removidas do fermentador em intervalos regulares para medir a titulação de enzima usando, por exemplo, um método de ensaio colorimétrico. O processo de fermentação é pausado quando a taxa de produção de enzima para de aumentar, de acordo com as medições.

Uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma secretada das células hospedeiras pode ser recuperada a partir do meio de cultura através de procedimentos bem conhecidos, incluindo separação das células do meio através de centrifugação ou filtração, e precipitação dos componentes proteínáceos do meio através de um sal, tal como um sulfato de amônio, seguida pelo uso de procedimentos cromatográficos, tal como cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade ou semelhantes.

Células hospedeiras podem ser cultivadas sob condições adequadas que permitam a expressão da α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma. A expressão das proteínas pode ser constitutiva, de modo que elas são continuamente produzidas, ou indutível, que requer um

estímulo para iniciar a expressão, No caso de expressão indutível, a produção de proteína pode ser iniciada quando necessário através, por exemplo, da adição de uma substância indutiva ao meio de cultura, por exemplo, dexametasona, IPTG ou Sefarose. Polipeptídeos também podem ser produzidos recombina-

5 dos recombina-mente em um sistema *in vitro* livre de célula, tal como o sistema de reticulócito de coelho TnT[®] (Promega).

Um hospedeiro que expressa α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma também pode ser cultivado no meio apropriado para o hospedeiro, sob condições aeróbicas. Sacudidas ou uma combinação de

10 agitação e aeração podem ser proporcionadas, com produção ocorrendo na temperatura apropriada para aquele hospedeiro, por exemplo, de cerca de 30°C a cerca de 75°C, dependendo das necessidades do hospedeiro e produção da enzima desejada. A cultura pode ocorrer a partir de cerca de 12 a

15 cerca de 100 horas (e qualquer valor de hora entre eles) ou mais, por exemplo, a partir de 24 a 72 horas, ou alternativamente de 75 horas a cerca de 120 horas. Tipicamente, o caldo de cultura está em um pH de cerca de 5,5 a cerca de 8,0, de novo dependendo das condições de cultura necessárias para a célula hospedeira relativa à produção da enzima.

Ensaio são conhecidos na técnica para determinar a atividade.

20 Veja, por exemplo, a Patente US No. 6,297,037. Por exemplo, um ensaio de substrato solúvel pode ser realizado para determinar a atividade de uma variante. Isto pode ser feito, por exemplo, usando um ensaio de taxa que foi desenvolvido à base de um conjunto de ensaio de ponto final fornecido por Megazyme (Aust.) Pty. Ltd. Substrato (p-nitrofenil malto-heptaosídeo,

25 BPNPG7) é dissolvido em 10 mL de água estéril, seguida por uma diluição de 1 a 4 em tampão de ensaio (tampão de maleato a 50 mM, pH 6,7, cloreto de cálcio a 5 mM, Tween 20 a 0,002 %). Ensaio são realizados adicionando 10 μ L de α -amilase a 790 μ L do substrato em uma cuveta a 25°C. Taxas de hidrólise são medidas como a taxa de troca de absorvância a 410 nm, após

30 um atraso de 75 segundos. O ensaio é tipicamente linear até taxas de 0,4 de unidades de absorvância /min. A concentração de enzima pode ser medida usando, por exemplo, um ensaio Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories) com base

no método de M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72:248 (1976) e usando padrões de albumina de soro bovino.

Outro ensaio que pode ser implementado para avaliar a atividade é um ensaio de hidrólise de amido. Isto pode ser feito, por exemplo, como a seguir. O método padrão para avaliar a atividade da α -amilase de Spezyme® AA20 pode ser usado, ou outras alternativas conhecidas na técnica. O ensaio Spezyme® AA20 é descrito, por exemplo, no Exemplo 1 do Pedido de Patente US No. 07/785,624, incorporado aqui por referência. Amido nativo forma uma cor azul com iodo, porém não forma quando é hidrolisado em moléculas curtas de dextrina. O substrato pode ser 5 g/L de amido Lintner solúvel em tampão de fosfato, pH 6,2 (42,5 gm/litro de di-hidrogênio fosfato de potásio, 3,16 gm/litro de hidróxido de sódio). A amostra é adicionada em cloreto de cálcio a 25 mM e a atividade é medida como o tempo levado para gerar um teste de iodo negativo som incubação a 30°C. A atividade é registrada em liquefons por grama ou mL (LU) calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{LU/mL ou LU/g} = \frac{(570)}{V \times t} \times D$$

onde LU = unidade de liquefon; V = volume de amostra (5 mL); t = tempo de dextrinização (minutos); D = fator de diluição = volume de diluição/mL ou g de enzima adicionada.

20 4. Purificação de Variantes da α -Amilase

Técnicas de fermentação, separação e concentração são conhecidas na técnica e métodos convencionais podem ser usados a fim de preparar a solução concentrada contendo α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma.

25 Após fermentação, um caldo de fermentação é obtido, as células microbianas e diversos sólidos suspensos, incluindo materiais de fermentação brutos residuais, são removidos por técnicas convencionais de separação a fim de obter uma solução contendo enzima. Filtração, centrifugação, microfiltração, filtração rotatória a vácuo, ultrafiltração, extração ou cromatografia ou semelhantes são usados de modo geral.

30

É desejável concentrar a solução contendo enzima a fim de otimizar a recuperação. O uso de soluções não concentradas requer tempo de incubação aumentado a fim de coletar o precipitado contendo enzima purificada.

5 A solução contendo α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma é concentrada usando qualquer meio disponível conhecido na técnica até que o nível de enzima desejado seja obtido. Por exemplo, a concentração da solução contendo enzima pode ser alcançada através de qualquer das técnicas discutidas acima. Por exemplo, evaporação rotatória a
10 vácuo e/ou ultrafiltração ou apenas ultrafiltração pode ser usada.

 Por "agente de precipitação" para fins de purificação se entende um composto eficaz para precipitar a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma da solução concentrada de enzima em forma sólida, qualquer que seja sua natureza, isto é, cristalina, amorfa ou combinação de
15 ambas.

 A precipitação pode ser realizada usando, por exemplo, um agente de precipitação de haleto de metal. Agentes de precipitação de haleto de metal incluem, mas não estão limitados a: cloretos de metal alcalino, brometos de metal alcalino e combinações de dois ou mais destes haletos
20 de metal. Haletos de metal exemplares incluem cloreto de sódio, cloreto de potássio, brometo de sódio, brometo de potássio e combinações de dois ou mais destes haletos de metal. Ou, o haleto de metal pode ser escolhido dentre cloreto de sódio e cloreto de potássio. Para cloreto de sódio, ele pode ser usado tanto como um agente de precipitação de haleto de metal quanto co-
25 mo um conservante.

 O agente de precipitação de haleto de metal é usado em uma quantidade eficaz para precipitar a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma. A seleção de pelo menos uma quantidade eficaz e uma quantidade ótima de haleto de metal eficaz para causar precipitação da en-
30 zima, assim como as condições da precipitação para recuperação máxima incluindo tempo de incubação, pH, temperatura e concentração de enzima, serão prontamente aparentes para aqueles versados na técnica após teste

de rotina.

De modo geral, pelo menos cerca de 5% p/v (peso/volume) a cerca de 25% p/v de haleto de metal são adicionados à solução concentrada contendo enzima, e usualmente pelo menos 8% p/v. Geralmente, não mais do que cerca de 25% p/v de haleto de metal são adicionados à solução concentrada contendo enzima e usualmente não mais do que cerca de 20% p/v. A concentração ótima do agente de precipitação de haleto de metal irá depender, entre outros, da natureza da α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma e sua concentração.

Outra alternativa para realizar a precipitação da enzima é usar compostos orgânicos, que podem ser adicionados para a solução concentrada de enzima. O agente de precipitação de composto orgânico pode incluir: ácido 4-hidroxibenzóico, sais de metal alcalino de ácido 4-hidroxibenzóico, alquil ésteres de ácido 4-hidroxibenzóico e combinações de dois ou mais destes compostos orgânicos. A adição de tais agentes de precipitação de composto orgânico pode ocorrer antes, simultaneamente ou subsequente à adição do agente de precipitação de haleto de metal, e a adição de ambos agentes de precipitação, composto orgânico e haleto de metal, pode ser realizada sequencial ou simultaneamente.

Para descrição adicional, veja, por exemplo, Patente US No. 5,281,526. De modo geral, os agentes de precipitação de composto orgânico são selecionados a partir do grupo que consiste em sais de metal alcalino de ácido 4-hidroxibenzóico, tais como sais de sódio ou potássio, e alquil ésteres de cadeia linear ou ramificada de ácido 4-hidroxibenzóico, em que o grupo alquila contém de 1 a 12 átomos de carbono, e combinações de dois ou mais destes compostos orgânicos. Os agentes de precipitação de composto orgânico pode ser, por exemplo, alquil ésteres de cadeia linear ou ramificada de ácido 4-hidroxibenzóico, em que o grupo alquila contém de 1 a 10 átomos de carbono, e combinações de dois ou mais destes compostos orgânicos. Por exemplo, os compostos orgânicos podem ser alquil ésteres de cadeia linear de ácido 4-hidroxibenzóico, em que o grupo alquila contém de 1 a 6 átomos de carbono, e combinações de dois ou mais destes compostos or-

gânicos. Metil ésteres de ácido 4-hidroxibenzóico, propil éster de ácido 4-hidroxibenzóico, butil éster de ácido 4-hidroxibenzóico, etil éster de ácido 4-hidroxibenzóico e combinações de dois ou mais destes compostos orgânicos também podem ser usadas. Compostos orgânicos adicionais também incluem, mas não estão limitados a, metil éster de ácido 4-hidroxibenzóico (denominado metil PARABENO), propil éster de ácido 4-hidroxibenzóico (denominado propil PARABENO), os quais também são agentes conservantes de amilase.

Adição do dito agente de precipitação de composto orgânico proporciona a vantagem de alta flexibilidade das condições de precipitação com respeito a pH, temperatura, concentração de enzima, concentração de agente de precipitação e tempo de incubação.

O agente de precipitação de composto orgânico é usado em uma quantidade eficaz para aumentar a precipitação da enzima por meio do agente de precipitação de haleto de metal. A seleção de pelo menos uma quantidade eficaz e uma quantidade ótima de agente de precipitação de composto orgânico, assim como as condições da precipitação para recuperação máxima incluindo tempo de incubação, pH, temperatura e concentração de enzima, serão prontamente aparentes para aquele de conhecimento comum na técnica, à luz da presente descrição, após teste de rotina.

De modo geral, pelo menos 0,01% p/v (peso/volume) de agente de precipitação de composto orgânico é adicionado à solução concentrada contendo enzima e usualmente pelo menos 0,02% p/v. De modo geral, não mais do que 0,3% p/v (peso/volume) de agente de precipitação de composto orgânico é adicionado à solução concentrada de enzima e usualmente não mais do que 0,2% p/v.

A solução concentrada de enzima, contendo o agente de precipitação de haleto de metal e o agente de precipitação de composto orgânico, pode ser ajustada para um pH que irá depender da necessidade da enzima a ser purificada. De modo geral, o pH é ajustado a um nível próximo ao ponto isoelétrico da α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma. De modo geral, o pH é ajustado a um pH em uma faixa de cerca de 2,5 unida-

des de pH abaixo do ponto isoelétrico (pI) até cerca de 2,5 unidades de pH acima do ponto isoelétrico. Para fins de ilustração, a solução concentrada contendo enzima pode ser ajustada para um pH entre cerca de 5,5 a 9,7 ou entre cerca de 6,5 a 9,0. Mudanças em faixa de pH para uma α -amilase do

5 Bacillus sp. no. 707 ou variantes da mesma podem ser preparadas de modo similar.

O tempo de incubação necessário para obter um precipitado de enzima purificada depende da natureza da enzima específica, da concentração de enzima e do(s) agente(s) de precipitação específico(s) e sua concen-

10 tração. De modo geral, o tempo eficaz para precipitar a enzima é entre cerca de 1 a cerca de 30 horas; usualmente não excede cerca de 25 horas. Na presença do agente de precipitação de composto orgânico, o tempo de incubação pode ainda ser reduzido a menos do que cerca de 10 horas, e em muitos casos até cerca de 6 horas.

De modo geral, a temperatura durante a incubação é entre cerca de 4°C e cerca de 50°C. Usualmente, o método é realizado a uma temperatura, por exemplo, entre cerca de 10°C e cerca de 45°C, ou entre cerca de 20°C e cerca de 40°C. A temperatura ótima para induzir a precipitação varia de acordo com as condições de solução e a enzima ou agente(s) de precipi-

15 tação usados.

A recuperação total de precipitado de enzima purificada, e a eficiência com a qual é processo é conduzido, é melhorada através da agitação da solução que compreende a enzima, o haleto de metal adicionado e o composto orgânico adicionado. A etapa de agitação é feita tanto durante a

20 adição do haleto de metal e do composto orgânico, quanto durante o período de incubação subsequente. Métodos de agitação adequados incluem agitação ou sacudida mecânica, aeração vigorosa ou qualquer técnica similar.

Após o período de incubação, a enzima purificada e então separada do pigmento dissociado e outras impurezas e coletada por técnicas de

30 separação convencionais, tal como filtração, centrifugação, microfiltração, filtração rotatória a vácuo, ultrafiltração, filtração por pressão, microfiltração através de membrana, microfiltração através de fluxo de membrana ou se-

melhantes. Purificação adicional do precipitado de enzima purificada pode ser obtida através de lavagem do precipitado com água. Por exemplo, o precipitado de enzima purificada é lavado com água contendo o agente de precipitação de haleto de metal ou com água contendo os agentes de precipitação de haleto de metal e composto orgânico.

5 Durante a cultura, a amilase se acumula extracelularmente no caldo de cultura. Para a isolamento e purificação da α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 desejada ou variante da mesma, o caldo de cultura é centrifugado ou filtrado para eliminar células, e o líquido livre de célula resultante é usado para a purificação da enzima. Em uma modalidade, o caldo livre de célula é submetido à salgação usando sulfato de amônio a cerca de 70% de saturação; a fração de precipitação de 70% de saturação é então dissolvida em um tampão e aplicada a uma coluna tal como uma coluna Sephadex G-100, e eluída para recuperar a fração ativa de enzima. Para purificação adicional, um procedimento convencional, tal como cromatografia de troca iônica, pode ser usado. De modo alternativo, agentes de floculação podem ser usados para flocular células ou detritos de células para remover as células e detritos de células por filtração ou centrifugação. Os agentes de floculação podem ser usados sozinhos ou em combinação com haletos de metal ou qualquer dos procedimentos descritos acima. De modo geral, a concentração de enzima pode ser da ordem de 4 g/L ou mais e acima de 25 g/L ou mais em algumas aplicações.

Enzima purificada é útil para todas as aplicações em que as enzimas são geralmente utilizadas. Por exemplo, elas podem ser usadas em detergentes para lavanderia e removedores de nódoa, na indústria de alimentos, no processamento de amido e para assar, e em composições farmacêuticas como auxiliares digestivos. Elas podem ser transformadas em um produto final que é ou líquido (solução, pasta fluida) ou sólido (grânulo, pó). Formulações da α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma são descritas aqui.

Desse modo, a enzima pode ser parcialmente purificada como geralmente descrito aqui. Isto consiste na remoção de células por floculação

com polímeros ou microfiltração por concentração por ultrafiltração usando membranas e materiais disponíveis. Para algumas aplicações, a enzima pode não requerer purificação e cultura de caldo completo pode ser lisada e usada sem tratamento adicional ou ser processada em um grânulo ou microgrânulos.

5. Composições para Limpeza e Lavagem de Louça e Uso

Uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma, discutida aqui, pode ser formulada em composições detergentes para uso em composições para limpeza de louça ou outra limpeza. Estas podem ser em pós ou líquidas. Por exemplo, a composição pode estar na forma de um granulado ou microgranulado. O polipeptídeo pode ainda ser estabilizado de acordo com métodos conhecidos. As composições podem compreender uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma, sozinha, outras enzimas amilolíticas, outras enzimas de limpeza e outros componentes comuns para composições de limpeza.

A composição pode compreender uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma como o componente enzimático principal, por exemplo, uma composição monocomponente. De modo alternativo, a composição pode compreender múltiplas atividades enzimáticas, tal como aminopeptidase, amilase, carbo-hidrase, carboxipeptidase, catalase, celulase, quitinase, cutinase, ciclodextrina glicosiltransferase, desorribonuclease, esterase, α -galactosidase, β -galactosidase, glicoamilase, α -glicosidase, β -glicosidase, haloperoxidase, invertase, lacase, manosidase, oxidase, enzima pectinolítica, peptidoglutaminase, peroxidase, fitase, polifenoloxidase, enzima proteolítica, ribonuclease, transglutaminase ou xilanase. A(s) enzima(s) adicional(ais) pode(m) ser produtivel(eis) por meio de um micro-organismo pertencente ao gênero *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola* e *Fusarium*. Membros exemplares do gênero *Aspergillus* incluem *A. aculeatus*, *A. awamori*, *A. niger* ou *A. oryzae*. Um membro exemplar do gênero *Humicola* inclui *Humicola insolens*; membros exemplares do gênero *Fusarium* incluem *F. bactridioides*, *F. cerealis*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. graminum*, *F. heterosporum*, *F. negundinis*, *F. oxysporum*, *F. reticulatum*, *F.*

roseum, *F. sambucinum*, *F. sarcochroum*, *F. sulphureum*, *F. torulosum*, *F. trichothecioides* e *F. venenatum*.

Desse modo, uma composição detergente para lavagem de louça pode compreender um tensoativo. O tensoativo pode ser aniônico, não
5 iônico, catiônico, anfotérico ou uma mistura destes tipos. O detergente pode conter de 0% a cerca de 90% de um tensoativo não iônico, tais como álcoois de cadeia reta propoxilados etoxilados não espumantes.

Nas aplicações de detergente, uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma pode ser usada em uma composição líquida que
10 contém propileno glicol. Uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma é solubilizada, por exemplo, em propileno glicol através da circulação em uma solução de propileno glicol de 25% de volume/volume contendo cloreto de cálcio a 10%.

A composição detergente pode conter sais de builder detergente
15 de tipos inorgânicos e/ou orgânicos. Os builders detergentes podem ser subdivididos em tipos contendo fósforo e não contendo fósforo. A composição detergente usualmente contém de cerca de 1% a cerca 90% de builders detergentes. Exemplos de builders detergentes alcalinos inorgânicos contendo fósforo, quando presentes, incluem os sais solúveis em água, especialmente pirofosfatos, ortofosfatos e polifosfatos de metal alcalino. Um exemplo
20 de builder detergente alcalino orgânico contendo fósforo, quando presente, inclui os sais solúveis em água de fosfonatos. Exemplos de builders inorgânicos não contendo fósforo, quando presentes, incluem carbonatos, boratos e silicatos de metal alcalino solúveis em água, assim como os vários tipos
25 de silicatos de alumínio cristalino ou amorfo solúvel em água, dos quais zeólitos são os representantes mais conhecidos.

Exemplos de builders orgânicos adequados incluem os metais alcalinos, amônio e amônio substituído, citratos, succinatos, malonatos, sulfonatos de ácido graxo, carboximetóxi succinatos, poliacetatos de amônio,
30 carboxilatos, policarboxilatos, aminopolicarboxilatos, poliacetil carboxilatos e poli-hidroxissulfonatos.

Outros builders orgânicos adequados incluem os polímeros e

copolímeros de peso molecular superior conhecidos por terem propriedades de builder, por exemplo, ácido poliacrílico, copolímeros de ácido polimaleico e poliacrílico/polimaleico apropriados e seus sais.

5 A composição de limpeza pode conter agentes alvejantes do tipo cloro/bromo ou do tipo oxigênio. Exemplos de alvejantes inorgânicos do tipo cloro/bromo são hipocloreto e hipobrometo de lítio, sódio ou cálcio, assim como fosfato de trissódio clorado. Exemplos de alvejantes orgânicos do tipo cloro/bromo são N-bromo e N-cloro imidas, tais como ácidos tricloroisocianúrico, tribromoisocianúrico, dibromoisocianúrico e dicloroisocianúrico, e sais
10 dos mesmos com cátions de solubilização em água, tal como potássio e sódio. Compostos de hidantoína também são adequados.

A composição de limpeza pode conter alvejantes de oxigênio, por exemplo, na forma de um persal inorgânico, e opcionalmente também contendo um precursor de alvejante ou como um composto peróxido de ácido.
15 Exemplos típicos de compostos alvejantes de peróxido são perboratos de metal alcalino, ambos tetra-hidratos e mono-hidratos, percarbonatos, persilicatos e perfosfatos de metal alcalino. Materiais ativadores exemplares incluem TAED e glicerol triacetato.

A composição de limpeza pode ser estabilizada usando agentes
20 de estabilização convencionais para a(s) enzima(s), por exemplo, um poliol, tal como, por exemplo, propileno glicol, um açúcar ou em álcool de açúcar, ácido láctico, ácido bórico ou um derivado de ácido bórico (por exemplo, um éster de borato aromático).

A composição de limpeza também pode conter outros ingredien-
25 tes convencionais de detergente, por exemplo, material defloculante, material de enchimento, depressores de espuma, agentes anticorrosão, agentes de suspensão de sujeira, agentes sequestrantes, agentes de redeposição antissujeira, agentes des-hidratantes, corantes, bactericidas, fluorescentes, espessantes e perfumes.

30 Uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma, que pode ser usada em detergentes para lavagem de louça convencionais, por exemplo, em qualquer dos detergentes descritos em qualquer das publi-

cações de patente a seguir, com a consideração de que a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma pode compreender uma sequência de sinal, por exemplo, de qualquer das α -amilases de *Bacillus* listadas, por exemplo, nas patentes e pedidos de patente a seguir: CA 2006687, GB 2200132, GB 2234980, GB 2228945, DE 3741617, DE 3727911, DE 4212166, DE 4137470, DE 3833047, DE 4205071, WO 93/25651, WO 93/18129, WO 93/04153, WO 92/06157, WO 92/08777, WO 93/21299, WO 93/17089, WO 93/03129, EP 481547, EP 530870, EP 533239, EP 554943, EP 429124, EP 346137, EP 561452, EP 318204, EP 318279, EP 271155, EP 271156, EP 346136, EP 518719, EP 518720, EP 518721, EP 516553, EP 561446, EP 516554, EP 516555, EP 530635, EP 414197, Patente U.S. No. 5,112,518, Patente U.S. No. 5,141,664 e Patente U.S. No. 5,240,632.

Estas composições podem ser usadas em ambas condições de lavagem de louça manual e automática. Formulações exemplares incluem, mas não estão limitadas ao seguinte:

1) COMPOSIÇÃO EM PÓ PARA LAVAGEM DE LOUÇA AUTOMÁTICA: Tensoativo não iônico a 0,4 - 2,5%; metassilicato de sódio a 0 - 20%; dissilicato de sódio a 3 - 20%; trifosfato de sódio a 20 - 40%; carbonato de sódio a 0 - 20%; perborato de sódio a 2 - 9%; tetraacetil etileno diamina (TAED) a 1 - 4%; sulfato de sódio a 5 - 33% e enzimas a 0,0001 - 0,1%.

2) COMPOSIÇÃO EM PÓ PARA LAVAGEM DE LOUÇA AUTOMÁTICA: Tensoativo não iônico (por exemplo, atoxilato de álcool) a 1 - 2%; dissilicato de sódio a 2 - 30%; fosfanato de sódio a 0 - 5%; di-hidrato de citrato de trissódio a 9 - 30%; acetato de nitrilotrissódio (NTA) a 0 - 20%; mono-hidrato de perborato de sódio a 5 - 10%; tetraacetiletilenodiamina (TAED); polímero de poliácrlato a 1 - 2% (por exemplo, copolímero de ácido maleico/ácido acrílico a 6 - 25%); enzimas a 0,0001 - 0,1%; perfume a 0,1 - 0,5% e água a 5% - 10%.

3) COMPOSIÇÃO EM PÓ PARA LAVAGEM DE LOUÇA AUTOMÁTICA: Tensoativo não iônico (por exemplo, etoxilato de álcool) a 1 - 2%; dissilicato de sódio a 2 - 30%; carbonato de sódio a 10 - 50%; fosfonato de sódio a 0 - 5%; di-hidrato de citrato de trissódio a 9 - 30%; nitrilossódio

acetato (NTA) a 0 – 20%; mono-hidrato de perborato de sódio a 5 – 10%; tetraacetiletilenodiamina (TAED) a 1 – 2%; polímero de poliacrilato (por exemplo, copolímero de ácido maleico/ácido acrílico a 6 – 25%); enzimas a 0,0001 – 0,1%; perfume a 0,1 – 0,5% e água a 5% - 10%.

5 4) COMPOSIÇÃO EM PÓ PARA LAVAGEM DE LOUÇA AUTOMÁTICA: Tensoativo não iônico a 1 – 2%; zeólito MAP a 15 – 42%; dissilicato de sódio a 30 – 34%; citrato de sódio a 0 – 12%; carbonato de sódio a 0 – 20%; mono-hidrato de perborato de sódio a 7 – 15%; tetraacetiletilenodiamina (TAED) a 0 – 3%; polímero a 0 – 4%; copolímero de ácido maleico/ácido acrílico a 0 – 5%; fosfonato orgânico a 0 – 4%; argila a 1 – 2%; enzimas a 0,0001 – 0,1%; sulfato de sódio para o equilíbrio da fórmula.

10 5) COMPOSIÇÃO EM PÓ PARA LAVAGEM DE LOUÇA AUTOMÁTICA: Tensoativo não iônico a 1 – 2%; zeólito MAP a 15 – 42%; dissilicato de sódio a 30 – 34%; citrato de sódio a 0 – 12%; carbonato de sódio a 0 – 20%; mono-hidrato de perborato de sódio a 7 – 15%; tetraacetiletilenodiamina (TAED) a 0 – 3%; polímero a 0 – 4%; copolímero de ácido maleico/ácido acrílico a 0 – 5%; fosfonato orgânico a 0 – 4%; argila a 1 – 2%; enzimas a 0,0001 – 0,1%; sulfato de sódio para o equilíbrio da fórmula.

15 6) COMPOSIÇÃO EM PÓ PARA LAVAGEM DE LOUÇA AUTOMÁTICA: Tensoativo não iônico a 1 – 2%; zeólito MAP a 15 – 42%; dissilicato de sódio a 30 – 34%; citrato de sódio a 0 – 12%; carbonato de sódio a 0 – 20%; mono-hidrato de perborato de sódio a 7 – 15%; tetraacetiletilenodiamina (TAED) a 0 – 3%; polímero a 0 – 4%; copolímero de ácido maleico/ácido acrílico a 0 – 5%; fosfonato orgânico a 0 – 4%; argila a 1 – 2%; enzimas a 0,0001 – 0,1%; sulfato de sódio para o equilíbrio da fórmula.

20 7) COMPOSIÇÃO LÍQUIDA NÃO AQUOSA PARA LAVAGEM DE LOUÇA AUTOMÁTICA: Tensoativo não iônico líquido (por exemplo, etoxilatos de álcool) a 2,0 – 10,0%; silicato de metal alcalino a 3,0 – 15,0%; fosfato de metal alcalino a 20,0 – 40,0%; carreador líquido selecionado a partir de glicóis superiores, poliglicóis a 25,0 – 45,0%; polióxidos, estabilizador de glicol éter (por exemplo, um éster parcial de ácido fosfórico e um C₁₆-C₁₈ alcanol a 0,5 – 7,0%); supressor de espuma (por exemplo, silicone) a 0 –

1,5%; e enzimas a 0,0001 – 0,1%.

8) COMPOSIÇÃO LÍQUIDA NÃO AQUOSA PARA LAVAGEM DE LOUÇA: Tensoativo não iônico líquido (por exemplo, etoxilatos de álcool) a 2,0 – 40,0%; silicato de sódio a 3,0 – 15,0%; carbonato de metal alcalino a 7,0 – 20,0%; citrato de sódio a 0,0 – 1,5%; sistema de estabilização (por exemplo, misturas de silicone finamente dividido e dialquil poliglicol éteres de baixo peso molecular a 0,5 – 7,0%); polímero de poliacrilato de baixo peso molecular a 5,0 – 15,0%; espessante gel de argila (por exemplo, bentonita) a 0,0 – 10,0%; polímero de hidroxipropil celulose a 0,0 – 0,6%; enzimas a 0,0001 – 0,1%; e um carreador líquido selecionado a partir de licóis superiores, poli glicóis de equilíbrio, polióxidos e glicol éteres.

9) COMPOSIÇÃO LÍQUIDA NÃO AQUOSA PARA LAVAGEM DE LOUÇA: Tensoativo não iônico líquido (por exemplo, etoxilatos de álcool) a 2,0 – 40,0%; silicato de sódio a 3,0 – 15,0%; carbonato de metal alcalino a 7,0 – 20,0%; citrato de sódio a 0,0 – 1,5%; sistema de estabilização (por exemplo, misturas de silicone finamente dividido e dialquil poliglicol éteres de baixo peso molecular a 0,5 – 7,0%); polímero de poliacrilato de baixo peso molecular a 5,0 – 15,0%; espessante gel de argila (por exemplo, bentonita) a 0,0 – 10,0%; polímero de hidroxipropil celulose a 0,0 – 0,6%; enzimas a 0,0001 – 0,1%; carreador líquido selecionado a partir de glicóis superiores, poli glicóis de equilíbrio, polióxidos e glicol éteres.

10) COMPOSIÇÃO LÍQUIDA PARA LAVAGEM DE LOUÇA AUTOMÁTICA: Etoxilato de álcool a 0 – 20%; éster sulfonato de ácido graxo a 0 – 30%; dodecil sulfato de sódio a 0 – 20%; alquil poliglicosídeo a 0 – 21%; ácido oleico a 0 – 10%; mono-hidrato de dissilicato de sódio a 18 – 33%; di-hidrato de citrato de sódio a 18 – 33%; estearato de sódio a 0 – 2,5%; mono-hidrato de perborato de sódio a 0 – 13%; tetraacetiletlenodiamina (TAED) a 0 – 8%; copolímero de ácido maleico/ácido acrílico a 4 – 8% e enzimas a 0,0001 – 0,1%.

11) COMPOSIÇÃO LÍQUIDA PARA LAVAGEM DE LOUÇA AUTOMÁTICA: Etoxilato de álcool a 0 – 20%; éster sulfonato de ácido graxo a 0 – 30%; dodecil sulfato de sódio a 0 – 20%; alquil poliglicosídeo a 0 – 21%;

ácido oleico a 0 – 10%; mono-hidrato de dissilicato de sódio a 18 – 33%; di-
hidrato de citrato de sódio a 18 – 33%; estearato de sódio a 0 – 2,5%; mono-
hidrato de perborato de sódio a 0 – 13%; tetraacetililenodiamina (TAED) a
0 – 8%; copolímero de ácido maleico/ácido acrílico a 4 – 8% e enzimas a
5 0,0001 – 0,1%.

12) Composições para lavagem de louça automática como des-
critas em 1), 2), 3), 4), 6) e 10), em que o perborato é substituído por percar-
bonato.

13) Composições para lavagem de louça automática como des-
critas em 1) – 6), que adicionalmente contêm um catalisador de manganês.

6. Composições Detergentes para Lavanderia e Uso

De acordo com a modalidade, uma ou mais α -amilases do *Bacil-*
lus sp. no. 707 ou variantes das mesmas podem tipicamente ser um compo-
nente de uma composição detergente para lavanderia. Como tal, ela pode
15 ser incluída na composição detergente na forma de um granulado não dis-
persivo, um líquido estabilizado ou uma enzima protegida. As formulações
secas podem estar na forma de um granulado ou microgranulado. Granula-
dos não dispersivos podem ser produzidos, por exemplo, como descrito nas
Patentes US Nos. 4,106,991 e 4,661,452 e podem opcionalmente serem
20 revestidos através de métodos conhecidos na técnica. Exemplos de materi-
ais de revestimento ceroso são produtos de poli(óxido de etileno) (polietile-
noglicol, PEG) com pesos moleculares médios de 1.000 a 20.000; nonilfe-
nóis etoxilados tendo de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; álcoois gra-
xos etoxilados em que o álcool contém de 12 a 20 átomos de carbono e em
25 que existem 15 – 80 unidades de óxido de etileno; álcoois graxos; ácidos
graxos; e mono e di e triglicerídeos de ácidos graxos. Exemplos de materiais
de revestimento formadores de filme adequados para aplicação por técnicas
de leite fluidizado são dados em, por exemplo, Patente GB No. 1483591.
Preparações de enzima líquidas podem, por exemplo, ser estabilizados atra-
30 vés da adição de um poliálcool tal como propileno glicol, um açúcar ou álcool de
açúcar, ácido láctico ou ácido bórico, de acordo com métodos estabelecidos.
Outros estabilizantes de enzima são bem conhecidos na técnica. Enzimas

protegidas podem ser preparadas de acordo com o método descritos em, por exemplo, Pedido de Patente EP No. 238,216. Polióis têm sido há muito tempo reconhecidos como estabilizantes de proteínas, assim como melhoradores da solubilidade de proteínas. Veja, por exemplo, J. K. Kaushik et al.,
 5 "Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose," *J. Biol. Chem.* 278: 26458-65 (2003) e as referências citadas aqui; e Monica Conti et al., "Capillary isoelectric focusing: the problem of protein solubility," *J. Chromatography* 757: 237-245 (1997).

10 A composição pode compreender uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variantes da mesma como o elemento principal, por exemplo, uma composição monocomponente. De modo alternativo, a composição pode compreender múltiplas atividades enzimáticas, tal como aminopeptidase, amilase, carbo-hidrase, carboxipeptidase, catalase, celulase, quitinase, cuti-
 15 nase, ciclodextrina glicosiltransferase, desoxirribonuclease, esterase, α -galactosidase, β -galactosidase, glicoamilase, α -glicosidase, β -glicosidase, haloperoxidase, invertase, lacase, lipase, manosidase, oxidase, enzima pectinolítica, peptidoglutaminase, peroxidase, fitase, polifenoloxidase, enzima proteolítica, ribonuclease, transglutaminase ou xilanase, assim como outras
 20 enzimas discutidas acima. A(S) enzima(s) adicional(ais) podem(m) ser produtível(eis) por meio de um micro-organismo pertencente aos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola* (por exemplo, *H. insolens*) e *Fusarium*. Membros exemplares do gênero *Aspergillus* incluem *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* ou *Aspergillus oryzae*. Membros e-
 25 xemplares do gênero *Fusarium* incluem *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundinis*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium toru-
 30 losum*, *Fusarium trichothecioides* e *Fusarium venenatum*.

A composição detergente pode estar em qualquer forma útil, por exemplo, pós, grânulos, pastas ou líquidos. Um detergente líquido pode ser

aquoso, tipicamente contendo até cerca de 70% de água e 0% a cerca de 30% de solvente orgânico. Ele também pode estar na forma de um tipo de gel compacto, contendo apenas cerca de 30% de água. Enzimas podem ser usadas em qualquer composição detergente compatível com a estabilidade da enzima. Enzimas podem ser protegidas contra componentes deletérios em geral através de formas conhecidas de encapsulamento como, por exemplo, por granulação ou sequestro em hidrogéis. Enzimas e especificamente α -amilases são não limitadas a aplicações de lavagem de louça e lavanderia, porém também podem ser usadas em limpadores de superfície, produção de etanol a partir de amido ou biomassa.

A composição detergente compreende um ou mais tensoativos, cada um dos quais pode ser aniônico, não iônico, catiônico ou zwitteriônico. O detergente irá usualmente conter 0% a cerca de 50% de tensoativos aniônicos, tal como alquilbenzenossulfonato linear (LAS); sulfonato de α -olefin (AOS); sulfato de alquila (sulfato de álcool graxo (AS); etoxissulfato de álcool (AEOS ou AES); alcanossulfonatos secundários (SAS); metil ésteres de ácido α -sulfo graxo; ácido alquil ou alquênilsuccínico; ou sabão. A composição também pode conter 0% a cerca de 40% de tensoativo não iônico, tal como etoxilato de álcool (AEO ou AE), etoxilados de álcool carboxilado, nonilfenol etoxilatos, alquilpoliglicosídeo, alquildimetilaminaóxido, monoetalamida de ácido graxo etoxilado, monoetanolamida de ácido graxo ou polihidróxi alquil amida de ácido graxo (como descrito, por exemplo, em WO 95/06154).

A composição detergente pode adicionalmente compreender uma ou mais enzimas, tal como lipase, cutinase, protease, celulase, peroxidase e/ou lacase em qualquer combinação.

O detergente pode opcionalmene conter cerca de 1% a cerca de 65% de um builder detergente ou agente complexante, tal como zeólito, difosfato, trifosfato, fosfonato, citrato, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido etilenodiaminatetra-acético (EDTA), ácido dietilenotriaminapenta-acético (DTM-PA), ácido alquil ou alquênilsuccínico, silicatos solúveis ou silicatos em camada (por exemplo, SKS-6 da Hoechst). O detergente também pode ser un-built, isto é, essencialmente livre de builder detergente.

O detergente pode opcionalmente compreender um ou mais polímeros. Exemplos incluem carboximetilcelulose (CMC), poli(vinilpirrolidona) (PVP), polietilenoglicol (PEG), poli(vinil álcool) (PVA), policarboxilatos, tais como poliacrilatos, copolímeros de ácido maleico/acrílico e copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.

O detergente pode opcionalmente conter um sistema alvejante, que pode compreender uma fonte de H_2O_2 , tal como perborato ou percarbonato, que pode ser combinada com um ativador de alvejante formador de perácido, tal como tetraacetililenodiamina (TAED) ou nonanoiloxibenzenossulfonato (NOBS). De modo alternativo, o sistema alvejante pode compreender peroxiácidos de, por exemplo, do tipo amida, imida ou sulfona. O sistema alvejante também pode ser um sistema alvejante enzimático, onde uma per-hidrolase ativa peróxido, como descrito em, por exemplo, WO 2005/156783.

As enzimas da composição detergente podem ser estabilizadas usando agentes estabilizantes convencionais, por exemplo, um poliol, tal como propileno glicol ou glicerol, um açúcar ou álcool de açúcar; ácido láctico; ácido bórico ou um derivado de ácido bórico, tal como, por exemplo, um borato éster aromático; e a composição pode ser formulada conforme descrito em, por exemplo, WO 92/19709 e WO 92/19708.

O detergente também pode conter outros ingredientes convencionais de detergente, tais como, por exemplo, condicionadores para tecido incluindo argilas, intensificadores de espuma, supressores de espuma de sabão, agentes anticorrosão, agentes de suspensão de sujeira, agentes de redeposição antissujeira, corantes, bactericidas, brilhantadores óticos ou perfume.

O pH (medido em solução aquosa em concentração de uso) é usualmente neutro ou alcalino, por exemplo, pH de cerca de 7,0 a cerca de 11,0.

Formas particulares de composições detergentes que compreendem uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma podem ser formuladas para incluir:

1) Uma composição detergente formulada como um granulado que tem uma densidade de volume de pelo menos 600 g/L compreendendo alquilbenzenossulfonato linear (calculado como ácido) a cerca de 7% até cerca de 12%; etoxissulfato de álcool (por exemplo, C₁₂₋₁₈ álcool, 1-2 óxido de etileno (EO)) ou sulfato de alquila (por exemplo, C₁₆₋₁₈) a cerca de 1% até cerca de 4%; etoxilato de álcool (por exemplo, C₁₄₋₁₅ álcool, 7 EO) a cerca de 5% até cerca de 9%; carbonato de sódio (por exemplo, Na₂CO₃) a cerca de 14% até cerca de 20%; silicato solúvel (por exemplo, Na₂O, 2SiO₂) a cerca de 2 até cerca de 6%; zeólito (por exemplo, NaA1SiO₄) a cerca de 15% até cerca de 22%; sulfato de sódio (por exemplo, Na₂SO₄) a cerca de 0% até cerca de 6%; citrato de sódio/ácido cítrico (por exemplo, C₆H₅Na₃O₇/C₆H₈O₇) a cerca de 0% até cerca de 15%; perborato de sódio (por exemplo, Na-BO₃H₂O) a cerca de 11% até cerca de 18%; TAED a cerca de 2% até cerca de 6%; carboximetilcelulose (CMC) a 0% até cerca de 2%; polímeros (por exemplo, ácido maleico/acrílico, copolímero, PVP, PEG) a 0 - 3%; enzimas (calculadas como enzima pura) a 0,0001 – 0,1% proteína; e ingredientes menores (por exemplo, supressores de espuma de sabão, perfumes, abri-lhantadore ótico, fotoalvejante) a 0 - 5%.

2) Uma composição detergente formulada como um granulado que tem uma densidade de volume de pelo menos 600 g/L compreendendo alquilbenzenossulfonato linear (calculado como ácido) a cerca de 6% até cerca de 11%; etoxissulfato de álcool (por exemplo, C₁₂₋₁₈ álcool, 1-2 EO) ou sulfato de alquila (por exemplo, C₁₆₋₁₈) a cerca de 1% até cerca de 3%; etoxilato de álcool (por exemplo, C₁₄₋₁₅ álcool, 7 EO) a cerca de 5% até cerca de 9%; carbonato de sódio (por exemplo, Na₂CO₃) a cerca de 15% até cerca de 21%; silicato solúvel (por exemplo, Na₂O, 2SiO₂) a cerca de 1 até cerca de 4%; zeólito (por exemplo, NaA1SiO₄) a cerca de 24% até cerca de 34%; sulfato de sódio (por exemplo, Na₂SO₄) a cerca de 4% até cerca de 10%; citrato de sódio/ácido cítrico (por exemplo, C₆H₅Na₃O₇/C₆H₈O₇) a cerca de 0% até cerca de 15%; carboximetilcelulose (CMC) a 0% até cerca de 2%; polímeros (por exemplo, copolímero de ácido maleico/acrílico, PVP, PEG) a 1 - 6%; enzimas (calculadas como proteína de enzima pura) a 0,0001 – 0,1% protei-

na; ingredientes menores (por exemplo, supressores de espuma de sabão, perfumes) a 0 - 5%.

3) Uma composição detergente formulada como um granulado que tem uma densidade de volume de pelo menos 600 g/L compreendendo

5 alquilbenzenossulfonato linear (calculado como ácido) a cerca de 5% até cerca de 9%; etoxilato de álcool (por exemplo, C₁₂₋₁₅ álcool, 7 EO) a cerca de 7% até cerca de 14%; Sabão como ácido graxo (por exemplo, C₁₆₋₂₂ ácido graxo) a cerca de 1 até cerca de 3%; carbonato de sódio (como Na₂CO₃) a cerca de 10% até cerca de 17%; silicato solúvel (por exemplo, Na₂O, 2SiO₂)

10 a cerca de 3% até cerca de 9%; zeólito (como NaA1SiO₄) a cerca de 23% até cerca de 33%; sulfato de sódio (por exemplo, Na₂SO₄) a 0% até cerca de 4%; perborato de sódio (por exemplo, NaBO₃H₂O) a cerca de 8% até cerca de 16%; TAED a cerca de 2% até cerca de 8%; fosfonato (por exemplo, EDTMPA) a 0% até cerca de 1%; carboximetilcelulose (CMC) a 0% até cerca de 2%;

15 polímeros (por exemplo, copolímero de ácido maleico/acrílico, PVP, PEG) a 0 - 3%; enzimas (calculadas como proteína de enzima pura) a 0,0001 – 0,1%; ingredientes menores (por exemplo, supressores de espuma de sabão, perfume, abrillantador ótico) a 0 - 5%.

4) Uma composição detergente formulada como um granulado

20 que tem uma densidade de volume de pelo menos 600 g/L compreendendo alquilbenzenossulfonato linear (calculado como ácido) a cerca de 8% até cerca de 12%; etoxilato de álcool (por exemplo, C₁₂₋₁₅ álcool, 7 EO) a cerca de 10% até cerca de 25%; carbonato de sódio (como Na₂CO₃) a cerca de 14% até cerca de 22%; silicato solúvel (por exemplo, Na₂O, 2SiO₂) a cerca

25 de 1% até cerca de 5%; zeólito (por exemplo, NaA1SiO₄) a cerca de 25% até cerca de 35%; sulfato de sódio (por exemplo, Na₂SO₄) a 0% até cerca de 10%; carboximetilcelulose (CMC) a 0% até cerca de 2%; polímeros (por exemplo, copolímero de ácido maleico/acrílico, PVP, PEG) a 1 - 3%; enzimas (calculadas como proteína de enzima pura) a 0,0001 – 0,1% e ingredientes

30 menores (por exemplo, supressores de espuma de sabão, perfume) a 0 - 5%.

5) Uma composição detergente líquida aquosa compreendendo

alquilbenzenossulfonato linear (calculado como ácido) a cerca de 15% até cerca de 21%; etoxilato de álcool (por exemplo, C₁₂₋₁₅ álcool, 7 EO ou C₁₂₋₁₅ álcool, 5 EO) a cerca de 12% até cerca de 18%; sabão como ácido graxo (por exemplo, ácido oleico) a cerca de 3% até cerca de 13%; ácido alquenil-succínico (C₁₂₋₁₄) a 0% até cerca de 13%; aminoetanol a cerca de 8% até cerca de 18%; ácido cítrico a cerca de 2% até cerca de 8%; fosfonato a 0% até cerca de 3%; polímeros (por exemplo, PVP, PEG) a 0% até cerca de 3%; borato (por exemplo, B₄O₇) a 0% até cerca de 2%; etanol a 0% até cerca de 3%; propileno glicol a cerca de 8% até cerca de 14%; enzimas (calculadas como proteína de enzima pura) a 0,0001 – 0,1% e ingredientes menores (por exemplo, dispersantes, supressores de espuma de sabão, perfume, abri-
lhantador ótico) a 0 - 5%.

6) Composição detergente líquida estruturada aquosa compreendendo alquilbenzenossulfonato linear (calculado como ácido) a cerca de 15% até cerca de 21%; etoxilato de álcool (por exemplo, C₁₂₋₁₅ álcool, 7 EO ou C₁₂₋₁₅ álcool, 5 EO) a 3 - 9%; sabão como ácido graxo (por exemplo, ácido oleico) a cerca de 3% até cerca de 10%; zeólito (como NaA1SiO₄) a cerca de 14% até cerca de 22%; citrato de potássio a cerca de 9% até cerca de 18%; borato (por exemplo, B₄O₇) a 0% até cerca de 2%; carboximetilcelulose (CMC) a 0% até cerca de 2%; polímeros (por exemplo, PEG, PVP) a 0% até cerca de 3%; polímeros de ancoragem tal como, por exemplo, copolímero de lauril metacrilato/ácido acrílico; razão molar 25:1, PM 3800) a 0% até cerca de 3%; glicerol a 0% até cerca de 5%; enzimas (calculadas como proteína de enzima pura) a 0,0001 – 0,1% e ingredientes menores (por exemplo, dispersantes, supressores de espuma de sabão, perfume, abri-
lhantadores óticos) a 0 - 5%.

7) Composição detergente formulada como um granulado que tem uma densidade de volume de pelo menos 600 g/L compreendendo sulfato de álcool graxo a cerca de 5% até cerca de 10%; monoetanolamida de ácido graxo etoxilado a cerca de 3% até cerca de 9%; sabão como ácido graxo a 0 – 3%; carbonato de sódio (por exemplo, Na₂CO₃) a cerca de 5% até cerca de 10%; Silicato solúvel (por exemplo, Na₂O, 2SiO₂) a cerca de 1%

até cerca de 4%; zeólito (por exemplo, $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$) a cerca de 20% até cerca de 40%; Sulfato de sódio (por exemplo, Na_2SO_4) a cerca de 2% até cerca de 8%; perborato de sódio (por exemplo, $\text{NaBO}_3\text{H}_2\text{O}$) a cerca de 12% até cerca de 18%; TAED a cerca de 2% até cerca de 7%; polímeros (por exemplo, copolímero de ácido maleico/acrílico, PEG) a cerca de 1% até cerca de 5%;
5 enzimas (calculadas como proteína de enzima pura) a 0,0001 – 0,1% e ingredientes menores (por exemplo, abrillantador ótico, supressores de espuma de sabão, perfume,) a 0 - 5%.

8) Composição detergente formulada como um granulado compreendendo alquilbenzenossulfonato linear (calculado como ácido) a cerca de 8% até cerca de 14%; monoetanolamida de ácido graxo etoxilado a cerca de 5% até cerca de 11%; sabão como ácido graxo a 0 até cerca de 3%; carbonato de sódio (por exemplo, Na_2CO_3) a cerca de 4% até cerca de 10%; silicato solúvel (Na_2O , 2SiO_2) a cerca de 1% até cerca de 4%; zeólito (por exemplo, $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$) a cerca de 30% até cerca de 50%; sulfato de sódio (por exemplo, Na_2SO_4) a cerca de 3% até cerca de 11%; citrato de sódio (por exemplo, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) a cerca de 5% até cerca de 12%; polímeros (por exemplo, PVP, copolímero de ácido maleico/acrílico, PEG) a cerca de 1% até cerca de 5%; enzimas (calculadas como proteína de enzima pura) a 0,0001
15 – 0,1% e ingredientes menores (por exemplo, supressores de espuma de sabão, perfume,) a 0 - 5%.

9) Composição detergente formulada como um granulado compreendendo alquilbenzenossulfonato linear (calculado como ácido) a cerca de 6% até cerca de 12%; tensoativo não iônico a cerca de 1% até cerca de 4%; sabão como ácido graxo a cerca de 2% até cerca de 6%; carbonato de sódio (por exemplo, Na_2CO_3) a cerca de 14% até cerca de 22%; zeólito (por exemplo, $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$) a cerca de 18% até cerca de 32%; sulfato de sódio (por exemplo, Na_2SO_4) a cerca de 5% até cerca de 20%; citrato de sódio (por exemplo, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) a cerca de 3% até cerca de 8%; perborato de sódio
20 (por exemplo, $\text{NaBO}_3\text{H}_2\text{O}$) a cerca de 4% até cerca de 9%; ativador de alvejante (por exemplo, NOBS ou TAED) a cerca de 1% até cerca de 5%; carboximetilcelulose (CMC) a 0% até cerca de 2%; polímeros (por exemplo, poli-

carboxilato ou PEG) a cerca de 1% até cerca de 5%; enzimas (calculadas como proteína de enzima pura) a 0,0001 – 0,1% e ingredientes menores (por exemplo, abrillantador ótico, perfume,) a 0 - 5%.

5 10) Composição detergente líquida aquosa compreendendo alquilbenzenossulfonato linear (calculado como ácido) a cerca de 15% até cerca de 23%; etoxissulfato de álcool (por exemplo, C₁₂₋₁₅ álcool, 2-3 EO) a cerca de 8% até cerca de 15%; etoxilato de álcool (por exemplo, C₁₂₋₁₅ álcool, 7 EO, ou C₁₂₋₁₅ álcool, 5 EO) a cerca de 3% até cerca de 9%; sabão como ácido graxo (por exemplo, ácido láurico) a 0% até cerca de 3%; aminoetanol
10 a cerca de 1% até cerca de 5%; citrato de sódio a cerca de 5% até cerca de 10%; hidrótopo (por exemplo, toluenossulfonato de sódio) a cerca de 2% até cerca de 6%; borato (por exemplo, B₄O₇) a 0% até cerca de 2%; carboximetilcelulose a 0% até cerca de 1%; etanol a cerca de 1% até cerca de 3%; propileno glicol a cerca de 2% até cerca de 5%; enzimas (calculadas como
15 proteína de enzima pura) a 0,0001 – 0,1% e ingredientes menores (por exemplo, polímeros, perfume, abrillantadores óticos) a 0 – 5%.

11) Uma composição detergente líquida aquosa compreendendo alquilbenzenossulfonato linear (calculado como ácido) a cerca de 20% até cerca de 32%; etoxilato de álcool (por exemplo, C₁₂₋₁₅ álcool, 7 EO ou C₁₂₋₁₅ álcool, 5 EO) a 6 - 12%; aminoetanol a cerca de 2% até cerca de 6%; ácido cítrico a cerca de 8% até cerca de 14%; borato (por exemplo, B₄O₇) a cerca de 1% até cerca de 3%; polímero (por exemplo, copolímero de ácido maleico/acrílico, polímero de ancoragem, tal como, por exemplo, copolímero de lauril metacrilato/ácido acrílico) a 0% até cerca de 3%; glicerol a cerca de 3%
20 até cerca de 8%; enzimas (calculadas como proteína de enzima pura) a 0,0001 – 0,1% e ingredientes menores (por exemplo, hidrótropos, dispersantes, perfume, abrillantadores óticos) a 0 - 5%.

12) Uma composição detergente formulada como um granulado que tem uma densidade de volume de pelo menos 600 g/L compreendendo
30 tensoativo aniônico (alquilbenzenossulfonato linear, sulfato de alquila, sulfonato de α -olefina, metil ésteres de ácido α -sulfo graxo, alcanossulfonatos, sabão) a cerca de 25% até cerca de 40%; tensoativo não iônico (por exem-

plo, etoxilato de álcool) a cerca de 1% até cerca de 10%; carbonato de sódio (por exemplo, Na_2CO_3) a cerca de 8% até cerca de 25%; silicatos solúveis (por exemplo, Na_2O , 2SiO_2) a cerca de 5% até cerca de 15%; sulfato de sódio (por exemplo, Na_2SO_4) a 0% até cerca de 5%; zeólito (NaA1SiO_4) a cerca de 15% até cerca de 28%; perborato de sódio (por exemplo, $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) a 0% até cerca de 20%; ativador de alvejante (TAED ou NOBS) a cerca de 0% até cerca de 5%; enzimas (calculadas como proteína de enzima pura) a 0,0001 – 0,1%; ingredientes menores (por exemplo, perfume, abri-

5 lhantadores óticos) a 0 - 3%.

10 13) Composições detergentes como descritas em composições 1) – 12) acima, em que todo ou parte do alquilbenzenossulfonato linear é substituído por sulfato de ($\text{C}_{12}\text{-C}_{18}$) alquila.

14) Composição detergente formulada como um granulado que tem uma densidade de volume de pelo menos 600 g/L compreendendo sul-

15 fato de ($\text{C}_{12}\text{-C}_{18}$) alquila a cerca de 9% até cerca de 15%; etoxilato de álcool a cerca de 3% até cerca de 6%; amida de ácido polihidróxi alquil graxo a cerca de 1% até cerca de 5%; zeólito (por exemplo, NaA1SiO_4) a cerca de 10% até cerca de 20%; dissilicato em camada (por exemplo, SK56 da Hoe-

20 chst) a cerca de 10% até cerca de 20%; carbonato de sódio (por exemplo, Na_2CO_3) a cerca de 3% até cerca de 12%; silicato solúvel (por exemplo, Na_2O , 2SiO_2) a 0% até cerca de 6%; citrato de sódio a cerca de 4% até cerca de 8%; percarbonato de sódio a cerca de 13% até cerca de 22%; TAED a cerca de 3% até cerca de 8%; polímeros (por exemplo, policarboxilatos e PVP) a 0% até cerca de 5%; enzimas (calculadas como proteína de enzima

25 pura) a 0,0001 – 0,1% e ingredientes menores (por exemplo, abrillantador ótico, fotoalvejante, perfume, supressores de espuma de sabão) a 0 – 5%.

15) Uma composição detergente formulada como um granulado que tem uma densidade de volume de pelo menos 600 g/L compreendendo sulfato de ($\text{C}_{12}\text{-C}_{18}$) alquila a cerca de 4% até cerca de 8%; etoxilato de álco-

30 ol a cerca de 11% até cerca de 15%; sabão a cerca de 1% até cerca de 4%; zeólito MAP ou zeólito A a cerca de 35% até cerca de 45%; carbonato de sódio (como Na_2CO_3) a cerca de 2% até cerca de 8%; silicato solúvel (por

exemplo, Na_2O , 2SiO_2) a 0% até cerca de 4%; percarbonato de sódio a cerca de 13% até cerca de 22%; TAED a 1 - 8%; carboximetilcelulose (CMC) a 0% até cerca de 3%; polímeros (polímeros, policarboxilates e PVP) a 0% até cerca de 3%; enzimas (calculadas como proteína de enzima pura) a 0,0001 – 0,1% e ingredientes menores (por exemplo, abrillantador ótico, fosfonato, perfume) a 0 - 3%.

16) Formulações detergentes como descritas em 1) – 15) acima, que contêm um perácido estabilizado ou encapsulado, ou como um componente adicional ou como um substituto para sistemas alvejantes já especificados.

17) Composições detergentes como descritas acima em 1), 3), 7), 9) e 12), em que o perborato é substituído por percarbonato.

18) Composições detergentes como descritas acima em 1), 3), 7), 9), 12), 14) e 15), que adicionalmente contêm um catalisador de manganês. O catalisador de manganês, por exemplo, é um dos compostos descritos em "Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching," *Nature* 369: 637-639 (1994).

19) Composição detergente formulada como um líquido detergente não aquoso compreendendo um tensoativo líquido não iônico, tal como, por exemplo, álcool primário alcoxilado linear, um sistema de builder (por exemplo, fosfato), uma(s) enzima(s) e álcali. O detergente também pode compreender tensoativo aniônico e/ou um sistema alvejante.

20) Uma composição detergente para lavanderia líquida aquosa compreendendo: A) pelo menos um tensoativo selecionado a partir do grupo que consiste em tensoativos aniônicos, tensoativos não iônicos, tensoativos zwitteriônicos, tensoativos anfotéricos e combinações dos mesmos; B) gotículas de uma combinação de materiais de silicone, cuja combinação compreende: i) um material de polissiloxano funcionalizado contendo amina ou amônio que a) foi preparado através de um processo que intrinsecamente leva grupos curáveis/reativos no material de polissiloxano funcionalizado que é produzido; b) tem uma razão molar de átomos de silício contendo grupo curável/reativo para átomos de silício terminais não contendo grupos reati-

vos/curáveis que é menos do que cerca de 30%; c) tem um teor de nitrogênio de cerca de 0,05% a cerca de 0,30% por peso; e d) tem viscosidade a 20 C. variando de cerca de 0,00002 m; 2; /s a cerca de 0,2 m; 2; /s e ii) um material de polissiloxano não funcionalizado livre de nitrogênio tendo uma viscosidade de cerca de 0,01 m; 2; /s a cerca de 2,0 m; 2; /s e presente em uma quantidade tal que dentro da dita mistura a razão em peso de material de polissiloxano funcionalizado para material de polissiloxano não funcionalizado varia de cerca de 100:1 a cerca de 1:100; e C) pelo menos um adjunto para lavanderia de não silicone adicional selecionado a partir do grupo que consiste em agentes de inibição de transferência de corante, abrillantadores óticos e combinações dos mesmos;

uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma pode ser incorporada em concentrações convencionalmente empregadas em detergentes. No momento é contemplado que, na composição detergente, uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma pode ser adicionada em uma quantidade correspondente a 0,00001 – 1,0 mg (calculada como proteína de enzima pura) de enzima por litro de licor de lavagem.

Em outra modalidade, uma 2,6- β -D-frutano hidrolase pode ser incorporada em composições detergentes e usadas para remoção/limpeza de biofilme presente em têxteis/lavanderia domésticos e/ou industriais.

A composição detergente pode, por exemplo, ser formulada como uma composição detergente para lavanderia manual ou em máquina, incluindo uma composição aditiva para lavanderia adequada para pré-tratamento de tecidos tingidos e uma composição amaciante para tecido adicionada no enxágue, ou ser formulada como uma composição detergente para uso em operações gerais de limpeza de superfície dura de domicílio, ou ser formulada para operações para lavanderia manual ou em máquina.

Em um aspecto específico, a composição detergente pode ainda compreender 2,6- β -D-frutano hidrolase, uma ou mais α -amilases em adição à α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma, e uma ou mais outras enzimas de limpeza, tal como uma protease, uma lipase, uma cutinase, uma carbohidrase, uma celulase, uma pectinase, uma mananase, uma

arabinase, uma galactanase, uma xilanase, uma oxidase, uma lacase e/ou uma peroxidase, e/ou combinações das mesmas.

Em geral, as propriedades da(s) enzima(s) escolhida(s) devem ser compsiíveis com o detergente selecionado (por exemplo, pH ótimo, compatibilidade com outros ingredientes enzimáticos e/ou não enzimáticos, etc.), e a(s) enzima(s) deve(m) estar presente(s) em quantidades eficazes.

Proteases: proteases adequadas incluem aquelas de origem animal, vegetal ou microbiana. Mutantes engenheirados de proteína ou quimicamente modificados estão incluídos assim como proteases naturalmente processadas. A protease pode ser uma serina protease ou metaloprotease, tal como uma protease microbiana alcalina, uma protease semelhante à tripsina ou uma protease semelhante à quimotripsina. Exemplos de proteases alcalinas são subtilisinas, especialmente aquelas derivadas de *Bacillus*, por exemplo, subtilisin Novo, subtilisin Carlsberg, subtilisin 309, subtilisin 147 e subtilisin 168 (veja, por exemplo, WO 89/06279). Exemplos de proteases semelhantes a tripsina são tripsina (por exemplo, de origem suína ou bovina), e proteases *Fusarium* (veja, por exemplo, WO 89/06270 e WO 94/25583). Exemplos de proteases úteis também incluem, mas não estão limitados às variantes descritas em WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116 e WO 98/34946. Enzimas protease exemplares comercialmente disponíveis incluem Alcalase[®], Savinase[®], Primase[®], Duralase[®], Esperase[®] e Kannase[®] (Novo Nordisk A/S), Maxatase[®], Maxacal[®], Maxapem[®], Prope-
rase[®], Purafect[®], Purafect OxP[®], FN2[®] e FN3[®] (Genencor International, Inc.).

Lipases: lipases adequadas incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Mutantes engenheirados de proteína ou quimicamente modificados, proteoliticamente modificados estão incluídos. Exemplos de lipases úteis incluem, mas não estão limitadas a lipases de *Humicola* (*synonym Thermomyces*), por exemplo, de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) (veja, por exemplo, EP 258068 e EP 305216), de *H. insolens* (veja, por exemplo, WO 96/13580); uma lipase de *Pseudomonas* (por exemplo, de *P. alcaligenes* ou *P. pseudoalcaligenes*; veja, por exemplo, EP 218 272), *P. cepacia* (veja, por

exemplo, EP 331 376), *P. stutzeri* (veja, por exemplo, GB 1,372,034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. strain SD 705 (veja, por exemplo, WO 95/06720 e WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (veja, por exemplo, WO 96/12012); uma lipase de *Bacillus* (por exemplo, de *B. subtilis*; veja, por exemplo, Dartois et al. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1131: 253-360 (1993)), *B. stearothermophilus* (see e.g., JP 64/744992) ou *B. pumilus* (veja, por exemplo, WO 91/16422). Variantes de lipase adicionais contempladas para uso nas formulações incluem aquelas descritas, por exemplo, em: WO 92/05249, WO 94/01541, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079, WO 97/07202, EP 407225 e EP 260105. Algumas enzimas lipase comercialmente disponíveis incluem Lipolase[®] e Lipolase Ultra[®] (Novo Nordisk A/S).

Poliesterases: poliesterases adequadas podem ser incluídas em composição. Poliesterases adequadas incluem, por exemplo, aquelas descritas em WO 01/34899 e WO 01/14629.

Amilases: As composições podem ser combinadas com outras α -amilases, tal como α -amilase melhorada de não produção. Estas podem incluir amilases comercialmente disponíveis, tal como, porém não limitadas a Duramyl[®], Termamyl[®], Fungamyl[®] e BAN[®] (Novo Nordisk A/S); Rapidase[®], e Purastar[®] (da Genencor International, Inc.).

Celulases: celulases podem ser adicionadas às composições. Celulases adequadas incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Mutantes engenheirados ou quimicamente modificados estão incluídos. Celulases adequadas incluem celulases dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por exemplo, as celulases fúngicas produzidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* e *Fusarium oxysporum* descritas, por exemplo, nas Patentes US Nos. 4,435,307; 5,648,263; 5,691,178 e 5,776,757; e Pedido PCT Publicação Internacional No. WO 89/09259. Celulases exemplares contempladas para uso são aquelas que têm benefício de cuidado de cor para o têxtil. Exemplos de tais celulases são celulases descritas em, por exemplo, EP 0495257, EP 0531372, WO 96/11262, WO 96/29397 e WO 98/08940. Outros exemplos

são variantes de celulase, tais como aquelas descritas em WO 94/07998; WO 98/12307; WO 95/24471; PCT/DK98/00299; EP 531315; Patentes U.S. Nos. 5,457,046; 5,686,593 e 5,763,254. Celulases comercialmente disponíveis incluem Celluzyme[®] e Carezyme[®] (Novo Nordisk A/S); Clazinase[®] e Puradax HA[®] (Genencor International, Inc.) e KAC-500(B)[®] (Kao Corporation).

Peroxidases/Oxidases: Peroxidases/oxidases adequadas contempladas para uso nas composições incluem aquelas de origem vegetal, bacteriana ou fúngica. Mutantes engenheirados de proteína ou quimicamente modificados estão incluídos. Peroxidases exemplares incluem peroxidases de *Coprinus*, por exemplo, de *C. cinereus*, e variantes das mesmas como aquelas descritas em WO 93/24618, WO 95/10602 e WO 98/15257. Peroxidases comercialmente disponíveis incluem, por exemplo, Guardzyme[®] (Novo Nordisk A/S).

A(s) enzima(s) detergente(s) pode(m) ser incluída(s) em uma composição detergente através da adição de aditivos separados contendo uma ou mais enzimas, ou através da adição de um aditivo combinado compreendendo todas estas enzimas. Um aditivo para detergente, isto é, um aditivo separado ou um aditivo combinado, pode ser formulado, por exemplo, como um granulado, um líquido, uma pasta fluida, etc. Formulações aditivas para detergente exemplares são granulados, em particular granulados não dispersivos, líquidos, em particular líquidos estabilizados ou pastas fluidas.

Granulados não dispersivos podem ser produzidos, por exemplo, conforme descrito nas Patentes US Nos. 4,106,991 e 4,661,452, e podem opcionalmente ser revestidos através de métodos conhecidos na técnica. Exemplos de materiais de revestimento ceroso são produtos de poli(óxido de etileno) (por exemplo, polietilenoglicol, PEG) com pesos molares médios de 1.000 a 20.000; nonilfenóis etoxilados tendo de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; álcoois graxos etoxilados em que o álcool contém de 12 a 20 átomos de carbono e em que existem de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; álcoois graxos; ácidos graxos; e mono e di e triglicerídeos de ácidos graxos. Exemplos de materiais de revestimento formadores de filme adequados

para aplicação através de técnicas de leite fluidizado são dados em, por exemplo, GB 1483591. Preparações de enzima líquidas podem ser estabilizadas, por exemplo, através da adição de um poliol, tal como propileno glicol, um açúcar ou álcool de açúcar, ácido láctico ou ácido bórico, de acordo com métodos estabelecidos. Enzimas protegidas podem ser preparadas de acordo com o método descrito em EP 238216.

De modo geral, a composição detergente pode estar em uma forma conveniente, por exemplo, uma barra, um comprimido, um pó, um grânulo, um pasta ou um líquido. Um detergente líquido pode ser aquoso, tipicamente contendo até cerca de 70% de água, e 0% a cerca de 30% de solvente orgânico. Géis detergentes compactos continham, por exemplo, cerca de 30% de água ou menos.

A composição detergente compreende um ou mais tensoativos, que podem ser não iônicos, incluindo semipolares e/ou aniônicos e/ou catiônicos e/ou zwitteriônicos. Os tensoativos estão tipicamente presentes na ampla faixa de cerca de 0,1% a 60% por peso.

Quando incluído aqui, o detergente irá usualmente conter de cerca de 1% a cerca de 40% de tensoativo aniônico, tal como alquilbenzenossulfonato linear, sulfonato de α -olefina, sulfato de alquila (sulfato de álcool graxo), etoxissulfato de álcool, alcanossulfonato secundário, metil éster de ácido α -sulfo graxo, ácido alquil ou alquenilsuccínico, ou sabão.

Quando incluído aqui, o detergente irá tipicamente conter de cerca de 0,2% a cerca de 40% de um tensoativo não iônico, tal como etoxilato de álcool, nonilfenol etoxilato, alquilpoliglicosídeo, alquildimetilaminaóxido, monoetanolamida de ácido graxo etoxilado, monoetanolamida de ácido graxo, amida de ácido poli-hidróxi alquil graxo ou derivados de N-acil-N-alquila de glucosamina ("glucamidas").

O detergente pode conter 0% a cerca de 65% de um builder detergente ou agente complexante, tal como zeólito, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbobato, citrato, ácido nitriloacético, ácido etilenodiaminatetra-acético (EDTA), ácido dietilenotriaminapenta-acético, ácido alquil ou alquenilsuccínico, silicatos solúveis ou silicatos em camada (por exemplo, SKS-6 da Hoe-

chst).

O detergente pode compreender um ou mais polímeros. Exemplos são carboximetilcelulose (CMC), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(etileno glicol) (PEG), poli(vinil álcool) (PVA), poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos, por exemplo, poliacrilates, copolímeros de ácido maleico/acrílico), e copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.

O detergente pode conter um sistema alvejante que pode compreender uma fonte de H_2O_2 , tal como perborato ou percarbonato, que pode ser combinada com um ativador de alvejante formador de perácido (por exemplo, tetraacetiletlenodiamina ou nonanoiloxibenzenossulfonato). De modo alternativo, o sistema alvejante pode compreender peroxiácidos (por exemplo, os peroxiácidos do tipo amida, imida ou sulfona). O sistema alvejante também pode ser um sistema alvejante enzimático.

A(s) enzima(s) da composição detergente pode(m) ser estabilizada(s) usando agentes de estabilização convencionais, por exemplo, como polioliol (por exemplo, propileno glicol ou glicerol), um açúcar ou álcool de açúcar, ácido láctico, ácido bórico ou um derivado de ácido bórico (por exemplo, um borato éster aromático), ou um derivado de ácido fenil borônico (por exemplo, ácido 4-formilfenil borônico). A composição pode ser formulada conforme descrito em WO 92/19709 e WO 92/19708.

O detergente também pode conter outros ingredientes de detergente convencionais, tais como, por exemplo, condicionadores para tecido incluindo argilas, intensificadores de espuma, supressores de espuma de sabão, agentes anticorrosão, agentes de suspensão de sujeira, agentes de redeposição antissujeira, corantes, bactericidas, brilhantadores óticos, hidrótopos, inibidores de mancha ou perfumes.

No momento é contemplado que as composições detergentes, em particular uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma, possam ser adicionadas em uma quantidade correspondente a cerca de 0,01 até cerca de 100 mg de proteína de enzima por litro de licor de lavagem, por exemplo, cerca de 0,05 a cerca de 5,0 mg de proteína de enzima por litro de licor de lavagem, ou cerca de 0,1 a cerca de 1,0 mg de proteína

de enzima por litro de licor de lavagem.

7. Métodos

7.1 Ensaio de Triagem de Filtro

Os ensaios discutidos abaixo podem ser usados na triagem de
5 variantes de α -amilase Amy707 que têm estabilidade alterada em pH alto ou
baixo e/ou condições empobrecidas de Ca^{2+} comparadas à enzima alfa-
amilase principal.

7.2 Ensaio de Filtro de pH Alto

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

15 Cada sanduíche de filtro é especificamente marcado com uma
agulha após plaqueamento, porém antes da incubação, a fim de ser capaz
de localizar variantes positivas no filtro e o filtro de nitrocelulose com varian-
tes ligadas é transferido para um recipiente com tampão de glicina-NaOH,
pH 8,6 – 10,6 e incubado à temperatura ambiente (pode ser alterada de 10 –
20 60°C) por 15 minutos. Os filtros de acetato de celulose com colônias são
armazenados sobre as placas TY à temperatura ambiente até o uso. Após
incubação, atividade residual é detectada sobre placas contendo agarose a
1%, amido a 0,2% em tampão de glicina-NaOH, pH 8,6 – 10,6. As placas de
ensaio com filtros de nitrocelulose são marcadas do mesmo modo que o
25 sanduíche de filtro e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Após
remoção dos filtros, as placas de ensaio são tingidas com solução de Lugol
a 10%. Variantes da degradação do amido são detectadas como pontos
brancos sobre fundo azul escuro e então identificadas sobre as placas de
armazenamento. Variantes positivas são retriadas duas vezes sob as mes-
30 mas condições que a primeira triagem.

7.3 Ensaio de Filtro de Baixo Cálcio

Livrarias de *Bacillus* são plaqueadas sobre um sanduíche de

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

Cada sanduíche de filtro é especificamente marcado com uma agulha após plaqueamento, porém antes da incubação, a fim de se capaz de localizar variantes positivas sobre o filtro e o filtro de nitrocelulose com variantes ligadas é transferido para um recipiente com tampão de carbonato/bicarbonato pH 8,5 – 10 e com diferentes concentrações de EDTA (0,001 mM – 100 mM). Os filtros são incubados à temperatura ambiente por 1 hora. Os filtros de acetato de celulose com colônias são armazenados sobre as placas de TY à temperatura ambiente até o uso. Após incubação, a atividade residual é detectada sobre as placas contendo agarose a 1%, amido a 0,2% em tampão de carbonato/bicarbonato pH 8,5 – 10. As placas de ensaio com filtros de nitrocelulose são marcadas do mesmo modo que o sanduíche de filtro e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Após remoção dos filtros, as placas de ensaio são tingidas com solução de Lugol a 10%. Variantes da degradação do amido são detectadas como pontos brancos sobre fundo azul escuro e então identificadas sobre as placas de armazenamento. Variantes positivas são retriadas duas vezes sob as mesmas condições que a primeira triagem.

7.4 Ensaio de Filtro de pH Baixo

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

Cada sanduíche de filtro é especificamente marcado com uma agulha após plaqueamento, porém antes da incubação, a fim de se capaz de localizar variantes positivas sobre o filtro, e o filtro de nitrocelulose com vari-

antes ligadas é transferido para um recipiente com tampão de citrato, pH 4,5 e incubado a 80°C por 20 minutos (quando triando por variantes na espinha dorsal do tipo selvagem) ou 85°C por 60 minutos (quando triando por variantes da alfa-amilase principal). Os filtros de acetato de celulose com colônias são armazenados sobre as placas de TY à temperatura ambiente até o uso. Após incubação, a atividade residual é detectada sobre as placas de ensaio contendo agarose a 1%, amido a 0,2% em tampão de citrato, pH 6,0. As placas de ensaio com filtros de nitrocelulose são marcadas do mesmo modo que o sanduíche de filtro e incubadas por 2 horas a 50°C. Após remoção dos filtros, as placas de ensaio são tingidas com solução de Lugol a 10%. Variantes da degradação do amido são detectadas como pontos brancos sobre fundo azul escuro e então identificadas sobre as placas de armazenamento. Variantes positivas são retriadas duas vezes sob as mesmas condições que a primeira triagem.

15 7.5 Triagem Secundária

Transformantes positivos após retriados são colhidos da placa de armazenamento e testados em um ensaio de placa secundário. Transformantes positivos são cultivados por 22 horas a 37°C em 5 ml de LB + cloranfenicol. A cultura de *Bacillus* de cada transformante positivo e como um controle um clone que expressa a espinha dorsal são incubados em um tampão de citrato, pH 4,5 a 90°C e amostras são tomadas a 0, 10, 20, 30, 40, 60 e 80 minutos. Uma amostra de 3 microlitros é salpicada sobre uma placa de ensaio. A placa de ensaio é tingida com solução de Lugol a 10%. Variantes melhoradas são vistas como variantes com atividade residual superior (detectada como círculos sobre a placa de ensaio) à da espinha dorsal. As variantes melhoradas são determinadas por sequenciamento de nucleotídeo.

25 7.6 Ensaio de Estabilidade de Variantes Não Purificadas

A estabilidade das variantes pode ser avaliada como a seguir: 30 culturas de *Bacillus* que expressam as variantes a serem analisadas são cultivadas por 21 horas a 37°C em 10 ml de LB + cloranfenicol. 800 microlitros de cultura são misturados com 200 microlitros de tampão de citrato, pH

4,5. Um número de 70 alíquotas de microlitro correspondente ao número de pontos de tempo de amostra são feitos em tubos PCR e incubados a 70°C ou 90°C por vários pontos de tempo (tipicamente 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos) em uma máquina PCR. A amostra de 0 min não é incubada em alta temperatura. A atividade na amostra é medida por transferência de 20 microlitros para 200 microlitros do substrato da alfa-amilase PNP-G₇ MPR3 ((Boehringer Mannheim Cat. no. 1660730) como descrito abaixo sob "*Ensaio para Atividade de Alfa-Amilase*". Os resultados são plotados como atividade percentual (em relação ao ponto de tempo 0) versus tempo, ou estabelecidos como atividade residual percentual após incubação por um certo período de tempo.

7.7 Fermentação e Purificação de Variantes de Alfa-Amilase

A. Cepa *B. subtilis* que abriga o plasmídeo de expressão relevante pode ser fermentada e purificada como a seguir: a cepa é matizada sobre uma placa de ágar LB com 10 micro g/ml de canamicina a partir de estoque a -80°C, e cultivada de um dia para o outro a 37°C. As colônias são transferidas para 100 ml de meio PS-1 suplementado com 10 micro g/ml de cloranfinicol em um frasco de agitação de 500 ml.

Composição do meio PS-1

20	Açúcar Pérola	100 g/l
	Farelo de soja	40 g/l
	Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	10 g/l
	Pluronic™ PE 6100	0,1 g/l
	CaCO ₃	5 g/l

25 A cultura é agitada a 37°C a 270 RPM por 5 dias.

Células e detritos celulares são removidos do caldo de fermentação através de centrifugação a 4500 rpm em 20 – 25 minutos. Depois, o sobrenadante é filtrado para obter uma solução completamente clara. O filtrado é concentrado e lavado em um filtro UF (membrana de corte de 10000) e o tampão é trocado para acetato a 20 mM, pH 5,5. O filtrado UF é aplicado em uma S-sefarose F.F. e eluição é realizada por eluição de etapas com NaCl a 0,2 M no mesmo tampão. O eluato é dialisado contra Tris a 10 mM,

pH 9,0 e aplicado sobre uma Q-sefarose F.F. e eluído com um gradiente linear de NaCl a 0 – 0,3 M sobre volumes de coluna 6. As frações que contêm a atividade (medida através do ensaio de Phadebas) são coligadas, o pH foi ajustado para 7,5 e a cor restante foi removida através de um tratamento com

5 carvão ativo a 0,5% P/vol. em 5 minutos.

7.8 Determinação da Atividade Específica

A atividade específica é determinada usando o ensaio Phadeba® (Pharmacia) como atividade/mg de enzima. As instruções dos fabricantes são seguidas (veja também abaixo sob "*Ensaio para Atividade de Alfa-Amilase*").

10

7.9 Determinação do Ponto Isoelétrico

O pI é determinado através de focalização isoeletrica (ex: Pharmacia, Ampholine, pH 3,5 – 9,3).

7.10 Ensaio de Estabilidade Acelerada

15 Em tubos de Propileno de 50 ml, 10 ml do detergente de interesse foram adicionados. Diluição apropriada foi feita para ambos Amy707t e Amy707tΔRS, de modo que 180 ppm de cada foram medidas com uma pipeta em tubos separados contendo o detergente. O detergente com cada enzima mutante foi agitado em vórtex por 30 segundos e então colocado em

20 um RotaMix (ATR RKVS Model) por 10 minutos. 100 microlitros do detergente com a enzima mutante foram medidos com uma pipeta e diluídos a 1:651. A atividade inicial dos mutantes foi avaliada usando substrato de P-Nitro-Fenil-Malto-heptaose Bloqueada (PBNPG7 bloqueada) em um Konelab, Model 20XT. As amostras de detergente foram então incubadas em um incubador de temperatura constante ajustado a 37°C. Amostras foram removidas

25 em 1, 2, 4, 7 e 17 dias e a atividade da enzima avaliada.

7.11 Ensaios para Atividade de Alfa-Amilase

7.11.1 Ensaio de Phadebas

30 A atividade da alfa-amilase é determinada através de um método que emprega comprimidos de Phadebas® como substrato. Comprimidos de Phadebas (Phadebas® Amylase Test, fornecido por Pharmacia Diagnostic) contêm um polímero de amido de cor azul insolúvel reticulado, que foi mistu-

rado com albumina de soro bovino e uma substância tampão e prensados em comprimidos.

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

É importante que a absorbância de 620 nm medida após 10 ou 15 minutos de incubação (tempo de teste) esteja na faixa de 0,2 a 2,0 unidades de absorbância a 620 nm. Nesta faixa de absorbância, há linearidade entre atividade e absorbância (lei de Lambert-Beer). A diluição da enzima deve, portanto, ser ajustada para encaixar neste critério. Sob um conjunto específico de condições (condições de temp., pH, tempo de reação, tampão), 1 mg de uma dada alfa-amilase irá hidrolisar uma certa quantidade de substrato e uma cor azul será produzida. A intensidade da cor é medida a 620 nm. A absorbância medida é diretamente proporcional à atividade específica (atividade/mg de proteína de alfa-amilase pura) da alfa-amilase em questão sob o dado conjunto de condições.

7.11.2 Método Alternativo

A atividade da alfa-amilase é determinada através de um método que emprega o substrato de PNP-G₇. PNP-G₇, que é uma abreviação para p-nitrofenil-alfa-D-malto-heptaosídeo, é um oligossacarídeo bloqueado que pode ser clivado através de uma endo-amilase. Após a clivagem, a alfa-glucosidase incluída no conjunto digere o substrato para liberar uma molécula de PNP livre que tem uma cor amarela e, desse modo, pode ser medida através de espectrofotometria visível a $\lambda = 405 \text{ nm}$ (400 - 420 nm). Conjuntos contendo substrato de PNP-G₇ e alfa-glicosidase são fabricados por Bo-

ehringer-Mannheim (cat. No.1054635).

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

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

7.12 Determinação do Desempenho da Enzima em Composições Detergentes

7.12.1 Condições US

Uso de Terg-o-tometer, United States Testing, Hoboken, N.J. para estimular teste de lavagem sob condições de lavagem US, uma curva de eficiência de dose (DEC) da enzima mutante de interesse foi conduzida a 20°C usando detergentes padrão, tal como AATCC líquido 2003 sem abrlhantador ótico e/ou AATCC em pó 1993 (*American Association of Textile Chemists and Colorists*). Uma DEC correspondente de uma alfa-amilase comparativa foi então conduzida para comparar o desempenho de remoção de mancha da enzima mutante inventiva. Este processo foi repetido a 40°C. Tipicamente, 4 amostras de tecido de mancha de amido de milho CS-28 (CFT da Holland) foram colocadas em um recipiente de aço do Terg-o-tometer, que foi enchido com 1 Litro de água DI e 1,5 g de AATCC líquido. Quando AATCC em pó foi usado, 1,5 g do pó de detergente foi pesado em uma balança analítica (Model PM4800, Mettler Instrument Corp., Highstown, N.J. 08520) e adicionado ao Terg-o-tometer. Duas repetições foram executadas ao mesmo tempo. A menos que estabelecido de outra forma, os testes foram realizados por 12 minutos e enxaguados por 3 minutos. Após lavagem, as amostras de tecido foram secas ao ar e a refletância das amostras

de tecido de teste foi medida com um Chroma Meter Model CR-410 fabricado por Konica Minolta. Os dados coletados foram tratados com análise estatística apropriada.

7.12.2 Condições Européias

5 Uso de Launder-O-meter, fabricado por Atlas Company, Atlanta, Georgia, para estimular o teste de lavagem sob condições de lavagem européias, uma curva de eficiência de dose (DEC) da enzima mutante de interesse foi conduzida a 40°C usando detergentes de teste europeus padrão, IEC A e IEC A com Alvejante (acetato de TAED-Tetra-Acetil-etileno-diamina) e Perborato de sódio. Uma curva DEC correspondente de uma enzima mutante comparativa foi então conduzida para comparar o desempenho de remoção de mancha da enzima mutante inventiva. Este processo foi repetido em temperatura de lavagem mais alta, se desejável. Tipicamente, 4 amostras de tecido de EMPA 161, amido de Milho (EMPA, Suíça) foram colocadas em um recipiente de aço com 250 ml de água DI contendo 6,8 g/L do detergente IEC A ou 8,0 g/L do IEC A com detergente Alvejante. Duas repetições foram executadas ao mesmo tempo. A menos que estabelecido de outra forma, os testes foram realizados por 45 minutos e enxaguados por 5 minutos. Após lavagem, as amostras de tecido foram secas ao ar e a refletância das amostras de tecido de teste foi medida com um Chroma Meter Model CR-410. Os dados coletados foram tratados com análise estatística apropriada.

7.12.3 Método de Microamostra de Tecido de Avaliação de Composições Detergentes

15 Existem numerosos ensaios de limpeza de α -amilase. Descrição exemplar da limpeza de teste inclui o seguinte:

 Uma "amostra de tecido" é um pedaço de material, tal como um tecido que tem uma mancha aplicada ao mesmo. O material pode ser, por exemplo, tecidos feitos de algodão, poliéster ou misturas de fibras naturais e sintéticas. A amostra de tecido pode ainda ser de papel, tal como papel de filtro ou nitrocelulose, ou um pedaço de material duro tal como cerâmica, metal ou vidro. Para amilases, a mancha é à base de amido, porém pode incluir

sangue, meito, tinta, grama, chá, vinho, espinafre, molho de carne, chocolate, ovo, queijo, argila, pigmento, óleo ou misturas destes compostos.

Uma "amostra de tecido menor" é uma seção da amostra de tecido que foi cortada com um dispositivo de soco de buraco único, ou que foi
5 cortada com um dispositivo de soco de 96 buracos fabricado sob medida, onde o padrão do soco de múltiplos buracos é equiparado a placas de microtitulação de 96 poços padrão, ou a seção foi removida de outra forma da amostra de tecido. A amostra de tecido pode ser de têxtil, papel, metal ou outro material adequado. A amostra de tecido menor pode ter a macha afiada ou antes ou após ser colocada no poço de uma placa de microtitulação
10 de 24, 48 ou 96 poços. A "amostra de tecido menor" também pode ser feita através da aplicação de uma mancha a um pequeno pedaço de material. Por exemplo, a amostra de tecido menor pode ser um pedaço manchado de tecido de 5/8" ou 0,25" de diâmetro. O soco fabricação sob medida é projetado de modo que distribui 96 amostras de tecido simultaneamente para todos os
15 poços de uma placa de 96 poços. O dispositivo permite a distribuição de mais do que uma amostra de tecido por poço simplesmente carregando a mesma placa de 96 poços múltiplas vezes. Dispositivos de soco de múltiplos buracos podem ser concebidos para distribuir simultaneamente amostras de tecido para qualquer formato de placa, incluindo, porém não limitado a placas de 24 poços, 48 poços e 96 poços. Em outro método concebível, a plataforma de teste suja pode ser uma conta feita de qualquer material, plástico, vidro, cerâmico ou outro material adequado que seja revestido com o substrato sujo para uso em composições de limpeza de teste para outros materiais exceto têxteis. A uma ou mais contas revestidas são então colocadas em
20 poços de placas de 96, 48 ou 24 poços ou formatos maiores, contendo tampão e enzima adequados. Neste caso, o sobrenadante pode ser examinado quanto à sujeira liberada ou por medição de absorbância direta ou após uma reação de desenvolvimento de cor secundária. Análise da sujeira liberada também deve ser tomada por análise espectral de massa. Um outro ensaio de microtriagem pode ser para distribuir e segurar a amostra de tecido, por
25 exemplo, um denim tingido com índigo, a um poço de uma placa de multipo-

ços, e adicionar partículas, tais como partículas de areia ou maiores, tal como, por exemplo, granada peneirada para incluir partículas de tamanho 6 a 8 ou 9, e agitar a placa de modo a causar desgaste da amostra de tecido pelas partículas adicionadas. Este ensaio encontrou uso na avaliação de celulase em aplicações de lavagem de pedra. A eficácia da enzima pode ser julgada pela liberação de cor (por exemplo, índigo liberado é dissolvido em dimetilsulfóxido e absorbância a $A_{600\text{ nm}}$ é medida) para o tampão de reação ou pelas medições de refletância da amostra de tecido desgastada.

Quando, por exemplo, amostras de tecido de BMI (sangue/leite/tinta) não tratadas são lavadas em detergente sem alvejante, uma grande porção da tinta liberada mesmo sem a ajuda de uma protease. A adição de uma protease leva a um pequeno aumento na liberação da mancha, que pode ser difícil quantificar sobre o fundo grande. Um aspecto proporciona um protocolo de tratamento que permite controlar o grau de fixação de uma mancha. Como um resultado, é possível produzir amostras de tecido que, por exemplo, liberam quantidades variáveis de mancha quando lavados na ausência da enzima sendo testada. O uso de amostras de tecido fixadas leva a uma melhora dramática da razão de sinal para ruído nos ensaios de lavagem. Além disso, variando-se o grau de fixação, pode-se gerar manchas que dão ótimos resultados sob as várias condições de limpeza.

Amostras de tecido com manchas de "força" conhecida em vários tipos de material estão comercialmente disponíveis (EMPA, St. Gallen, Suíça; wfk--Testgewebe GmbH, Krefeld, Alemanha; ou Center for Test Materials, Vlaardingen, Holanda) e/ou podem ser feitas pelo profissional (Morris e Prato, *Textile Research Journal* 52(4): 280-286 (1982)). Outras amostras de tecido de teste incluem, mas não estão limitadas a mancha(s) de sangue/leite/tinta (BMI) em um tecido contendo algodão, uma mancha de espinafre em um tecido contendo algodão ou grama em um tecido contendo algodão e chocolate/leite/fuligem em um tecido contendo algodão.

Uma mancha de BMI pode ser fixada ao algodão com peróxido de hidrogênio a 0,0003% até 0,3%. Outras combinações incluem grama ou espinafre fixados com glutaraldeído a 0,001% até 1%, gelatina e mancha de

Coomassie Brilliant Blue fixados com glutaraldeído a 0,001% até 1%, ou chocolate, leite e fuligem fixados com glutaraldeído a 0,001% até 1%.

A amostra de tecido também pode ser agitada durante incubação com a enzima/formulação de detergente. Dados de desempenho de lavagem são dependentes da orientação das amostras de tecido nos poços (horizontal versus vertical), particularmente na placa de 96 poços. Isto pode indicar que a mistura foi insuficiente durante o período de incubação. Embora exista um número de modos de assegurar agitação suficiente durante a incubação, um suporte de placa em que a placa de microtitulação é sanduíchada entre duas placas de alumínio pode ser construído. Isto pode ser tão simples quanto colocar, por exemplo, um selador de placa adesivo sobre os poços então prender as duas placas de alumínio à placa de 96 poços com qualquer tipo de engate apropriado comercialmente disponível. Ele pode então ser montado em um agitador incubador comercial. Ajustar o agitador para cerca de 400 rpm resulta em mistura muito eficiente, embora vazamento ou contaminação cruzada seja eficientemente impedida pelo suporte.

Ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) pode ser usado para quantificar a concentração de grupos amino no licor de lavagem. Isto pode servir como uma medida da quantidade de proteína que foi removida a partir da lavagem (veja, por exemplo, Cayot and Tainturier, *Anal. Biochem.* 249: 184-200 (1997)). Entretanto, se uma amostra de detergente ou de enzima leva à formação de fragmentos de peptídeo incomumente pequenos (por exemplo, a partir da presença de peptidases na amostra), então será obtido um sinal TNBS maior, isto é, mais "ruído".

Outro meio de medir o desempenho da lavagem de mancha de sangue/leite/tinta ou outra mancha que seja à base de liberação de tinta. Proteólise de proteína nas amostras de tecido leva à liberação de partículas de tinta que podem ser quantificadas através da medição da absorbância do licor de lavagem. A absorbância pode ser medida em qualquer comprimento de onda entre 350 e 800 nm. O comprimento de onda é medido a 410 nm ou 620 nm. O licor de lavagem também pode ser examinado para determinar o desempenho da lavagem sobre manchas que contêm grama, espinafre, ge-

latina ou mancha de Coomassie Brilliant Blue. Comprimentos de onda e-
xemplares para estas manchas incluem 670 nm para espinafre ou grama e
620 nm para gelatina ou Coomassie Brilliant Blue. Por exemplo, uma alíquo-
ta do licor de lavagem (tipicamente 100 a 150 μ L de uma microplaca de 96
5 poços, por exemplo) é removida e colocada em uma cuveta ou microplaca
de multipoços. Isto é então colocado em um espectrofotômetro e a absor-
vância é lida em um comprimento de onda apropriado.

O sistema pode também ser usado para determinar uma enzima
e/ou composição detergente melhorada para lavagem de louça, por exem-
10 plo, usando uma mancha de sangue/leite/tinta em um substrato adequado,
tal como roupa, plástico ou cerâmica.

Em um aspecto, a mancha de BMI é fixada ao algodão através
da aplicação de peróxido de hidrogênio a 0,3% à amostra de tecido de
BMI/algodão por 30 minutos a 25°C ou através da aplicação de peróxido de
15 hidrogênio a 0,03% à amostra de tecido de BMI/algodão por 30 minutos a
60°C. Amostras de tecido menores de aproximadamente 0,25" são cortadas
da amostra de tecido de BMI/algodão e colocadas nos poços de uma placa
de microtitulação de 96 poços. Em cada poço, é colocada uma mistura co-
nhecida de uma composição detergente e uma enzima, tal como uma prote-
20 ína variante. Após colocar um selador de placa adesivo na parte superior da
placa de microtitulação, a placa de microtitulação é presa a uma placa de
alumínio e agitada em um agitador orbital a aproximadamente 250 rpm por
cerca de 10 a 60 minutos. Ao final deste período, os sobrenadantes são
transferidos para poços em uma nova placa de microtitulação e a absorvân-
25 cia da tinta e 620 nm é medida. Isto pode ser testado de modo similar com
manchas de espinafre ou manchas de grama fixadas ao algodão através da
aplicação de glutaraldeído a 0,01% à amostra de tecido de espina-
fre/algodão ou amostra de tecido de grama/algodão por 30 minutos a 25°C.
O mesmo pode ser feito com manchas de chocolate, leite e/ou fuligem. En-
30 saios e condições adicionais de sangue/leite/tinta são proporcionados na
Patente US No. 7,122,331 (Genencor International, Inc.).

7.13 Determinação da Sensibilidade a LAS

A variante é incubada com diferentes concentrações de LAS (alquil benzeno sulfonato linear; Nansa 1169/P) por 10 minutos a 40°C.

A atividade residual é determinada usando o método de ensaio de Phadebas® ou o método alternativo que emprega o substrato de PNP-G₇.

5 LAS é diluído em tampão de fosfato a 0,1 M pH 7,5.

As concentrações a seguir são usadas:

500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm e 10 ppm ou nenhum LAS.

10 A variante é diluída nos diferentes tampões de LAS à concentração de 0,01 – 5 mg/l em um volume total de 10 ml e incubada por 10 minutos em um banho de água de temperatura controlada. A incubação é parada através da transferência de uma pequena alíquota ao tampão de ensaio frio. É importante que, durante a medição da atividade, a concentração de LAS esteja abaixo de 1 ppm, a fim de não afetar a medição da atividade.

15 Então a atividade residual é determinada em duplicata usando o ensaio de Phadebas® acima mencionado ou método alternativo.

A atividade é medida após subtração do branco.

A atividade com nenhum LAS é 100%.

8. Composições para Remoção de Biofilme e Uso

20 A composição pode compreender uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma como o componente enzimático principal, por exemplo, uma composição monocomponente para uso na remoção de biofilmes. De modo alternativo, a composição pode compreender múltiplas atividades enzimáticas, tais como múltiplas amilases, ou um coquetel de enzi-
 25 mas incluindo qualquer combinação do seguinte: aminopeptidase, amilase (β -, ou α -, ou glicoamilase), carbohidrase, carboxipeptidase, catalase, celulase, quitinase, cutinase, ciclodextrina glicosiltransferase, desoxirribonuclease, esterase, α -galactosidase, β -galactosidase, glicoamilase, α -glicosidase, β -glicosidase, haloperoxidase, invertase, lacase, lipase, manosidase, oxida-
 0 se, enzima pectinolítica, peptidoglutaminase, peroxidase, fitase, polifenoloxidase, enzima proteolítica, ribonuclease, transglutaminase e/ou xilanase, ou qualquer combinação das mesmas pra remover biofilmes. A(s) enzima(s)

adicional(ais) pode(m) ser produtível(eis) por meio de um micro-organismo pertencente aos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola* (por exemplo, *H. insolens*) e *Fusarium*. Membros exemplares do Gênero *Aspergillus* incluem *Aspergillus aculeatus*, *A. awamori*, *A. niger* e *A. oryzae*. Membros exemplares do gênero *Fusarium* incluem *F. bactridioides*, *F. cerealis*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. graminum*, *F. heterosporum*, *F. neogundinis*, *F. oxysporum*, *F. reticulatum*, *F. roseum*, *F. sambucinum*, *F. sarcochroum*, *F. sulphureum*, *F. torulosum*, *F. trichothecioides* e *F. venenatum*.

As composições detergentes compreendendo α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos na técnica e podem estar na forma de uma composição líquida ou seca. Por exemplo, a composição contendo α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma pode estar na forma de um granulado ou um microgranulado. O polipeptídeo a ser incluído na composição pode ser estabilizado de acordo com métodos conhecidos na técnica.

Exemplos são dados abaixo d usos exemplares das composições de polipeptídeo. A dosagem da composição contendo α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma e outras condições sob as quais a composição é usada podem ser determinadas usando métodos conhecidos na técnica.

As α -amilases do *Bacillus* sp. no. 707 ou variantes das mesmas são ainda contempladas para uso em uma composição junto com 2,6- β -D-frutano hidrolase ou variate da mesma.

Outro aspecto contempla composições e métodos para desintegrar e/ou remover biofilmes. O termo "desintegração", como usado aqui, deve ser entendido como hidrólise de polissacarídeos em uma matriz de biofilme que conecta e junta células microbianas individuais no biofilme, pelo que as células microbianas podem ser liberadas e removidas do biofilme. O biofilme está tipicamente presente em uma superfície e a desintegração do biofilme pode ser alcançada colocando a superfície em contato, por exemplo, por imersão, cobrindo ou borrifando a superfície com um meio aquoso compreendendo uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma,

ou uma ou mais outras enzimas responsáveis pela quebra de biofilmes, tal como, porém não limitada a 2,6- β -D-frutano hidrolase. A composição pode ser usada para hidrolisar lodo, por exemplo, em águas brancas na indústria de celulose e papel.

5 As α -amilases do *Bacillus* sp. no. 707 ou variantes das mesmas podem estar presentes na quantidade de 0,0001 a 10000 mg/L; 0,001 - 1000 mg/L; 0,01 - 100 mg/L ou 0,1 - 10 mg/L. Enzimas adicionais e variantes de enzima podem estar presentes em quantidades similares ou menos.

10 O processo pode adequadamente ser realizado em temperaturas de cerca da temperatura ambiente a cerca de 70°C. Faixas de temperatura exemplares incluem de cerca de 30°C a cerca de 60°C, por exemplo, de cerca de 40°C a cerca de 50°C.

15 Um pH adequado para os biofilmes de hidrolisação se situa dentro de cerca de 3,5 a cerca de 8,5. Faixas de pH exemplares incluem de cerca de 5,5 a cerca de 8, por exemplo, de cerca de 6,5 a cerca de 7,5. O tempo de contato ou tempo de reação para a enzima para eficazmente remover um biofilme pode variar consideravelmente, dependendo das propriedades do biofilme e da frequência com que uma superfície é tratada com a enzima sozinha ou em combinação com outras enzimas de degradação de biofilme, tal como 2,6- β -D-frutano hidrolase. Tempo de reação exemplar pode incluir dentro de cerca de 0,25 a cerca de 25 horas, e de cerca de 1 a cerca de 10 horas, por exemplo, cerca de 2 horas.

20 Enzimas de degradação de biofilme adicionais que podem ser combinadas com a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variantes da mesma e 2,6- β -D-frutano hidrolases incluem, mas não estão limitadas a celulases, hemicelulases, xilanases, outras amilases incluindo outras α -amilases, lipases, proteases, e/ou pectinases.

25 A α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variantes da mesma podem ainda ser combinadas com agentes antimicrobianos, tais como biocidas enzimáticos ou não enzimáticos. Um biocida enzimático pode, por exemplo, ser uma composição que compreende uma oxidoredutase, por exemplo, uma lacase ou uma peroxidase, especialmente haloperoxidase, e opcional-

mente um agente melhorador, tal como um siringato de alquila, como descrito, por exemplo, nos pedidos de patente internacionais PCT WO 97/42825 e DK 97/1273.

5 A superfície da qual um biofilme, por exemplo, pode ser removido e/ou limpo é uma superfície dura, que por definição se refere a qualquer superfície que é essencialmente não permeável a micro-organismos. Exemplos de superfícies são superfícies feitas de metal, por exemplo, ligas de aço inoxidável, polímeros plásticos/sintéticos, borracha, tábua, vidro, madeira, papel, têxtil, concreto, pedra, mármore, gesso e materiais cerâmicos que
10 opcionalmente podem ser revestidos, por exemplo, com pintura, esmalte, polímeros e semelhantes. Em conformidade, a superfície pode ser um membro de um sistema que segura, que transporta, que processa ou em contato com soluções aquosas, tais como sistemas de abastecimento de água, sistemas de processamento de alimentos, sistemas de refrigeração, sistemas de processamento químico ou sistemas de processamento farmacêutico. As
15 composições e métodos de uso das composições para remoção de biofilme na indústria de processamento de madeira, tal como a indústria de celulose e/ou papel. Em conformidade, a enzima e composições contendo a enzima são úteis em um sistema convencional de limpeza no lugar (cleaning-in-place) (C-I-P). A superfície pode ser um membro de uma unidade de sistema, tais como tubos, tanques, bombas, membranas, filtros, trocadores de calor, centrífugas, evaporadores, misturadores, torres de pulverização, válvulas e reatores. A superfície também pode ser ou ser uma parte de utensílios usados na ciência e indústria médica, tais como endoscópios, dispositivos
20 protéticos ou implantes médicos.

As composições para remoção de biofilme também são contempladas para prevenir a assim chamada biocorrosão que ocorre quando uma superfície de metal, por exemplo, um conduto tubular, é atacada por um biofilme microbiano, ou seja, pela desintegração do biofilme, deste modo impedindo que as células microbianas do biofilme criem um ambiente de biofilme,
30 que corroi a superfície do metal à qual está anexado.

Outra aplicação para a composição antibiofilme é para cuidado

oral. A superfície pode, entretanto, também ser de origem biológica, tais como membranas de mucosa, pele, dente, cabelo, unhas, etc.

Dentes com placa dental, por exemplo, através da incorporação das enzimas à pasta dental, e lentes de contato contaminadas estão abrangidas como superfícies. Em conformidade, uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 5 707 ou variantes da mesma pode ser usada para composições e processos para produzir um medicamento para desintegração da placa presente em dente de ser humano ou animal. Um uso adicional é a desintegração de biofilme das membranas mucosas, tal como biofilme nos pulmões em pacientes 10 que sofrem de fibrose cística.

Em conformidade, em ainda um outro aspecto se refere a uma composição para cuidado oral que compreende uma enzima recombinante, tal como uma enzima purificada que é essencialmente livre de quaisquer contaminantes ativos. Uma composição para cuidado oral pode adequadamente compreender uma quantidade de uma enzima recombinante. 15

Outras enzimas de degradação de biofilme para uso em composições para cuidado oral incluem, mas não estão limitadas à atividade de 2,6- β -D-frutano hidrolase na composição para cuidado oral. Atividades de enzima contempladas incluem atividades do grupo de enzimas que compreendem dextranase; mutanases; oxidases, tal como glicose oxidase, L-aminoácido oxidase, peroxidases, tal como, por exemplo, as peroxidases de *Coprinus* sp. descritas na WO 95/10602, ou lactoperoxidase, haloperoxidases, especialmente haloperoxidase derivável de *Curvularia* sp., em particular *C. verruculosa* e *C. inaequalis*; lacases; proteases tal como papaína, protease 20 se acídica (por exemplo, as proteases acídicas descritas em WO 95/02044, endoglicosidases, lipases, amilases, incluindo amiloglicosidases, tal como AMG (Novo Nordisk A/S); enzimas antimicrobianas e misturas das mesmas.

A composição para cuidado oral pode ter qualquer forma física adequada (isto é, pó, pasta, gel, líquido, pomada, comprimido, etc.). Uma 30 "composição para cuidado oral" inclui uma composição que pode ser usada para manter ou melhorar a higiene oral na boca de seres humanos e animais, prevenindo cáries dentais, prevenindo a formação de placa dental e

tártaro, removendo placa dental e tártaro, prevenindo e/ou tratando doenças dentais, etc. Pelo menos no contexto, as composições para cuidado oral também abrangem produtos para limpeza de dentaduras, dentes artificiais e semelhantes. Exemplos de tais composições para cuidado oral incluem pastas de dente, creme dental, gel ou pó de dente, soluções para lavagem bucal odôntica, formulações enxaguatórias pré ou pós-escovação, goma de mascar, pastilhas e doces. Pastas de dente e géis de dente tipicamente incluem materiais abrasivos de polimento, agentes espumantes, agentes saborizantes, humidificantes, aglutinantes, espessantes, agentes adoçantes, agentes branqueadores/alvejantes/para remoção de mancha, água e opcionalmente enzimas adicionais e combinações de enzima.

Soluções para lavagem bucal, incluindo líquidos para remoção de placa, tipicamente compreendem uma solução de água/álcool, sabor, umidificante, adoçante, agente espumante, corante e opcionalmente enzimas adicionais ou combinações de enzima.

Materiais abrasivos de polimento também devem ser incorporados à composição para cuidado oral, tal como um dentífrico.

Em conformidade, material abrasivo de polimento pode incluir alumina e hidratos da mesma, tal como tri-hidrato de alfa alumina; trissilicato de magnésio; carbonato de magnésio; caulim; aluminossilicatos. Tal como silicato de alumínio calcinado e silicato de alumínio; carbonato de cálcio; silicato de zircônio e também plásticos em pó, tal como cloreto de polivinila; poliamidas; metacrilato de polimetila; poliestireno; resinas de fenol-formaldeído; resinas de melamina-formaldeído; resinas de uréia-formaldeído; resinas epóxi; polietileno em pó; xerogéis de sílica; hidrogéis e aerogéis e semelhantes. Também adequados como agentes abrasivos são pirofosfato de cálcio; metafosfatos alcalinos insolúveis em água; fosfato de dicálcio e/ou seu di-hidrato, ortofosfato de dicálcio; fosfato de tricálcio; hidroxiapatita particulada e semelhantes. Também é possível empregar misturas destas substâncias.

Dependendo da composição para cuidado oral, o produto abrasivo pode estar presente de cerca de 0% a cerca de 70%, ou de cerca de

1% a cerca de 70%. Para pastas de dente, o teor de material abrasivo tipicamente se situa na faixa de 10% a 70% por peso da pasta de dente final.

Umidificantes são empregados para prevenir perda de água de, por exemplo, pastas de dente. Umidificantes adequados para uso em composições para cuidado oral incluem os compostos a seguir e misturas dos mesmos: glicerol; poliol; sorbitol; polietileno glicóis (PEG); propilene glicol; 1,3-propanodiol; 1,4-butanodiol; polissacarídeos parcialmente hidrogenados e semelhantes. Umidificantes estão em geral presentes de 0% a cerca de 80%, ou de cerca de 5% a cerca de 70% por peso em pasta de dente.

Sílica, amido, goma tragacanto, goma xantano, extrato de musgo irlandês, alginatos, pectina, derivados de celulose, tal como hidroxietil celulose, carboximetil celulose de sódio e hidroxipropil celulose, ácido poliacrílico e seus sais, polivinilpirrolidona podem ser mencionados como exemplos de espessantes e aglutinantes adequados, que ajudam na estabilização de um produto dentifrício. Espessantes podem estar presentes em cremes e géis de pasta de dente em uma quantidade de cerca de 0,1% a cerca de 20% por peso, e aglutinantes na medida de cerca de 0,01 a cerca de 10% por peso do produto final.

Como sabão de agente espumante, podem ser usados tensoativos aniônicos, catiônicos, não iônicos, anfotéricos e/ou zwitteriônicos. Estes podem estar presentes em níveis de 0% a cerca de 25%, de cerca de 0,1% a cerca de 13% ou de cerca de 0,25% a cerca de 10% por peso do produto final.

Tensoativos são adequados apenas na medida em que eles não exercem um efeito de inativação sobre a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variantes da mesma. Tensoativos incluem sulfatos de álcool graxo, sais de monoglicerídeos sulfonados ou ácidos graxos que têm de 10 a 20 átomos de carbono, albume de ácido graxo, sais de amidas e taurinas de ácidos graxos e/ou sais de ésteres de ácido graxo de ácido isetiônico.

Adoçantes adequados incluem sacarina para uso nas formulações.

Sabores, tal como hortelã, estão usualmente presentes em

quantidades baixas, tal como de cerca de 0,01% a cerca de 5% por peso, especialmente de cerca de 0,1% a cerca de 5%. Agentes branqueadores/alvejantes incluem H_2O_2 e podem ser adicionados em quantidades de menos do que cerca de 5%, ou de cerca de 0,25% a cerca de 4%, calculadas pelo peso do produto final. Os agentes branqueadores/alvejantes podem ser uma enzima, tal como oxidorreductase. Exemplos de enzimas alvejantes para dente adequadas, tais como aquelas descritas em WO 97/06775.

Água é usualmente adicionada em uma quantidade que proporciona, por exemplo, uma forma fluida à pasta de dente.

Agentes antibacterianos solúveis em água adicionais, tal como digluconato de cloro-hexidina, hexetidina, alexidina, Triclosan®, compostos antibacterianos de amônio quaternário e fontes solúveis em água de certos íons de metal, tal como zinco, cobre, prata e estanho (por exemplo, cloreto de zinco, cobre e estanho, e nitrato de prata) também podem ser incluídos.

Também contemplada é a adição de compostos que podem ser usados como fonte de fluoreto, corantes/colorantes, conservantes, vitaminas, agentes de ajuste do pH, agentes anticáries, agentes dessensibilizantes, etc.

Enzimas de degradação de biofilme proporcionam diversos benefícios quando usadas para limpeza da cavidade oral. Proteases quebram proteínas salivares, que são adsorvidas na superfície do dente e formam a película, a primeira camada de placa resultante. Proteases junto com lipases destroem bactérias por lise de proteínas e lipídios, que formam os componentes estruturais da parede e membranas da célula bacteriana.

Dextranase e outras carbo-hidrases, tal como 2,6- β -D-frutano hidrolase, quebram a estrutura esquelética orgânica produzida pelas bactérias que formam uma matriz para adesão bacteriana. Proteases e amilases não apenas previnem a formação de placa, mas também previnem o desenvolvimento de cálculos através da quebra do complexo de carboidrato/proteína que se liga ao cálcio, prevenindo a mineralização.

Uma pasta de dente pode tipicamente compreender os ingredientes a seguir (em % por peso da composição de pasta de dente final): ma-

terial abrasivo a cerca de 70%; umidificante: 0% a cerca de 80%; espessante: de cerca de 0,1% a cerca de 20%; aglutinante: de cerca de 0,01% a cerca de 10%; adoçante: de cerca de 0,1% a cerca de 5%; agente espumante: 0% a cerca de 15%; branqueador: 0% a cerca de 5% e enzimas: de cerca de 0,0001% a cerca de 20%.

Em uma modalidade específica, uma pasta de dente tem um pH na faixa de cerca de 6,0 a cerca de 8,0 e compreende: a) de cerca de 10% a cerca de 70% de material abrasivo; b) 0% a cerca de 80% de umidificante; c) 0,1% a cerca de 20% de espessante; d) 0,01% a cerca de 10% de aglutinante; e) de cerca de 0,1% a cerca de 5% de adoçante; f) 0% a cerca de 15% de agente espumante; g) 0% a cerca de 5% de branqueador; i) de cerca de 0,0001% a cerca de 20% de enzimas.

As ditas enzimas referidas sob i) incluem uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variantes da mesma, sozinha, ou em combinação com outras enzimas de degradação de biofilme, tal como 2,6- β -D-frutano hidrolase, e opcionalmente outras enzimas mencionadas acima conhecidas por serem usadas em pastas de dente e semelhantes.

Uma solução para lavagem bucal pode tipicamente compreender os ingredientes a seguir (em % por peso da composição da solução para lavagem bucal): 0% a cerca de 20% umidificante; 0% a cerca de 2% de tensoativo; 0% a cerca de 5% de enzimas; 0% a cerca de 20% de etanol; 0% a cerca de 2% de outros ingredientes (por exemplo, ingredientes ativos de sabor e adoçantes, tais como fluoretos). A composição também pode conter de cerca de 0% a cerca de 70% de água.

A composição da solução para lavagem bucal pode ser tampoadada com um tampão apropriado, por exemplo, citrato ou fosfato de sódio na faixa de pH de cerca de 6,0 a cerca de 7,5. A solução para lavagem bucal pode ser em forma não diluída (isto é, deve ser diluída antes do uso).

A composição para cuidado oral pode ser produzida usando qualquer método convencional conhecido na técnica de cuidado oral.

9. Composições para Processamento de Amido e Uso

Em outro aspecto, composições com uma α -amilase do *Bacillus*

sp. no. 707 ou variantes da mesma podem ser utilizadas para liquefação ou sacarificação de amido.

Um aspecto contempla composições e usos de composições para produzir adoçantes a partir de amido. Um processo "tradicional" para conversão de amido em xaropes de frutose normalmente consiste em três processos enzimáticos consecutivos, ou seja, um processo de liquefação seguido por um processo de sacarificação, e um processo de isomerização. Durante o processo de liquefação, o amido é degradado a dextrinas por uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variantes da mesma, em valores de pH entre cerca de 5,5 a cerca de 6,2 e a temperaturas de cerca de 95°C a cerca de 160°C por um período de aproximadamente 2 horas. A fim de assegurar ótima estabilidade de enzima sob estas condições, 1 mM de cálcio é adicionado (40 ppm de íons de cálcio livres). O processamento de amido é útil para produzir álcool (por exemplo, liquefação de cereal para álcool combustível e álcool de boca, produção de cerveja de álcool, liquefação de amido para produção de adoçante, processamento de cana de açúcar e outros objetivos do processamento de amido relacionados a alimentos. Outras condições podem ser usadas para diferentes α -amilases do *Bacillus* sp. no. 707 ou variantes das mesmas.

Após o processo de liquefação, as dextrinas são convertidas em dextrose através da adição de uma glicoamilase (por exemplo, AMG®) a uma enzima desramificadora, tal como uma isoamilase ou uma pululanase (por exemplo, Promozyme®). Antes desta etapa, o pH é reduzido para um valor abaixo de cerca de 4,5, mantendo o temperatura alta (acima de 95°C), e a atividade de liquefação da α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma é desnaturada. A temperatura é baixada pra 60°C, e uma glicoamilase e uma enzima desramificadora podem ser adicionadas. O processo de sacarificação prossegue tipicamente por cerca de 24 a cerca de 72 horas.

Após o processo de sacarificação, o pH é aumentado para um valor na faixa de cerca de 6,0 a cerca de 8,0, por exemplo, pH 7,5, e o cálcio é removido através de troca iônica. O xarope de dextrose é então convertido em xarope de alta frutose usando, por exemplo, uma glicose isomerase imo-

bilizada (tal como Sweetzyme®).

Pelo menos uma melhora enzimática deste processo pode ser realizada. Redução da dependência de cálcio da α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma de liquefação. A adição de cálcio livre é re-
5 querida para assegurar estabilidade adequadamente alta da α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma, porém cálcio livre reduz fortemente a atividade da glicose isomerase e precisa ser removido por meio de uma operação de unidade cara, a uma medida que reduz o nível de cálcio livre para baixo de 3 – 5 ppm. Economias de custo podem ser obtidas se tal
10 operação puder ser evitada, e o processo de liquefação puder ser realizado sem a adição de íons de cálcio livres.

Por exemplo, uma enzima dependente de menos cálcio, que é estável e altamente ativa em baixas concentrações de cálcio livre (< 40 ppm), pode ser utilizada na composição e procedimentos. Tal α -amilase do
15 *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma deve ter um pH ótimo a um pH na faixa de cerca de 4,5 a cerca de 6,5, ou na faixa de cerca de 4,5 a cerca de 5,5.

Uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma pode ser usada em montagens de laboratório e industriais para hidrolisar
20 amido ou qualquer composto compreendendo maltodextrina para uma variedade de fins. Estas α -amilases do *Bacillus* sp. no. 707 ou variantes das mesmas podem ser usadas sozinhas para proporcionar hidrólise específica ou podem ser combinadas com outras amilases para proporcionar um "coquetel" com um amplo espectro de atividade. Usos exemplares incluem a
25 remoção ou hidrólise parcial ou completa de amido ou qualquer composto compreendendo maltodextrina de amostras biológicas, alimentícias, de alimentação animal, farmacêuticas ou industriais.

Outro aspecto contempla composições e métodos de uso das composições em um processo de fermentação, em que um substrato de a-
30 mido é liquefeito e/ou sacarificado na presença da α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma para produzir glicose e/ou maltose adequada para conversão em um produto de fermentação através de um organismo de

fermentação, tal como uma levedura. Tais processos de fermentação incluem um processo para a produção de etanol para etanol combustível ou potável (álcool potável), um processo para produção de cerveja, um processo para produção de compostos orgânicos desejados (por exemplo, tal como

5 ácido cítrico, ácido itacônico, ácido láctico, ácido glucônico, gluconato de sódio, gluconato de cálcio, gluconato de potássio, glucono delta lactona ou eritorbato de sódio), cetonas, aminoácidos (tal como ácido glutâmico, monoglutaminato de sódio), porém também compostos mais complexos (por exemplo, antibióticos, tal como penicilina, tetraciclina), enzimas, vitaminas (por

10 exemplo, riboflavina, vitamina B₁₂, β-caroteno) e hormônios, que são difíceis de produzir sinteticamente.

O amido a ser processado pode ser uma qualidade de amido altamente refinado, tal como pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 99,5% puro. De modo alternativo, o amido pode ser um

15 amido mais bruto contendo material que compreende grãos inteiros moídos incluindo frações de não amido, tais como resíduos de germe e fibras. A matéria-prima, tal como grão inteiro, é moída a fim de abrir a estrutura e permitir processamento adicional. Dois processos de moagem podem ser usados: moagem a úmido e a seco. Também, canjiquinha, tal como canjiquinha moída,

20 pode ser aplicada.

Grão moído seco irá, em adição a amido, compreender quantidades significantes de compostos de carboidrato de não amido. Quando tal material heterogêneo é processado cozimento a jato de *Bacillus* sp. no. 707g, muitas vezes apenas uma gelatinização parcial do amido é alcançada.

25 Visto que a α-amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma tem uma alta atividade com respeito a amido não gelatinizado, a(s) enzima(s) pode(m) ser vantajosamente aplicada em um processo que compreende liquefação e/ou sacarificação de amido moído a seco cozido a jato.

Além disso, devido à atividade de hidrólise superior das α-amilases do *Bacillus* sp. no. 707 ou variantes das mesmas, a necessidade

30 de glicoamilase durante a etapa de sacarificação é grandemente reduzida. Isto permite que a sacarificação seja realizada em níveis muito baixos de

atividade de glucoamilase. A atividade da glicoamilase é ou ausente ou, se presente, então presente em uma quantidade de não mais do que ou até menos do que 0,5 AGU/g DS, ou não mais do que ou até menos do que 0,4 AGU/g DS, ou não mais do que ou até menos do que cerca de 0,3 AGU/g DS, ou não mais do que ou até menos do que cerca de 0,1 AGU, tal como não mais do que ou até menos do que cerca de 0,05 AGU/g DS de substrato de amido. "DS" é a unidade de enzima adicionada por grama de substrato sólido seco. Expressa em mg de proteína de enzima, a enzima que tem atividade de glicoamilase é ou ausente ou presente em uma quantidade de não mais do que ou até menos do que cerca de 0,5 mg EP/g DS, ou não mais do que ou até menos do que cerca de 0,4 mg EP/g DS, ou não mais do que ou até menos do que cerca de 0,3 mg EP/g DS, ou não mais do que ou até menos do que cerca de 0,1 mg EP/g DS (por exemplo, ou não mais do que ou até menos do que cerca de 0,05 mg EP/g DS ou não mais do que ou até menos do que 0,02 mg EP/g DS de substrato de amido). A glicoamilase pode ser derivada de uma cepa dentre *Aspergillus* sp., *Talaromyces* sp., *Pachykytospora* sp. ou *Trametes* sp., com exemplos exemplares sendo *Aspergillus niger*, *Talaromyces emersonii*, *Trametes cingulata* ou *Pachykytospora papyracea*.

O processo pode compreender a) colocar um substrato de amido em contato com uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma compreendendo um módulo catalítico que tem uma atividade de α -amilase e um módulo de ligação a carboidrato, por exemplo. O polipeptídeo do primeiro aspecto; b) incubar o dito substrato de amido com a dita enzima por um tempo e a uma temperatura suficiente para alcançar conversão de pelo menos 90%, ou pelo menos 92%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5% p/p do dito substrato de amido em açúcares fermentáveis; c) fermentar para produzir um produto de fermentação; e d) opcionalmente recuperar o produto de fermentação. Durante as etapas b) e/ou c) do processo, uma enzima que tem atividade de glicoamilase é ou ausente ou presente em uma quantidade de 0,001 a 2,0 AGU/g DS, de 0,01 a 1,5 AGU/g DS, de 0,05 a 1,0 AGU/g DS, de 0,01 a 0,5 AGU/g DS. A enzima que tem atividade

de glicoamilase pode estar ou ausente ou presente em uma quantidade de não mais do que ou até menos do que 0,5 AGU/g DS, ou não mais do que ou até menos do que 0,4 AGU/g DS, ou não mais do que ou até menos do que 0,3 AGU/g DS, ou não mais do que ou até menos do que 0,1 AGU/g DS (por exemplo, não mais do que ou até menos do que 0,05 AGU/g DS de substrato de amido). Expressa em mg de proteína de enzima, a enzima que tem atividade de glicoamilase é ou ausente ou presente em uma quantidade de não mais do que ou até menos do que 0,5 mg EP/g DS, ou não mais do que ou até menos do que 0,4 mg EP/g DS, ou não mais do que ou até menos do que 0,3 mg EP/g DS, ou não mais do que ou até menos do que 0,1 mg EP/g DS (por exemplo, não mais do que ou até menos do que 0,05 mg EP/g DS ou não mais do que ou até menos do que 0,02 mg EP/g DS de substrato de amido). Nas etapas a), b), c) e/ou d) do processo podem ser realizadas separada ou simultaneamente.

Em outro aspecto, o processo pode compreender: a) colocar um substrato de amido em contato com uma célula de levedura transformada para expressar uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma que compreende um módulo catalítico que tem atividade de α -amilase e um módulo de ligação a carboidrato; b) incubar o dito substrato de amido com a dita levedura por um tempo e a uma temperatura suficiente para alcançar conversão de pelo menos 90% p/p do dito substrato de amido em açúcares fermentáveis; c) fermentar para produzir etanol; d) opcionalmente recuperar etanol. As etapas a), b) e c) pode ser realizadas separada ou simultaneamente.

Em ainda outro aspecto, o processo compreendendo hidrólise de uma pasta fluida de amido gelatinizado ou granular, em particular hidrólise de amido granular em um hidrolisato de amido solúvel a uma temperatura abaixo da temperatura de gelatinização inicial do dito amido granular. Em adição a ser colocado em contato com um polipeptídeo que compreende um módulo catalítico que tem atividade α -amilase e um módulo de ligação a carboidrato. O amido pode ser colocado em contato com qualquer uma ou mais das seguintes alfa-amilase fúngica (EC 3.2.1.1) e uma ou mais das se-

guintes: uma β -amilase (EC 3.2.1.2) e uma glicoamilase (EC 3.2.1.3). Em um aspecto adicional, outra enzima amilolítica ou uma enzima desramificadora, tal como uma isoamilase (EC 3.2.1.68), ou uma pululanase (EC 3.2.1.41) pode ser adicionada à α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma.

Em uma modalidade, o processo é conduzido a uma temperatura abaixo da temperatura de gelatinização inicial. Tais processos são muitas vezes conduzidos a pelo menos 30°C, pelo menos 31°C, pelo menos 32°C, pelo menos 33°C, pelo menos 34°C, pelo menos 35°C, pelo menos 36°C, pelo menos 37°C, pelo menos 38°C, pelo menos 39°C, pelo menos 40°C, pelo menos 41°C, pelo menos 42°C, pelo menos 43°C, pelo menos 44°C, pelo menos 45°C, pelo menos 46°C, pelo menos 47°C, pelo menos 48°C, pelo menos 49°C, pelo menos 50°C, pelo menos 51°C, pelo menos 52°C, pelo menos 53°C, pelo menos 54°C, pelo menos 55°C, pelo menos 56°C, pelo menos 57°C, pelo menos 58°C, pelo menos 59°C ou pelo menos 60°C. O pH no qual o processo é conduzido pode estar na faixa de cerca de 3,0 a cerca de 7,0, ou de cerca de 3,5 a cerca de 6,0, ou de cerca de 4,0 a cerca de 5,0. Um aspecto contempla um processo que compreende fermentação, por exemplo, com uma levedura para produzir etanol, por exemplo, a uma temperatura em torno de 32°C, tal como a partir de 30°C a 35°C.

Em outro aspecto, o processo compreende sacarificação e fermentação simultâneas, por exemplo, com uma levedura para produzir etanol, ou outro organismo de fermentação adequado para produzir um composto orgânico desejado, tal como a uma temperatura a partir de 30°C a 35°C, por exemplo, em torno de 32°C.

No processo de fermentação acima, o teor de etanol alcança pelo menos cerca de 7%, pelo menos cerca de 8%, pelo menos cerca de 9%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 11%, pelo menos cerca de 12%, pelo menos cerca de 13%, pelo menos cerca de 14%, pelo menos cerca de 15% tal como pelo menos cerca de 16% de etanol.

A pasta fluida de amido a ser usada em quaisquer dos aspectos acima pode ter cerca de 20% a cerca de 55% de amido granular de sólidos

secos, cerca de 25% a cerca de 40% de amido granular de sólidos secos ou de cerca de 30% a cerca de 35% de amido granular de sólidos secos. Após ser colocado em contato com uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma, a enzima converte o amido solúvel em um hidrolisato de amido solúvel do amido granular na quantidade de pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91 %, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99%.

Em outra modalidade, uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma compreende um módulo catalítico que tem atividade de α -amilase e um módulo de ligação a carboidrato, por exemplo, o polipeptídeo do primeiro aspecto, é usado em um processo para liquefação, sacarificação de um amido gelatinizado, por exemplo, porém não limitado a gelatinização por cozimento a jato. O processo pode compreender fermentação para produzir um produto de fermentação, por exemplo, etanol. Tal processo para produção de etanol a partir de material contendo amido através de fermentação compreende: (i) liquefação do dito material contendo amido com um polipeptídeo compreendendo um módulo catalítico que tem atividade de α -amilase e um módulo de ligação a carboidrato, por exemplo, o polipeptídeo do primeiro aspecto; (ii) sacarificação da massa liquefeita obtida; e (iii) fermentação do material obtido na etapa (ii) na presença de um organismo de fermentação. Opcionalmente, o processo ainda compreende a recuperação do etanol. Os processos de sacarificação e fermentação podem ser realizados como um processo simultâneo de sacarificação e fermentação (processo SSF). Durante a fermentação, o teor de etanol alcança pelo menos cerca de 7%, pelo menos cerca de 8%, pelo menos cerca de 9%, pelo menos cerca de 10% tal como pelo menos cerca de 11%, pelo menos cerca de 12%, pelo menos cerca de 13%, pelo menos cerca de 14%, pelo menos 15%, tal como pelo menos 16% de etanol.

O amido a ser processado nos processos dos aspectos acima pode em particular ser obtido a partir de tubérculos, raízes, caules, legumes,

cereais ou grão inteiro. Mais especificamente, o amido granular pode ser obtido a partir de milhos, sabugos, trigo, cevada, centeio, milo, sagu, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, ervilhas, feijão, banana ou batatas. Também contemplados são ambos os tipos cerosos e não cerosos de milho e cevada.

5 A composição descrita acima pode ser usada para liquefazer e/ou sacarificar um amido gelatinizado ou granular, e um amido parcialmente gelatinizado. Um amido parcialmente gelatinizado é um amido que é gelatinizado até alguma medida, isto é, em que parte do amido inchou e gelatinizou irreversivelmente e parte do amido ainda está presente em um estado
10 granular.

 A composição descrita acima pode compreender uma variante de α -amilase de ácido presente em uma quantidade de 0,01 a 10,0 AFAU/g DS, ou 0,1 a 5,0 AFAU/g DS, ou 0,5 a 3,0 AFAU/AGU, ou 0,3 a 2,0 AFAU/g DS. A composição pode ser aplicada em qualquer dos processos de amido
15 descritos acima.

 Conforme usado aqui, o termo "liquefação" ou "liquefazer" significa um processo pelo qual o amido é convertido em dextrinas de cadeia mais curta e menos viscosas. De modo geral, este processo envolve a gelatinização do amido simultaneamente com ou seguido pela adição de uma α -
20 amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma. Enzimas adicionais que induzem a liquefação também podem ser adicionadas.

 Conforme usada aqui, a expressão "liquefação primária" se refere a uma etapa de liquefação quando a temperatura da pasta fluida é elevada para ou próxima a sua temperatura de gelatinização. Subsequente à elevação da temperatura, a pasta fluida é enviada através de um trocador de
25 calor ou de jato para temperaturas de 93,3 – 148,8°C (200 – 300 °F), por exemplo, 104,4 – 112,7°C (220 – 235 °F). Subsequente à aplicação a um trocador de calor ou temperatura a jato, a pasta fluida é mantida por um período de 3 – 10 minutos naquela temperatura. Esta etapa de manter a pasta
30 fluida a 93,3 – 148,8°C (200 – 300 °F) é liquefação primária.

 Como usada aqui, a expressão "liquefação secundária" se refere à etapa de liquefação subsequente à liquefação primária (aquecimento a

93,3 – 148,8°C (200 – 300 °F), onde a pasta fluida é deixada resfriar para a temperatura atmosférica. Esta etapa de resfriamento pode ser de 30 minutos a 180 minutos (3 horas), por exemplo, 90 minutos a 120 minutos (2 horas).

Como usada aqui, a expressão "minutos de liquefação secundária" se refere ao tempo que transcorreu do início da liquefação secundária ao tempo que o DE é medido.

Outro aspecto contempla o uso adicional de uma α -amilase na composição que compreende α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma. β -Amilases (EC 3.2.1.2) são amilases maltogênicas de ação exo, que catalizam a hidrólise de ligações 1,4- α -glicosídicas a amilose, amilopectina e polímeros de glicose relacionando, desse modo liberando maltose.

β -Amilases foram isoladas a partir de várias plantas e microorganismos (W. M. Fogarty and C. T. Kelly, *Progress in Industrial Microbiology*, vol. 15, pp. 112-115, 1979). Estas β -amilases são caracterizadas por terem temperaturas ótimas na faixa de 40°C a 65°C, a pH ótimo na faixa de cerca de 4,5 a cerca de 7,0. β -Amilases contempladas incluem, mas não estão limitadas a, β -amilases da barley Spezyme® BBA 1500, Spezyme® DBA, Optimalt® ME, Optimalt® BBA (Genencor International Inc.) e Novozym® WBA (Novozymes A/S).

Outra enzima contemplada para uso na composição é uma glicoamilase (EC 3.2.1.3). Glicoamilases são derivadas de um micro-organismo ou uma planta. Glicoamilases exemplares são de origem fúngica ou bacteriana. Glicoamilases bacterianas exemplares são glicoamilases de *Aspergillus*, em particular glicoamilase de *A. niger* G1 ou G2 (Boel et al., *EMBO J.* 3(5): 1097-1102 (1984), ou variantes das mesmas, como descrito em WO 92/00381 e WO 00/04136; a glicoamilase de *A. awamori* (WO 84/02921); *A. oryzae* (*Agric. Biol. Chem.*, 55(4): 941-949 (1991)), ou variantes ou fragmentos da mesma.

Outras variantes de glicoamilase de *Aspergillus* contempladas incluem variantes para aumentar a estabilidade térmica: G137A e G139A (Chen et al., *Prot. Eng.* 9: 499-505 (1996)); D257E e D293E/Q (Chen et al., *Prot. Eng.* 8: 575-582 (1995)); N182 (Chen et al., *Biochem. J.* 301: 275-281

(1994)); ligações dissulfeto, A246C (Fierobe et al., *Biochemistry*, 35: 8698-8704 (1996)); e Introduction of Pro residues in positions A435 and S436 (Li et al., *Protein Eng.* 10: 1199-1204 (1997)). Outras glicoamilases contempladas incluem glicoamilases de *Talaromyces*, em particular derivadas de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (Patente U.S. No. RE 32,153), *Talaromyces duponti*, *Talaromyces thermophilus* (Patente U.S. No. 4,587,215). Glicoamilases bacterianas contempladas incluem glicoamilases do gênero *Clostridium*, em particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135138) e *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831). Glicoamilases exemplares incluem as glicoamilases derivadas de *Aspergillus oryzae*. Também contempladas são as glicoamilases comerciais, tal como AMG 200L; AMG 300 L; SAN[®] SUPER e AMG[®] E (Novozymes); OPTIDEX[®]300 (da Genencor International, Inc.); AMIGASE[®] e AMIGASE[®] PLUS (DSM); G-ZYME[®] G900 (Enzyme Bio-Systems); G-ZYME[®] G990 ZR (glicoamilase de *A. niger* e baixo teor de protease).

Glicoamilases podem ser adicionadas em uma quantidade de 0,02 – 2,0 AGU/g DS, ou 0,1 – 1,0 AGU/g DS, tal como 0,2 AGU/g DS.

Enzimas adicionais e variantes de enzima também são contempladas para inclusão na composição. Uma ou mais α -amilases podem ser usadas em adição a uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma, ou podem adicionalmente incluir outras enzimas discutidas acima.

Outra enzima que pode opcionalmente ser adicionada é uma enzima desramificadora, tal como uma isoamilase (EC 3.2.1.68) ou uma pululanase (EC 3.2.1.41). Isoamilase hidrolisa ligações de ramificação α -1,6-D-glicosídicas em amilopectina e dextrinas de β -limite e pode ser distinguida de pululanases pela incapacidade da isoamilase para atacar pululana e pela ação limitada sobre α -dextrinas limite. Enzimas desramificadoras podem ser adicionadas em quantidades eficazes bem conhecidas para a pessoa versada na técnica.

A composição exata dos produtos do processo depende da combinação das enzimas aplicadas, assim como do tipo de amido granular processado. Por exemplo, o hidrolisato solúvel pode ser maltose com uma

pureza de pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95,0%, pelo menos cerca de 95,5%, pelo menos cerca de 96,0%, pelo menos cerca de 96,5%, pelo menos cerca de 97,0%, pelo menos cerca de 97,5%, pelo menos cerca de 98,0%, pelo menos cerca de 98,5, pelo menos cerca de 99,0% ou pelo menos cerca de 99,5%. De modo alternativo, o hidrolisato de amido solúvel pode ser glicose ou o hidrolisato de amido tem um DX (percentual de glicose de sólidos secos solubilizados totais) de pelo menos 94,5%, pelo menos 95,0%, pelo menos 95,5%, pelo menos 96,0%, pelo menos 96,5%, pelo menos 97,0%, pelo menos 97,5%, pelo menos 98,0%, pelo menos 98,5, pelo menos 99,0% ou pelo menos 99,5%. O processo pode incluir um produto que é especialmente xarope, tal como um xarope especialmente contendo uma mistura de glicose, maltose, DP3 e DPn para uso na fabricação de sorvetes, bolos, doces, frutas em conserva.

Dois processos de moagem são: moagem a úmido e a seco. Na moagem a seco, o caroço inteiro é moído e usado. Moagem a úmido proporciona uma boa separação de germe e farelo (grânulos e proteína de amido), e é, com poucas exceções, aplicado a locais onde o hidrolisato de amido é usado na produção de xaropes. Ambas as moagens a seco e a úmido são bem conhecidas na técnica de processamento de amido e são igualmente contempladas para uso com as composições e métodos descritos. O processo pode ser conduzido em um sistema de ultrafiltração, onde o retentado é mantido sob recirculação na presença de enzimas, amido cru e água, e onde o permeato é o hidrolisato de amido solúvel. Igualmente contemplado é o processo conduzido em um reator de membrana contínua com membranas de ultrafiltração e onde o retentado é mantido sob recirculação na presença de enzimas, amido cru e água, e onde o permeato é o hidrolisato de amido solúvel. Também contemplado é o processo conduzido em um reator de membrana contínua com membranas de microfiltração e onde o retentado é mantido sob recirculação na presença de enzimas, amido cru e água, e onde o permeato é o hidrolisato de amido solúvel.

Em uma consideração, o hidrolisato de amido solúvel do processo é submetido à conversão em xarope à base de amido de alta frutose

(HFSS), tal como xarope de milho de alta frutose (HFCS). Esta conversão pode ser alcançada usando uma glicose isomerase, e através de uma glicose isomerase imobilizada suportada sobre um suporte sólido. Isomerases contempladas incluem os produtos comerciais Sweetzyme[®], IT (Novozymes A/S); G-zyme[®] IMGI, e G-zyme[®] G993, Ketomax[®], G-zyme[®] G993 (Rhodia); G-zyme[®] G993 líquido, GenSweet[®] IGI (Genencor International, Inc.).

Em outro aspecto, o hidrolisato de amido solúvel produzido por estes métodos pode ser usado na produção de etanol combustível ou potável. No processo do terceiro aspecto, a fermentação pode ser realizada simultaneamente ou separadamente/sequencial à hidrólise da pasta fluida de amido granular. Quando a fermentação é realizada simultaneamente à hidrólise, a temperatura é entre 30°C e 35°C, ou entre 31°C e 34°C. O processo pode ser conduzido em um sistema de ultrafiltração, onde o retentado é mantido sob recirculação na presença de enzimas, amido cru, levedura, nutrientes de levedura e água, e onde o permeato é um líquido contendo etanol. Igualmente contemplado é o processo conduzido em um reator de membrana contínua com membranas de ultrafiltração e onde o retentado é mantido sob recirculação na presença de enzimas, amido cru, levedura, nutrientes de levedura e água, e onde o permeato é um líquido contendo etanol.

O hidrolisato de amido solúvel do processo também pode ser usado para a produção de um produto de fermentação que compreende fermentar o amido tratado em um produto de fermentação, tal como ácido cítrico, glutamato de monossódio, ácido glucônico, gluconato de sódio, gluconato de cálcio, gluconato de potássio, glucono delta lactona ou eritorbato de sódio.

A atividade amilolítica de uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma pode ser determinada usando amido de batata como substrato. Este método é à base da quebra de amido de batata modificado pela enzima, e a reação é seguida pela mistura de amostras da solução de amido/azima com uma solução de iodo. Inicialmente, uma cor azul escuro é formada, porém durante a quebra do amido, a cor azul fica mais fraca e gra-

dualmente se torna um castanho-avermelhado, que é comparado a um padrão de vidro colorido.

10. Composições e Métodos para Desengomagem de Têxtil

Também contempladas são composições e métodos de tratamento de tecidos (por exemplo, para desengomar um têxtil) usando uma ou mais α -amilases do *Bacillus* sp. no. 707 ou variantes das mesmas. A enzima pode ser usada em qualquer método de tratamento de tecido, que são bem conhecidos na técnica, veja, por exemplo, Patente US No. 6,077,316. Por exemplo, em um aspecto, o tato e a aparência de um tecido são melhorados através de um método que compreende colocar tecido em contato com a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma em uma solução. Em um aspecto, o tecido é tratado com a solução sob pressão.

Em um aspecto, as enzimas são aplicadas durante ou após a tecelagem de têxteis, ou durante o estágio de desengomagem, ou uma ou mais etapas adicionais de processamento de tecido. Durante a tecelagem dos têxteis, os fios são expostos à considerável tensão mecânica. Antes da tecelagem em teares mecânicos, fios de urdidura são muitas vezes revestidos com amido de engomagem ou derivados de amido a fim de aumentar sua resistência à tração a prevenir a quebra. As enzimas podem ser aplicadas para remover este amido de engomagem ou derivados de amido. Após os têxteis serem tecidos, um tecido pode prosseguir para um estágio de desengomagem. Isto pode ser seguido por uma ou mais etapas adicionais de processamento de tecido. Desengomagem é o ato de remover goma de têxteis. Após a tecelagem, o revestimento de goma deve ser removido antes de processamento adicional do tecido a fim de assegurar um resultado homogêneo e à prova de lavagem. Também proporcionado é um método de desengomagem que compreende hidrólise enzimática da goma através da ação de uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma.

As enzimas podem ser usadas sozinhas ou com outros reagentes químicos de desengomagem e/ou enzimas de desengomagem para desengomar tecidos, incluindo tecidos contendo algodão, como aditivos para detergente, por exemplo, em composições aquosas. Uma α -amilase do Ba-

cillus sp. no. 707 ou variante da mesma também pode ser usada em composições e métodos para produzir um visual lavado com pedra no tecido e vestuários denim tingido com índigo. Para a fabricação de roupas, o tecido pode ser cortado e costurado em roupas ou vestuários, que são mais tarde acabados. Em particular, para a fabricação de jeans denim, diferentes métodos de acabamento enzimático foram desenvolvidos. O acabamento de vestuário denim normalmente é iniciado com uma etapa de desengomagem enzimática, durante a qual vestuários são submetidos à ação de enzimas amilolíticas a fim de proporcionar maciez ao tecido e tornar o algodão mais acessível às etapas subsequentes de acabamento enzimático. As enzimas podem ser usadas em métodos de acabamento de vestuários denim (por exemplo, um "processo de desbotamento bio-stoning"), desengomagem enzimática e provisão de maciez a tecidos e/ou processo de acabamento. A dosagem da amilase varia dependendo do tipo de processo. Dosagens menores requerem mais tempo do que dosagens maiores da mesma enzima. Entretanto, não há limite superior para a quantidade de uma amilase de desengomagem presente exceto aquele ditado pelas restrições físicas da solução. Desse modo, o limite da enzima pode ser a quantidade capaz de solubilização na solução. Tipicamente, enzimas de desengomagem, tais como α -amilases, são incorporadas à composição de tratamento em uma quantidade de cerca de 0,00001% a cerca de 2% de proteína de enzima por peso do tecido; ou de cerca de 0,0001% a cerca de 1% de proteína de enzima por peso do tecido; ou de cerca de 0,001% a cerca de 0,5% de proteína de enzima por peso do tecido; e em outro exemplo será de cerca de 0,01% a cerca de 0,2% de proteína de enzima por peso do tecido.

11. Composições e Métodos para Assar e Preparação de Alimentos

Para o uso comercial e domiciliar de farinha para assar e produção de alimentos, é importante manter um nível apropriado de atividade α -amilase na farinha. Um nível de atividade muito alto pode resultar em um produto que é pegajoso e/ou pastoso e não-comercializável; porém farinha com atividade insuficiente de α -amilase pode não conter açúcar suficiente para a função apropriada de levedura, resultando em pão seco e quebradiço.

Para aumentar o nível de atividade de α -amilase endógena em farinha, uma α -amilase pode ser adicionada à farinha na forma de uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma. Portanto, a capacidade de determinar o nível de atividade de ambas α -amilases endógena (natural) e fúngica, ou outra α -amilase, em uma amostra de farinha seria benéfica para o processo de produção de alimentos e promoveria uso mais eficiente de farinha na produção de alimentos.

Em adição ao uso de grãos e outros produtos de planta para assar, grãos tal como cevada, aveia, trigo, assim como componentes de planta, tal como milho, lúpulo e centeio, são usados para a produção de cerveja, tanto na indústria quanto para produção de cerveja domiciliar. Os componentes usados na produção de cerveja podem ser não maltados ou maltados, o que significa parcialmente germinados, resultando em um aumento nos níveis de enzimas, incluindo α -amilase. Para produção de cerveja bem sucedida, níveis adequados de atividade da enzima α -amilase são necessários para assegurar os níveis apropriados de açúcares para fermentação.

Como usado aqui, o termo "farinha" significa grão de cereal moído ou triturado. O termo "farinha" também pode significar produtos de Sagu ou tubérculo que foram triturados ou amassados. Em algumas modalidades, farinha também pode conter componentes em adição ao cereal moído ou amassado ou matéria vegetal. Um exemplo de um componente adicional, embora não seja destinado a ser limitativo, é um agente levedante. Grãos de cereal incluem: trigo, aveia, centeio e cevada. Produtos de tubérculo podem incluir farinha de tapioca, farinha de mandioca e custard em pó. O termo "farinha" também inclui farinha de milho triturado, farelo de milho, farinha de arroz, farinha integral, farinha fermentada, farinha de tapioca, farinha de mandioca, arroz triturado, farinha enriquecida e pudim em pó.

Como usado aqui, o termo "estoque" significa grãos e componentes e planta que são esmagados ou quebrados. Por exemplo, a cevada usada na produção de cerveja é um grão que foi grosseiramente triturado ou esmagado para proporcionar uma consistência apropriada para a produção de uma massa para fermentação. Como usado aqui, o termo "estoque" inclui

qualquer dos tipos acima mencionados de plantas e grãos em forma amas-
sada ou grosseiramente triturado. Os métodos descritos aqui podem ser u-
sados para determinar níveis de atividade de α -amilase em farinhas, e tam-
bém em estoque, que inclui os tipos acima mencionados de grãos, tubércu-
5 los e outros produtos de planta que foram esmagados.

Também descritos são métodos para medir atividade de α -
amilase em farinha e grão ou produtos de tubérculo e estoque. Como usado
aqui, o termo " α -amilase" significa α -amilase endógena (presente na farinha
ou estoque) ou uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma
10 que foi adicionada à farinha ou estoque.

Uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma
sozinha ou em uma combinação com outras amilases pode ser adicionada
para prevenir envelhecimento. As amilases antienvelhecimento usadas po-
dem ser qualquer amilase que seja eficaz em retardar o envelhecimento
15 (crumb firming) dos produtos assados.

A amilase pode ter uma temperatura ótima na presença de ami-
do nas faixas, por exemplo, de 30 - 90°C, 50 - 80°C, 55 - 75°C, 60 - 70°C. A
temperatura ótima pode ser medida em uma solução a 1% de amido solúvel
a pH 5,5.

20 Amilases antienvelhecimento adicionais que podem ser usadas
em combinação com α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 incluem endo-
amilases, por exemplo, uma endo-amilase bacteriana de *Bacillus*. Por exem-
plo, a amilase adicional pode ser uma alfa-amilase maltogênica (EC
3.2.1.133), por exemplo, de *Bacillus*. Novamyl® é uma alfa-amilase maltogê-
nica de *B. stearothermophilus* cepa NCIB 11837 e é descrita em C. Christo-
25 phersen et al., 1997 *Starch* 50(1): 39-45.

Outros exemplos de endo-amilases antienvelhecimento podem
incluir outras alfa-amilases bacterianas, derivadas, por exemplo, de *Bacillus*,
tal como *B. licheniformis* ou *B. amyloliquefaciens*.

30 A amilase antienvelhecimento pode ser uma exo-amilase, tal
como beta-amilases, por exemplo, de fontes vegetais (por exemplo, soja) ou
microbianas (por exemplo, *Bacillus*).

A α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 pode ser adicionada sozinha ou com outras amilases em uma quantidade eficaz para retardar o envelhecimento (crumb firming) do produto assado. A quantidade de amilase anti-envelhecimento estará tipicamente na faixa de 0,01 – 10 mg de proteína de enzima por kg de farinha, por exemplo, 1 – 10 mg/kg.

A composição para assar compreendendo uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 pode também compreender uma fosfolipase. A fosfolipase pode ter atividade A₁ ou A₂ para remover ácido graxo do fosfolípido e formar um lisofosfolípido. Ela pode ter ou não atividade de lipase, isto é, atividade sobre triglicerídeos. A fosfolipase pode ter uma temperatura ótima na faixa de 30 – 90°C, por exemplo, 30 – 70°C. As fosfolipases adicionadas podem ser de origem animal, por exemplo, do pâncreas (por exemplo, pâncreas bovino ou suíno), veneno de cobra ou veneno de abelha. De modo alternativo, a fosfolipase pode ser de origem microbiana, por exemplo, de fungos filamentosos, levedura ou bactérias, tal como o gênero ou espécie *Aspergillus*, *A. niger*; *Dictyostelium*, *D. discoideum*; *Mucor*, *M. javanicus*, *M.ucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, *N. crassa*; *Rhizomucor*, *R. pusillus*; *Rhizopus*, *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*; *Sclerotinia*, *S. libertiana*; *Trichophyton*, *T. rubrum*; *Whetzelinia*, *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*; *Citrobacter*, *C. freundii*; *Enterobacter*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*; *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Erwinia*, *E. herbicola*; *Escherichia*, *E. coli*; *Klebsiella*, *K. pneumoniae*; *Proteus*, *P. vulgaris*; *Providencia*, *P. stuartii*; *Salmonella*, *S. typhimurium*; *Serratia*, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, *S. flexneri*; *Streptomyces*, *S. violeceoruber*; *Yersinia*, *Y. enterocolitica*; *Fusarium*, *F. oxysporum* (por exemplo, cepa DSM 2672).

A fosfolipase é adicionada em uma quantidade que aumenta a maciez do pão durante o período inicial após assar, particularmente as primeiras 24 horas. A quantidade de fosfolipase estará tipicamente na faixa de 0,01 – 10 mg de proteína de enzima por kg de farinha (por exemplo, 0,1 – 5 mg/kg) ou 200 – 5000 LEU/kg de farinha (por exemplo, 500 – 2000 LEU/kg). Uma fosfolipase com atividade de lipase é geralmente adicionada em uma quantidade que corresponde a uma atividade de lipase de 20 - 1000 LU/kg

de farinha, particularmente 50 - 500 LU/kg. Uma LU (Unidade de Lipase) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de ácido butírico por minuto a 30,0°C; pH 7,0; com goma arábica como emulsificante e tributirina como substrato.

5 Composições de massa de farinha geralmente compreendem farelo de trigo ou farinha de trigo e/ou outros tipos de farelo, farinha ou amido, tal como farinha de milho, amido de milho, farelo de centeio, farinha de centeio, farinha de aveia, farelo de aveia, farinha de soja, farelo de sorgo, farinha de sorgo, farelo de batata, farinha de batata ou amido de batata. A
10 massa de farinha pode ser fresca, congelada ou pré-assada.

A massa de farinha normalmente é uma massa de farinha levedada ou uma massa de farinha para ser submetida à levedação. A massa de farinha pode ser levedada de vários modos, tal como através da adição de agentes químicos de levedação, por exemplo, bicarbonato de sódio, ou através da adição de um fermento (massa de farinha de fermentação). Por exemplo, a massa de farinha pode ser levedada através da adição de uma
15 cultura de levedura adequada, tal como uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de padeiro), por exemplo, uma cepa comercialmente disponível de *S. cerevisiae*.

20 A massa de farinha também pode compreender outros ingredientes para massa de farinha convencionais, por exemplo, proteínas, tal como leite em pó, glúten e soja; ovos (ovos inteiros, gemas de ovos ou ovos brancos); um oxidante tal como ácido ascórbico, bromato de potássio, iodato de potássio, azodicarbonamida (ADA) ou persulfato de amônio; um aminoácido,
25 tal como L-cisteína; um açúcar; um sal, tal como cloreto de sódio, acetato de sódio, sulfato de sódio ou sulfato de cálcio.

A massa de farinha pode compreender gordura (triglicerídeo), tal como gordura granulada ou reduzida.

30 A massa de farinha pode ainda compreender um emulsificante, tal como mono ou diglicerídeos, ésteres de ácido diacetil tartárico de mono ou diglicerídeo; ésteres de açúcar de ácidos graxos, poliglicerol ésteres de ácidos graxos, ésteres de ácido láctico de monoglicerídeos, ésteres de ácido

acético de monoglicérides, estearatos de polioxietileno ou lisoecitina, porém é aplicável a uma massa de farinha que é feita sem a adição de emulsificantes (exceto opcionalmente fosfolipídio).

Opcionalmente, uma enzima adicional pode ser usada junto com a amilase antienvhecimento e a fosfolipase. A enzima adicional pode ser uma
5 segunda amilase, tal como uma amiloglicosidase, uma beta-amilase, uma cilodextrina glucano transferase, ou a enzima adicional pode ser uma peptidase, em particular uma exopeptidase, uma transglutaminase, uma lipase, uma celulase, a hemicelulase, em particular uma pentosanase, tal como xil
10 lanase, uma protease, uma proteína dissulfeto isomerase, por exemplo, uma proteína dissulfeto isomerase como descrita em WO 95/00636, uma glicosiltransferase, uma enzima ramificadora (enzima ramificadora 1,4- α -glucanoo), uma 4- α -glucano transferase (dextrina glicosiltransferase) ou uma oxidoreductase, por exemplo, uma peroxidase, uma lacase, uma glicose oxidase,
15 uma piranose oxidase, uma lipoxigenase, uma L-aminoácido oxidase ou uma carbohidrato oxidase.

A enzima adicional pode ser de qualquer origem, incluindo origem mamífera e vegetal, assim como de origem microbiana (bacteriana, de levedura ou fúngica) e pode ser obtida através de técnicas convencionalmente usadas na técnica.
20

A xilanase pode ser de origem microbiana, por exemplo, derivada de uma bactéria ou fungo, tal como uma cepa de *Aspergillus*, em particular de *A. aculeatus*, *A. niger* (cf. WO 91/19782), *A. awamori* (WO 91/18977), ou *A. tubigensis* (WO 92/01793); de uma cepa de *Trichoderma*, por exemplo,
25 *T. reesei*, ou de uma cepa de *Humicola*, por exemplo, *H. insolens* (WO 92/17573). Pentopan® e Novozym 384® são preparações de xilanase comercialmente disponíveis produzidas a partir de *Trichoderma reesei*.

A amiloglicosidase pode ser uma amiloglicosidase de *A. niger* (tal como AMG®). Outros produtos de amilase úteis incluem Grindamyl® A
30 1000 ou A 5000 (disponível pela Grindsted Products, Dinamarca) e Amylase® H ou Amylase® P (disponíveis pela DSM Gist Brocades, Holanda).

A glicose oxidase pode ser uma glicose oxidase fúngica, em par-

ricular uma glicose oxidase de *Aspergillus niger* (tal como Gluzyme®).

Proteases exemplares são Neutrase® (Novozymes) e Protex OxG (Genencor International, Inc.).

Lipase exemplar pode ser derivada de cepas de *Thermomyces*
5 (*Humicola*), *Rhizomucor*, *Candida*, *Aspergillus*, *Rhizopus* ou *Pseudomonas*,
em particular de *Thermomyces lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*), *Rhizo-*
mucor miehei, *Candida antarctica*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* ou
Rhizopus arrhizus ou *Pseudomonas cepacia*. Em modalidades específicas, a
lipase pode ser Lipase A ou Lipase B derivada de *Candida Antarctica*, con-
10 forme descrito em WO 88/02775, ou a lipase pode ser derivada de *Rhizomu-*
cor miehei, conforme descrito em EP 238,023, ou *Humicola lanuginosa* con-
forme descrito em EP 305,216, ou *Pseudomonas cepacia* conforme descrito
em EP 214,761 e WO 89/01032.

O processo pode ser usado para qualquer tipo de produto assa-
15 do preparado de massa de farinha, ou de um caráter macio ou torrado de um
tipo branco, light ou escuro. Exemplos são pães (em particular pão branco,
integral ou de centeio), tipicamente na forma de pães de fôrma ou rolos, pão
francês do tipo baguete, pão sírio, tortilhas, bolos, panquecas, bolachas, bis-
coitos, fatias de torta, torrada, pão cozido no vapor, pizza e semelhantes.

20 Outro aspecto contempla o uso da α -amilase do *Bacillus* sp. no.
707 ou variante da mesma em uma pré-mistura que compreende farinha jun-
to com uma amilase antienvelhecimento, uma fosfolipase e um fosfolipídio. A
pré-mistura pode conter outros aditivos melhoradores de massa de farinha
e/ou melhoradores de pão, por exemplo, quaisquer dos aditivos, incluindo
25 enzimas, mencionados acima.

Outro aspecto proporcionado é uma preparação de enzima que
compreende uma amilase antienvelhecimento e uma fosfolipase, para uso
como um aditivo para assar. A preparação de enzima pode estar na forma
de um granulado ou pó aglomerado, Ela pode ter uma distribuição estreita
30 de tamanho de partícula com mais do que 95% (por peso) das partículas na
faixa de 25 a 900 μm .

Granulados e pós aglomerados podem ser preparados através

de métodos convencionais, por exemplo, pulverizando a amilase sobre um
carreador em um granulador de leito fluidizado. O carreador pode consistir
em núcleos particulados que têm um tamanho de partícula adequado. O
carreador pode ser solúvel ou insolúvel, por exemplo, um sal (tal como NaCl
5 ou sulfato de sódio), um açúcar (tal como sacarose ou lactose), um álcool de
açúcar (tal como sorbitol), amido, arroz, canjiquinha ou soja.

Outro aspecto contempla o envelopamento de uma α -amilase do
Bacillus sp. no. 707. Para preparar as partículas envelopadas de alfa-
amilase, as enzimas são colocadas em contato com um lipídio de grau ali-
10 mentício, discutido em maiores detalhes abaixo, em quantidade suficiente
para suspender todas as partículas de alfa-amilase.

Lipídios de grau alimentício, como usado aqui, podem ser qual-
quer composto naturalmetne orgânico que seja insolúvel em água, porém
solúvel em solventes orgânicos não polares, tal como hidrocarboneto ou die-
15 til éter. Os lipídios de grau alimentício utilizados podem incluir, porém não
estão limitados a, triglicerídeos na forma de gorduras ou óleos que são satu-
rados ou insaturados. Exemplos de ácidos graxos e combinações dos mes-
mos que compõem os triglicerídeos saturados utilizados incluem, mas não
estão limitados a, butírico (derivado de gordura do leite), palmítico (derivado
20 de gordura animal e vegetal) e/ou esteárico (derivado de gordura animal e
vegetal). Exemplos de ácidos graxos e combinações dos mesmos que com-
põem os triglicerídeos insaturados incluem, porém não estão limitados a,
palmitoleico (derivado de gordura animal e vegetal), oleico (derivado de gor-
dura animal e vegetal), linoleico (derivado de óleos vegetais) e/ou linoleico
25 (derivado de óleo de linhaça). Outros lipídios de bom grau contemplados e
dentro do escopo incluem, mas não estão limitados a, monoglicerídeos e
diglicerídeos derivados dos triglicerídeos discutidos acima, fosfolipídios e
glicolipídios.

O lipídio de grau bom, na forma líquida, é colocado em contato
30 com uma forma em pó das partículas de alfa-amilase, de tal modo que o ma-
terial de lipídio cobre pelo menos uma porção da superfície de pelo menos a
maioria e, por exemplo, 100% das partículas de α -amilase. Desse modo,

cada partícula de alfa-amilase é individualmente envelopada em um lipídio. Por exemplo, todas ou substancialmente todas as partículas de α -amilase são providas de um filme de envelopamento fino, contínuo de lipídio. Isto pode ser realizado primeiro vertendo uma quantidade de lipídio em um recipiente, e então fluidificando a alfa-amilase de modo que o lipídio umidifica completamente a superfície de cada partícula de alfa-amilase. Após um curto período de agitação, as partículas envelopadas de α -amilase, que portam uma quantidade substancial dos lipídios sobre suas superfícies, são recuperadas. A espessura do revestimento assim aplicado às partículas de α -amilase pode ser controlada através da seleção do tipo de lipídio usado e através da repetição da operação a fim de construir um filme mais espesso, quando desejado.

O armazenamento, manipulação e incorporação do veículo de distribuição carregado podem ser realizados por meio de uma mistura embalada. A mistura embalada pode compreender a α -amilase envelopada. Entretanto, a mistura embalada pode ainda compreender ingredientes adicionais, como requerido pelo fabricante ou padeiro. Após a α -amilase envelopada ser incorporada à massa de farinha, o padeiro continua com o processo de produção normal para aquele produto.

As vantagens do envelopamento da α -amilase são dobradas. Primeiro, o lipídio de grau alimentício protege a enzima de desnaturação térmica durante o processo de assar para aquelas enzimas que são lábeis ao calor. Consequentemente, embora a alfa-amilase seja estabilizada e protegida durante os estágios de verificação e assar, ela é liberada do revestimento protetor no produto final bem assado, onde hidrolisa as ligações glicosídicas em poliglucanos. O veículo de distribuição carregado também proporciona uma liberação prolongada da enzima ativa no artigo assado. Isto é, após o processo de assar, α -amilase ativa é continuamente liberada do revestimento protetor a uma taxa que neutraliza e, portanto, reduz a taxa de mecanismos de envelhecimento.

Em geral, a quantidade de lipídio aplicada às partículas de α -amilase pode variar de um percentual baixo do peso total da α -amilase a

muitas vezes este peso, dependendo da natureza do lipídio, da maneira em que ele é aplicado às partículas de α -amilase, da composição da mistura de massa de farinha a ser tratada e do rigor da operação de mistura de massa de farinha envolvida.

5 O veículo de distribuição carregado (isto é, a enzima envelopada de lipídio) é adicionado aos ingredientes usados para preparar um artigo assado em uma quantidade eficaz para prorrogar a vida útil do artigo assado. O padeiro avalia a quantidade de α -amilase envelopada, preparada conforme discutido acima, que será necessária para alcançar o efeito antienvelhecimento desejado. A quantidade da alfa-amilase envelopada necessária é calculada com base na concentração de enzima envelopada e na proporção de α -amilase para farinha especificada. Uma ampla faixa de concentração foi verificada ser eficaz, embora, como foi discutido, melhoras observáveis em antienvelhecimento não correspondem de modo linear à concentração de α -amilase, porém acima de certos níveis mínimos, grandes aumentos na concentração de α -amilase produzem pouca melhora adicional. A concentração de α -amilase realmente usada em uma produção de padaria específica pode ser mais superior do que o mínimo necessário para proporcionar o padeiro com alguma segurança contra erros inadvertidos de sub-medição pelo padeiro. O limite inferior da concentração de enzima é determinado pelo efeito antienvelhecimento mínimo que o padeiro deseja alcançar.

Um método típico de preparar um artigo assado de acordo com o método compreende: a) preparar partículas de alfa-amilase revestidas de lipídio, em que substancialmente 100 por cento das partículas de α -amilase são revestidas; b) misturar uma massa de farinha contendo farinha; c) adicionar a α -amilase revestida de lipídio à massa de farinha antes da mistura estar completa e terminar a mistura antes do revestimento de lipídio ser removido da alfa-amilase; d) verificar a massa de farinha; e e) assar a massa de farinha para proporcionar o artigo assado, em que a α -amilase está inativa durante os estágios de mistura, verificação e assar e está ativa no artigo assado.

Desse modo, a α -amilase envelopada pode ser adicionada à

massa de farinha próximo ao final do ciclo da mistura. Uma característica do método é que a α -amilase envelopada é adicionada em um ponto no estágio da mistura que permite distribuição suficiente da α -amilase envelopada por toda a massa de farinha, entretanto, o estágio de mistura é terminado antes

5 do revestimento protetor se tornar esvaziado da(s) partícula(s) de α -amilase. Dependendo do tipo e volume da massa de farinha, e da ação e velocidade do misturador, qualquer de ponto de um a seis minutos ou mais deve ser necessário para misturar a α -amilase envelopada à massa de farinha, porém dois a quatro minutos na média. Assim, existem diversas variáveis que podem determinar o procedimento preciso. Primeiro, a quantidade

10 de α -amilase envelopada deve ser um volume total suficiente para permitir que a α -amilase envelopada seja espalhada por toda a mistura de massa de farinha. Se a preparação de α -amilase envelopada é altamente concentrada, óleo adicional pode precisar ser adicionado à pré-mistura antes da α -amilase

15 envelopada ser adicionada à massa de farinha. Receitas e processos de produção podem requerer modificações específicas. Entretanto, bons resultados geralmente podem ser alcançados quando 25% do óleo especificado em uma fórmula de massa de farinha para pão é mantido fora da massa de farinha e é usado como um carreador para uma α -amilase envelopada concentrada quando adicionada próximo ao final do ciclo de mistura. Em pão ou

20 outros artigos assados, receitas que têm teor de gordura extremamente baixo (tais como pães estilos francêss), verificou-se que uma mistura de α -amilase envelopada de aproximadamente 1% do peso seco da farinha é suficiente para mesclar a α -amilase envelopada com a massa de farinha, porém a faixa de percentagens que pode funcionar é extremamente ampla e é dependente da fórmula, produto acabado e requerimentos de metodologia de produção do padeiro individual, em vez de quaisquer limitações conhecidas. Segundo, a suspensão de α -amilase envelopada deve ser adicionada à

25 mistura com tempo suficiente restando no ciclo de mistura para mistura completa à massa de farinha, porém não tão cedo de modo que ação mecânica excessiva irá privar o revestimento protetor de lipídio de uma grande

30 proporção das partículas de α -amilase envelopadas.

Em outra modalidade, α -amilase bacteriana (BAA) é adicionada às partículas de enzima revestidas de lipídio. BAA é conhecida por reduzir pão a uma massa pegajosa devido à sua termoestabilidade excessiva e atividade retida no naco de pão totalmetne assado. Entretanto, verificou-se que

5 quando BAA é incorporada ao produto de enzima protegida, proteção anti-envelhecimento adicional substancial é obtida, mesmo a níveis de dosagem de BAA muito baixos. Por exemplo, verificou-se que dosagens de BAA de 150 RAU (Unidades de Amilase de Referência) por 100 libras de farinha são eficazes. Em um aspecto, entre cerca de 50 a 2000 RAU de BAA são adicio-

10 nados ao produto de enzima revestido de lipídio. Este baixo nível de dosagem de BAA, combinado com a capacidade do revestimento protetor de manter a enzima no pão de forma totalmente assado de contato livre com os amidos, (exceto quando vapor d'água libera randomicamente a enzima de seu revestimento) ajuda a alcançar níveis muito altos de atividade antienv-

15 lhecimento sem os efeitos colaterais negativos de BAA.

Será aparente para aqueles versados na técnica que várias modificações e variações podem ser feitas às composições e métodos descritos aqui e adicionalmente exemplificados nos exemplos abaixo sem se afastar do espírito ou escopo do uso pretendido.

20 EXEMPLOS

Exemplo 1

Otimização de Códon de α -Amilase de *Bacillus* sp. no. 707

Um gene sintético da α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707, preLAT-Amy707, foi encomendado da GeneArt (Alemanha). O gene que codifica a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 (A. Tsukamoto et al., 1988 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151(1): 25-31) foi clonado o vetor de integração, pICatH (veja Figura 4), resultando no produto designado pICatH-Amy707(ori1) (veja Figura 5). pICatH contém as características a seguir: (1) uma origem de replicação sensível à temperatura (ori pE194, para replicação em *Bacillus*), (2) ori pBR322 (para amplificação em *E. coli*), (3) um gene de resistência a neomicina, e (4) um gene nativo de resistência a cloranfenicol de *B. licheniformis* (*cat*) para seleção, integração cromossômica e amplificação de

25

30

cassete. pICatH-Amy707(ori1) foi transformado na cepa hospedeira, BML780 (derivativa de BRA7, cat-, amyL-, spo-, aprL-, endoGluC-), a uma temperatura permissiva (37°C). Um transformante resistente à neomicina (neoR) e um resistente a cloranfenicol (capR) foram selecionados e designados BML780 (pICatH-Amy707(ori1)). O plasmídeo em BML780 (pICatH-707(ori)) foi integrado à região cat no genoma *B. licheniformis* cultivando as cepas a uma temperatura não permissiva (isto é, ~50°C) em meio TSB (caldo triptico de soja) com cloranfenicol. Um clone de resistência a cloranfenicol foi selecionado e designado BML780-pICatH-Amy707(ori1). A cepa selecionada foi cultivada novamente a uma temperatura permissiva para diversas gerações sem antibióticos para sequências de vetor loop-out, e então um clone sensível à neomicina (neoS e capR) foi selecionado.

Neste clone, sequências de vetor de pICatH no cromossomo foram extirpadas, incluindo o gene de resistência à neomicina, deixando apenas o cassete Amy707-cat. Note que o gene *cat* usado é um gene nativo de *B. licheniformis*, e que o gene Amy707 é a única peça heteróloga de DNA introduzida no hospedeiro.

A seguir, o cassete Amy707-cat no cromossomo foi amplificado cultivando a cepa no meio TSB com concentrações crescentes de cloranfenicol (isto é, 5, 25, 50 e 75 µg/mL de cloranfenicol). Depois de várias rodadas de amplificação, dois clones foram selecionados (resistente contra 75 µg/mL de cloranfenicol e produzindo o maior halo após manchamento com iodine quando cultivado sobre placas de ágar de infusão de coração contendo amido solúvel): clone 1 e clone 2 BML780-Amy707-CAP75. Ambas as cepas produzem maiores halos sobre placas de ágar de amido.

Exemplo 2

Purificação de α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707

Células transformadas com BML780-Amy707-CAP75 foram fermentadas usando técnicas conhecidas na técnica. As células foram separadas do caldo de fermentação, e o caldo foi concentrado usando uma escala prep Millipore TFF-6 10 K de peso molecular cortada (MWCO) cartucho de membrana UF (Millipore Corp., Bedford, MA; Cat. No. CDUF 006 TG) para

obter o UFC. Concentrado de ultrafiltração (UFC) contendo entre 1 e 2 g/L de α -amilase foi dialisado de um dia para o outro em tubos diálise 10 K (SpecraPor Cat. No. 132119) contra 20 L de cloreto de cálcio a 2 mM em tampão de acetato de sódio a 25 mM; pH 5,0. O dialisato foi filtrado e uma
5 metade do material foi aplicada a uma coluna de troca iônica (POROS HS 20 83 mL; Applied Biosystems, Califórnia); a coluna de troca iônica foi anteriormente equilibrada contra cloreto de cálcio a 1 mM em tampão de acetato de sódio a 25 mM, a pH 5,0. A coluna foi extensivamente lavada com o mesmo
10 tampão até que a absorbância (A) A280 nm fosse menos do que 0,1 unidade OD, e a atividade da enzima foi eluída com um gradiente de cloreto de sódio a 0 até 100 mM no mesmo tampão. Atividade de α -amilase eluída com a cloreto de sódio a 90 mM. As frações com atividade foram agrupadas com base na atividade enzimática como medida usando um kit de α -amilase Megazyme® (Cat. No. K-CERA; Megazyme). A amostra restante foi tratada de modo
15 similar e agrupada com a primeira. Sulfato de amônio foi adicionado a um terço deste agrupamento a 750 mM e aplicado a uma coluna Sefarose de fenila a 96 mL (Cat. No. 17-0973-10; GE Healthcare), que foi anteriormente equilibrada com sulfato de amônio a 750 mM, cloreto de cálcio a 2 mM em tampão MES a 50 mM (tampão de ácido 4-morfolinoetanossulfônico) ajusta-
20 do para pH 6,8. Após lavagem com o mesmo solvente, a proteína de α -amilase foi eluída usando um gradiente de sulfato de amônio a 750 mM até 0 mM. Atividade de enzima eluída no final deste gradiente. Frações com atividade de enzima foram agrupadas. As frações agrupadas restantes de troca de iônica foram purificadas de modo similar. Todos os agrupamentos Seph-
25 rose de fenila foram combinados e concentrados em uma célula Amicon agitada (Millipore) com uma membrana celulósica 10 K (Millipore). A concentrado foi dialisado usando tubos de diálise 10 K contra cloreto de cálcio a 5 mM contido em um tampão de maleato de hidrogênio a 50 mM (pH 6,8) por 16 horas. Esta amostra dialisada foi suplementada com sorbitol a 10% para au-
30 xiliar a solubilidade da enzima. Após filtragem estéril, a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 contendo amostra foi quantificada por densitometria de gel, que indicou uma quantidade de 2,8 mg/mL.

Exemplo 3

Caracterização de Desempenho

Testes de desempenho foram conduzidos em amostras de tingido manchadas com amido de milho com um corante indicador ligado ao amido (Test Fabrics Cat. No. CS-28; TestFabrics Inc.). O desempenho da lavagem foi julgado através da liberação do corante indicador na fase de solução. Antes dos ensaios, o tecido de teste tingido foi pré-lavado com água destilada por 1 hora e então seco a ar. A pré-lavagem dos tecidos de teste removeu qualquer corante indicador mal ligado antes do ensaio.

Discos de um quarto de polegada foram cortados do tecido pré-lavado e colocados nas placas de 96 poços. 190 μ L de detergente foram adicionados a cada poço (Detergente Base IEC-A*; Cat. No. 88010-1; WFK Testgewebe GmbH, Alemanha). A placa com as amostras de tecido e detergente foi pré-incubada a 40°C por 15 minutos. A reação foi iniciada com a adição de 0 a 3 ppm de α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 do Exemplo 2, ou 0 a 3 ppm de α -amilase de controle (OxAm (Purastar®) Genencor International, Inc.), que foram adicionados em um volume de 10 mL a cada poço. A placa foi então incubada por 10 minutos a aproximadamente 40°C a 750 rpm (Eppendorf Thermomix). Após incubação, 150 μ L de sobrenadante foram transferidos para uma nova placa e a absorbância do sobrenadante (que continha corante indicador liberado) foi determinada a A488 nm.

Por comparação, ensaios similares foram conduzidos usando Stainzyme® (Novozymes) e OxAm (Purastar®; Genencor International, Inc.), um derivado da α -amilase de *B. licheniformis* (producto da Genencor). 0 a 3,2 ppm (mg/L) foram usados no ensaio com as condições sendo as mesmas descritas acima.

Os dados para detergente padrão IEC "A" a pH 8,0 (condições de lavanderia) estão mostrados na Fig. 1. A absorbância foi plotada como uma função da concentração de α -amilase. O teste indicou que α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 tem um desempenho significamente melhor do que OxAm (Purastar®) e igual a Stainzyme® sob estas condições.

Usando o mesmo ensaio, a mesma quantidade de α -amilase do

Bacillus sp. no. 707 e quantidades de Stainzyme® e OxAm (Purastar®), o ensaio foi repetido com o pH ajustado para 10,1. Estas condições (isto é, pH aumentado) são reminiscentes daquelas em lavagem de louça automática. O desempenho da α -amilase do Bacillus sp. no. 707 foi novamente melhor do que OxAm (Purastar®) e foi surpreendentemente melhor do que Stainzyme® a pH 10,1. Veja Figura 2.

Exemplo 4

Ensaio de Detergente com Terg-o-tometer

Materiais e Métodos.

10 Amostras de tecido usadas:

CFT cacau em algodão, STC CFT CS-2 (TestFabrics)

CFT ovo inteiro com pigmento em algodão, STC CFT CS-37 (TestFabrics)

15 CFT amido de milho colorido em algodão, STC CFT CS-28 (TestFabrics)

2X algodão branco alvejado por cada operação

Lastro extra foi usado para fazer a carga regular de 40 g/L

Em 1L de Terg-o-tometer

Hepes a 5 mM pH 8,0, 1,5 g/L

20 AATCC HDL WOB (2003)

1,8 g/L de Tide com alvejante alternativo (inativo)

102,6 mg/l (6 gpg de dureza de água), Temperatura a 74 °F ou 23,3°C

Tratamentos: 1). AATCC; 2). AATCC + 0,1 ppm de α -amilase 707; 3). AATCC + 0,1 ppm de Stainzyme®; 4). Tide; 5). Tide inativo; 6). Tide inativo + 0,1 ppm de α -amilase 707; 7). Tide inativo + 0,1 ppm de Stainzyme®; 8). Tide inativo + 0,1 ppm de α -amilase 707 + 0,5 ppm de Prime Purafect®; Tide inativo + 0,1 ppm de Stainzyme® + 0,5 ppm de Prime Purafect® (Genencor). AATCC estava presente na quantidade de 1,5 g/L e o Tide inativo estava presente na quantidade de 1,8 g/L.

Resultados. Nenhuma diferença no desempenho da limpeza foi observado entre os tratamentos de controle e de enzima para as manchas

de cacau e ovo, o que sugeriu saturação da limpeza para ambas as manchas, como ilustrado na Fig. 6. O Tide ativo produziu resultados comparáveis ao Tide inativo a 0,1 ppm usando a α -amilase 707. A α -amilase 707 teve desempenho inferior ao Stainzyme®. A adição do Prime Purafect® não alterou o desempenho de limpeza de Stainzyme® ou 707 α -amylase (Figura 6).

Exemplo 5

A-Amilase com Teste de Launder-o-meter

Materiais e Métodos.

Amostras de tecido usadas:

- 10 CFT cacau em algodão, STC CFT CS-2
- CFT ovo inteiro com pigmento em algodão, STS CFT CS-37
- Amido colorido em algodão, EMPA 161
- CFT amido de milho colorido em algodão, STC CFT CS-26
- CCFT amido de arroz colorido em algodão, STC CFT CS-28

15 Adições a Potes:

2X algodão branco alvejado foi adicionado a cada pote. Lastro extra foi adicionado a cada pote para fazer a carga regular de 42 g/200 mL (interlock de algodão alvejado). Água teve 205,2 mg/l (12 gpg) de dureza de água. O ensaio foi realizado a 40°C por 40 minutos.

- 20 Tratamentos: 8 g/L IEC A* com alvejante. Estas composições detergentes foram executadas com detergente apenas, na presença de detergente mais 0,2 ppm de α -amilase 707 (4 mg/mL) ou detergente mais 0,2 ppm de Stainzyme®. A limpeza foi medida usando um reflectômetro Minolta com um orifício de 50 mm antes e após a lavagem.

- 25 Resultados. Os ensaios demonstraram que não houve diferença significativa do desempenho na lavagem das amostras de tecido de cacau e ovo inteiro entre os tratamentos de controle e de enzima (Figura 7). O IEC A* com controle de alvejante demonstrou que a α -amilase do Bacillus sp. no. 707 teve melhor desempenho do que Stainzyme®.

30 Exemplo 6

Detergente para Louça

Materiais e Métodos. A α -amilase do Bacillus sp. no. 707 foi tes-

tada ao lado de Stainzyme® e OxAm (Purastar®) em lavadoras automáticas de louça em manchas de leite de arroz. Como indicado na Figura 8, o detergente era WfK C (ADD padrão contendo fosfato) e alvejante (WFK Testgewebe GmbH, Alemanha); o alvejante usado era perborato. Stainzyme® foi usado a uma concentração de mg/g de igualdade de enzima ativa. O *Bacillus* sp. no 707 foi usado a uma concentração de 4 mg/g. OxAm (Purastar®) teve uma concentração em que 3,2 mg = dosagem de 0,6 % p/p. Os pratos de porcelana foram sujos com amido misturado de IKV e leite de arroz (Genencor International, Inc.). As manchas de leite-arroz foram assadas nos pratos de porcelana a 140°C. Os pratos sujos foram lavados em lavadoras de louça Miele a 50°C a uma dureza de água de 21 °GH. Os resultados do ensaio de leite de arroz estão mostrados na Figura 8. Os resultados do ensaio de amido misturado estão ilustrados na Figura 9. As composições de detergentes também tinham properase a 0,8% 4000D adicionados. As alfa-amilases foram adicionadas em uma dosagem de enzima de 0,4; 0,8; 1,6 e 3,0 mg de enzima ativa total nas condições de lavagem de louça automática.

Resultados. A α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 atingiu o desempenho de Stainzyme® em testes lavadora automática de escala total (ADW) e tem pelo menos a atividade de Stainzyme® dentro de erro experimental. A α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 teve um desempenho mais alto do que OxAm (Purastar®) nas condições de lavagem de louça automática.

Exemplo 7

α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 e variantes

A variante de códon otimizado descrita nos Exemplos 1 – 2 acima podem ser ainda recombinantemente modificadas para incluir qualquer das variantes ensinadas nas Patentes US Nos. 6,093,562; 6,187,576; 6,197,565; 6,204,232; 6,297,038; 6,309,871; 6,486,113; 6,528,298; 6,623,948; 6,673,589; 6,867,031 e 6,887,986; Pedidos de Patente US Publicados Nos. 20040096952; 20040253676; 20050059131; 20050084937; 20050196853; 2005025664 e 20060035323; Pedidos de Patentes Europeus Nos. EP 1423513 e EP 1538155; Pedidos de Patente Internacionais PCT Nos. WO 01/64852; WO 0166712; WO 01/88107; WO 01/96537; WO

02/092797 e WO 02/10355; e Pedidos de Patente Japoneses Nos. JP2001520006; JP2001521739; JP2002530072 e JP2004505606.

Exemplo 8

Variante de α -Amilase M202L

5 A variante M202L foi criada através da substituição de uma leucina pela metionina na posição 202 da sequência de α -amilase usando métodos padrão. Variantes adicionais podem incluir substituições de diferentes aminoácidos em M208 e M261 e combinações de uma ou mais substituições nestes 3 sítios. Purificação de qualquer das variantes pode ser preparada
10 conforme descrito acima.

Exemplo 9

Capacidade de Limpeza de Variantes Amy707

Materiais e Métodos. Amostras de tecido manchadas com amido de milho CS-28, como discutido acima, foram incubadas com ou sem alvejante a 20°C na presença da enzima α -amilase indicada. Condições padrão
15 de IEC "A" foram usadas para o ensaio. Variantes foram preparadas através de métodos padrão conhecidos para aqueles versados na técnica e foram usadas sem purificação a partir do sobrenadante da cultura. A concentração de variantes foi determinada através de densitometria de géis SDS PAGE. O
20 detergente para este experimento foi IEC "A" usado a 8 g/L. Quando presente, o alvejante foi fornecido pelo perborato de sódio de sistema de ativação de alvejante (13,7 mM) e TAED (1,85 mM).

Resultados. A variante M202L do *Bacillus* sp. no 707 teve atividade superior na presença de alvejante, se comparada a soluções sem alvejante. A variante M202L teve atividade aumentada na presença de alvejante,
25 se comparada a resultados obtidos com a α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 do tipo selvagem. Veja Figura 10. Na ausência de alvejante, a variante M202L foi menos ativa do que a composição compreendendo a forma do tipo selvagem.

30 Todas as referências citadas aqui são incorporadas por referência em sua totalidade para todos os fins.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para lavagem de louça manual ou automática, que compreende uma amilase de *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma, e um ou mais de um tensoativo, builder detergente, um agente complexante, um polímero, um alvejante, CaCl_2 , um sistema alvejante, um estabilizante, um intensificador de espuma, um supressor de espuma de sabão, um agente anticorrosão, um agente de suspensão de sujeira, um agente de redeposição antissujeira, um corante, um bactericida, um hidrótopo, um inibidor de mancha e um perfume.
2. Método de limpar louças, que compreende administrar a composição lavagem de louça manual ou automática como definido na reivindicação 1.
3. Aditivo para detergente de lavanderia, que compreende uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variantes da mesma.
4. Detergente para lavanderia, que compreende o aditivo de lavanderia como definido na reivindicação 3, e ainda compreende um ou mais do seguinte e um ou mais de um tensoativo, builder detergente, um agente complexante, um polímero, um sistema alvejante, um alvejante, CaCl_2 , um estabilizante, um intensificador de espuma, um supressor de espuma de sabão, um agente anticorrosão, um agente de suspensão de sujeira, um agente de redeposição antissujeira, um corante, um bactericida, um hidrótopo, um brilhantador ótico, um condicionador de tecido e um perfume.
5. Detergente para lavanderia de acordo com a reivindicação 4, em que o CaCl_2 está presente no detergente em uma quantidade de cerca de 0,1 mM a cerca de 20 mM.
6. Ácido nucleico isolado, que codifica uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou uma variante da mesma, em que a variante tem uma substituição ou eliminação de resíduo selecionada a partir do grupo que consiste em substituições de M202, M208, S255, R172 e/ou M261 de SEQ ID NO: 3.
7. Ácido nucleico isolado, como definido na reivindicação 5, em que a variante M202 é uma variante de substituição selecionada a partir do grupo que consiste em: M202L, M202V, M202S, M202T, M202I, M202Q e

M202W; em que a substituição S255 é S255N; e em que a substituição R172 é R172Q.

8. α -Amilase compreendendo SEQ ID NO: 3 ou uma variante da mesma, em que a dita variante compreende uma substituição ou eliminação
5 de resíduo no resíduo M202, M208 e/ou M261 de SEQ ID NO: 3.

9. α -Amilase de acordo com a reivindicação 8, em que a variante é:

(a) uma variante M202 selecionada a partir do grupo que consiste em M202L, M202V, M202S, M202T, M202I, M202Q e M202W;

10 (b) uma variante S255 de S255N; e/ou

(c) uma variante R172 de R172Q.

10. Vetor que compreende o ácido nucleico como definido na reivindicação 6.

11. Célula hospedeira isolada que compreende o ácido nucleico
15 como definido na reivindicação 6.

12. Célula hospedeira isolada que compreende o vetor como definido na reivindicação 10.

13. Célula hospedeira isolada de acordo com qualquer das reivindicações 11 ou 12, em que a célula é um micro-organismo.

20 14. Célula hospedeira isolada de acordo com a reivindicação 13, em que o micro-organismo é uma bactéria ou um fungo.

15. Célula hospedeira isolada de acordo com a reivindicação 14, em que a bactéria é uma bactéria Gram positiva selecionada a partir do grupo que consiste em *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. thuringiensis*, *Streptomyces lividans*, ou *S. murinus*; ou uma bactéria Gram negativa, em que a dita bactéria Gram negativa é
25 uma espécie de *Escherichia coli* ou *Pseudomonas*.

30 16. Uso de um polipeptídeo como definido na reivindicação 8, para lavagem de lavanderia e/ou lavagem de louça.

17. Uso de uma α -amilase ou variante da mesma como definida na reivindicação 8, para lavagem de lavanderia e/ou lavagem de louça.

18. Aditivo para detergente que compreende uma α -amilase ou uma variante da mesma como definido na reivindicação 8, opcionalmente na forma de um granulado não dispersivo, microgranulado, líquido estabilizado ou enzima protegida.

5 19. Aditivo para detergente de acordo com a reivindicação 18, em que o aditivo para detergente também compreende uma enzima selecionada a partir do grupo que consiste em: uma celulase, uma protease, uma aminopeptidase, uma amilase, uma carbo-hidrase, uma carboxipeptidase, uma catalase, uma quitinase, uma cutinase, uma ciclodextrina glicotransfe-
10 rase, uma desoxirribonuclease, uma esterase, uma α -galactosidase, uma β -galactosidase, uma glicoamilase, α -glicosidade, uma β -glicosidase, uma haloperoxidase, uma invertase, uma lacase, uma lipase, uma manosidase, uma oxidase, uma enzima pectinolítica, uma peptidoglutaminase, uma peroxidase, uma fitase, uma polifenoloxidase, uma enzima proteolítica, uma ribonu-
15 clease, uma transglutaminase, uma xilanase, uma pululanase, uma isoamilase, uma carragenase ou qualquer combinação das mesmas.

20 20. Aditivo para detergente de acordo com a reivindicação 19, em que a amilase é outra α -amilase, uma β -amilase, uma isoamilase ou uma glicoamilase.

20 21. Composição detergente que compreende uma α -amilase ou variante da mesma como definida na reivindicação 6.

22. Composição detergente que compreende o aditivo para detergente como definido na reivindicação 18.

25 23. Composição detergente de acordo com a reivindicação 21, que também compreende uma enzima do grupo que consiste em: uma celulase, uma protease, uma aminopeptidase, uma amilase, uma carbo-hidrase, uma carboxipeptidase, uma catalase, uma quitinase, uma cutinase, uma ciclodextrina glicotransferase, uma desoxirribonuclease, uma esterase, uma α -galactosidase, uma β -galactosidase, uma glicoamilase, uma α -glicosidase, a
30 β -glicosidase, uma haloperoxidase, uma invertase, uma lacase, uma lipase, uma manosidase, uma oxidase, uma enzima pectinolítica, uma peptidoglutaminase, uma peroxidase, uma fitase, uma polifenoloxidase, uma enzima

proteolítica, uma ribonuclease, uma transglutaminase, uma xilanase, uma pululanase, uma isoamilase, uma carragenase ou qualquer combinação das mesmas.

5 24. Composição detergente para lavagem de louça manual ou automática que compreende um polipeptídeo de uma α -amilase ou variante da mesma como definida na reivindicação 8.

25. Composição detergente para lavagem de louça manual ou automática de acordo com a reivindicação 24, que também compreende uma enzima selecionada a partir do grupo que consiste em: uma celulase,
10 uma protease, uma aminopeptidase, uma amilase, uma carbo-hidrase, uma carboxipeptidase, uma catalase, uma quitinase, uma cutinase, uma ciclodextrina glicosiltransferase, uma desoxirribonuclease, uma esterase, uma α -galactosidase, uma β -galactosidase, uma glicoamilase, uma α -glicosidase, a β -glicosidase, uma haloperoxidase, uma invertase, uma lacase, uma lipase,
15 uma manosidase, uma oxidase, uma enzima pectinolítica, uma peptidoglutaminase, uma peroxidase, uma fitase, uma polifenoloxidase, uma enzima proteolítica, uma ribonuclease, uma transglutaminase, uma xilanase, uma pululanase, uma isoamilase, uma carragenase ou qualquer combinação das mesmas.

20 26. Composição detergente para lavagem de louça manual ou automática de acordo com qualquer das reivindicações 24 ou 22, que também compreende um ou mais de um tensoativo, builder detergente, um agente complexante, um polímero, um alvejante, CaCl_2 , um sistema alvejante, um estabilizante, um intensificador de espuma, um supressor de espuma de
25 sabão, um agente anticrossão, um agente de suspensão de sujeira, um agente de redeposição antissujeira, um corante, um bactericida, um hidrótopo, um inibidor de mancha e um perfume.

27. Composição detergente para lavagem de louça manual ou automática de acordo com a reivindicação 26, em que o CaCl_2 está presente
30 no detergente em uma quantidade de cerca de 0,1 mM a cerca de 20 mM.

28. Aditivo para detergente que compreende a α -amilase ou variante da mesma como definida na reivindicação 8.

29. Composição para lavagem de lavanderia manual ou automática que compreende o aditivo detergente como definido na reivindicação 28.

30. Composição para lavagem de lavanderia manual ou automática de acordo com a reivindicação 29, que também compreende uma enzima selecionada a partir do grupo que consiste em: uma celulase, uma protease, uma aminopeptidase, uma amilase, uma carbo-hidrase, uma carboxipeptidase, uma catalase, uma quitinase, uma cutinase, uma ciclodextrina glicosyltransferase, uma desoxirribonuclease, uma esterase, uma α -galactosidase, uma β -galactosidase, uma glicoamilase, uma α -glicosidase, a β -glicosidase, uma haloperoxidase, uma invertase, uma lacase, uma lipase, uma manosidase, uma oxidase, uma enzima pectinolítica, uma peptidoglutaminase, uma peroxidase, uma fitase, uma polifenoloxidase, uma enzima proteolítica, uma ribonuclease, uma transglutaminase, uma xilanase, uma pululanase, uma isoamilase, uma carragenase ou qualquer combinação das mesmas.

31. Composição para lavagem de lavanderia manual ou automática de acordo com qualquer das reivindicações 29 ou 30, que também compreende um ou mais do seguinte e um ou mais de um tensoativo, builder detergente, um agente complexante, um polímero, um sistema alvejante, um alvejante, CaCl_2 , um estabilizante, um intensificador de espuma, um supressor de espuma de sabão, um agente anticorrosão, um agente de suspensão de sujeira, um agente de redeposição antissujeira, um corante, um bactericida, um hidrótopo, um abrilhantador ótico, um condicionador de tecido e um perfume.

32. Composição para lavagem de lavanderia manual ou automática de acordo com a reivindicação 31, em que CaCl_2 está presente na dita composição em uma quantidade de cerca de 0,1 mM a cerca de 20 mM.

33. Composição para lavagem de lavanderia manual ou automática que compreende a α -amilase ou variante da mesma como definida na reivindicação 8.

34. Composição para lavagem de lavanderia manual ou automática de acordo com a reivindicação 33, que também compreende uma enzi-

ma selecionada a partir do grupo que consiste em: uma celulase, uma protease, uma aminopeptidase, uma amilase, uma carbo-hidrase, uma carboxipeptidase, uma catalase, uma quitinase, uma cutinase, uma ciclodextrina glicosiltransferase, uma desoxirribonuclease, uma esterase, uma α -galactosidase, uma β -galactosidase, uma glicoamilase, uma α -glicosidase, a β -glicosidase, uma haloperoxidase, uma invertase, uma lacase, uma lipase, uma manosidase, uma oxidase, uma enzima pectinolítica, uma peptidoglutaminase, uma peroxidase, uma fitase, uma polifenoloxidase, uma enzima proteolítica, uma ribonuclease, uma transglutaminase, uma xilanase, uma pululanase, uma isoamilase, uma carragenase ou qualquer combinação das mesmas.

35. Composição para lavagem de lavanderia manual ou automática de acordo com qualquer das reivindicações 33 e 34, que também compreende um ou mais do seguinte e um ou mais de um tensoativo, builder detergente, um agente complexante, um polímero, um sistema alvejante, um alvejante, CaCl_2 , um estabilizante, um intensificador de espuma, um supressor de espuma de sabão, um agente anticrossão, um agente de suspensão de sujeira, um agente de redeposição antissujeira, um corante, um bactericida, um hidrótopo, um abrillantador ótico, um condicionador de tecido e um perfume.

36. Uso de uma α -amilase ou variante da mesma como definida na reivindicação 8 para desengomagem de têxtil.

37. Composição para desengomagem de têxtil que compreende uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma, como definida na reivindicação 8, em uma solução aquosa, e que opcionalmente compreende uma enzima.

38. Composição para desengomagem de têxtil de acordo com a reivindicação 37, em que a variante é:

- (a) uma variante M202 selecionada a partir do grupo que consiste em M202L, M202V, M202S, M202T, M202I, M202Q e M202W;
- (b) uma variante S255 de S255N; e/ou
- (c) uma variante R172 de R172Q.

39. Método de desengomagem de um têxtil que compreende administrar a composição para desengomagem como definida em qualquer das reivindicações 37 ou 38, por um tempo suficiente para desengomar o dito têxtil.

5 40. Composição para processamento de amido que compreende uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma como definida na reivindicação 8, em uma solução aquosa.

41. Composição para processamento de amido de acordo com a reivindicação 40, em que a variante é:

10 (a) uma variante M202 selecionada a partir do grupo que consiste em M202L, M202V, M202S, M202T, M202I, M202Q e M202W;

(b) uma variante S255 de S255N; e/ou

(c) uma variante R172 de R172Q.

15 42. Composição para processamento de amido de acordo com a reivindicação 40, que também compreende uma glicoamilase, uma isoamilase, uma pululanase, fitase ou uma combinação das mesmas.

43. Método de processamento de um amido que compreende administrar a composição como definido em qualquer das reivindicações 40 a 42 por um tempo suficiente para processar o dito amido.

20 44. Composição para hidrólise de biofilme que compreende uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma como definida na reivindicação 8 em uma solução ou gel, e que opcionalmente também compreende uma celulase, uma hemicelulase, uma xilanase, uma lipase, uma protease, uma pectinase, um agente antimicrobiano ou qualquer combinação dos mesmos.

25 45. Composição para hidrólise de biofilme de acordo com a reivindicação 44, em que a variante é:

(a) uma variante M202 selecionada a partir do grupo que consiste em M202L, M202V, M202S, M202T, M202I, M202Q e M202W;

30 (b) uma variante S255 de S255N; e/ou

(c) uma variante R172 de R172Q.

46. Método de hidrólise de biofilme que compreende administrar

a composição como definido em qualquer das reivindicações 44 ou 45 por um período suficiente para processar o dito biofilme.

5 47. Composição para sacarificação de amido que compreende uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma como definida na reivindicação 8, em uma solução.

48. Composição de acordo com a reivindicação 47, em que a variante é:

(a) uma variante M202 selecionada a partir do grupo que consiste em M202L, M202V, M202S, M202T, M202I, M202Q e M202W;

10 (b) uma variante S255 de S255N; e/ou

(c) uma variante R172 de R172Q.

49. Método de sacarificação de amido que compreende administrar a composição como definido em qualquer das reivindicações 47 ou 48, por um período suficiente para sacarificar o dito amido.

15 50. Composição para liquefação de amido que compreende uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma como definida na reivindicação 8, em uma solução.

51. Composição de acordo com a reivindicação 50, em que a variante é:

20 (a) uma variante M202 selecionada a partir do grupo que consiste em M202L, M202V, M202S, M202T, M202I, M202Q e M202W;

(b) uma variante S255 de S255N; e/ou

(c) uma variante R172 de R172Q.

25 52. Método de liquefação de um amido que compreende administrar a composição como definido em qualquer das reivindicações 50 ou 51, por um período suficiente para liquefazer o dito amido.

53. Composição para assar que compreende uma α -amilase do *Bacillus* sp. no. 707 ou variante da mesma como definida na reivindicação 8, em uma solução ou um gel.

30 54. Composição para assar de acordo com a reivindicação 53, em que a variante é:

(a) uma variante M202 selecionada a partir do grupo que consis-

te em M202L, M202V, M202S, M202T, M202I, M202Q e M202W;

(b) uma variante S255 de S255N; e/ou

(c) uma variante R172 de R172Q.

5 55. Método para assar que compreende administrar a composição para assar como definido em qualquer das reivindicações 53 ou 54.

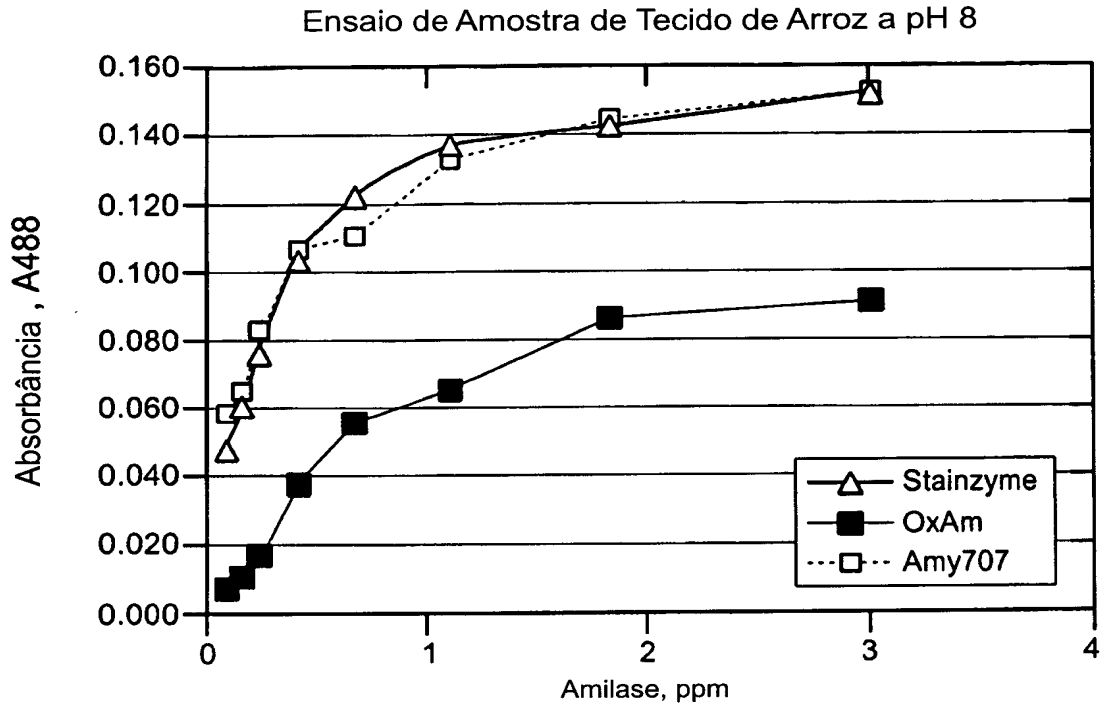


FIG. 1

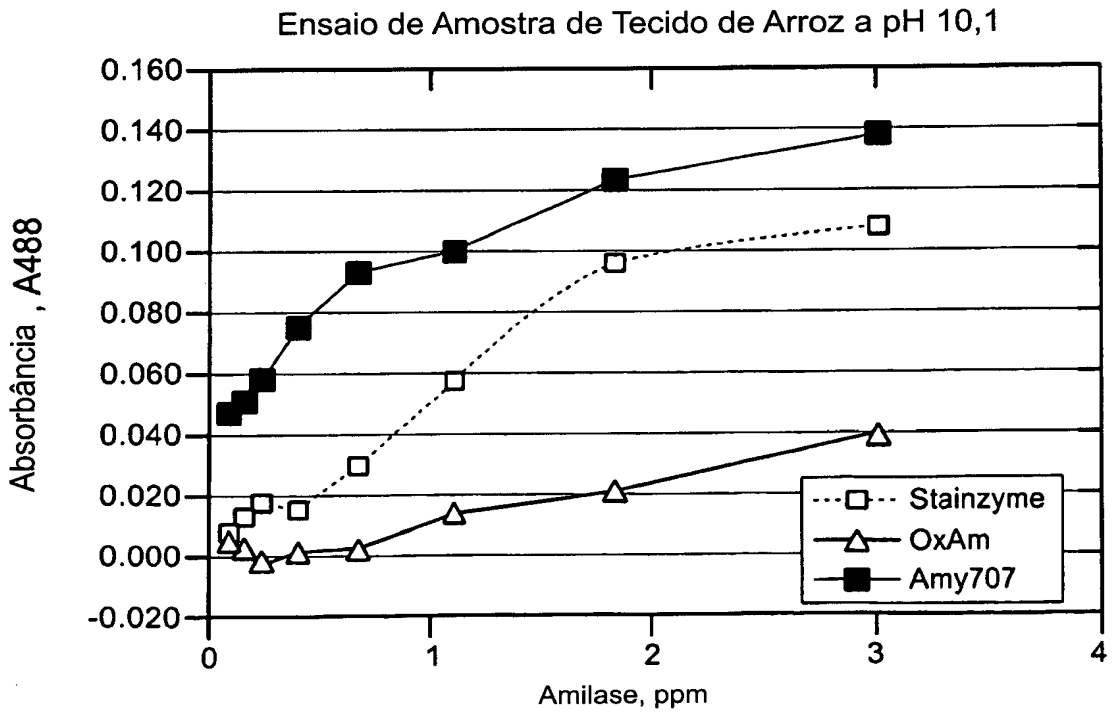


FIG. 2

Sequência de DNA que codifica Peptídeo de Sinal Pré-LAT (SEQ ID NO: 1):

5' -atgaaacaac aaaaacggct ttacgccoga ttgctgacgc tgmtatttgc 50
gctcatcttc ttgctgcctc attctgcagc ttcagca-3' 87

FIG. 3A

Gene nativo da α -amilase do *Bacillus* Sp. No. 707 (SEQ ID NO: 2):

5' -catcataacg gtacgaacgg gacaatgatg caatactttg aatggatatct 50
acctaattgac ggaaatcatt ggaatcgatt aaactctgat gcgagtaacc 100
ttaaagcaa agggattaca gcgggtgtgga ttcctccagc atggaagggc 150
gcttctcaaa atgacgtagg atacggagcc tatgacctgt atgatctggg 200
agaatttaat caaaaaggta ccgtccgtac aaaatatgga acacgtagtc 250
agttacaagc tgcggtaacc tccttaaaaa ataattggaat tcaagtatat 300
ggtgacgctt ttatgaatca caaagggtggc gcagacgcta ctgaaatggg 350
aagggccggt gaagtgaatc ccaataaccg taaccaagaa gtgactgggtg 400
aatataccat tgaagcttgg actagatttg attttccagg gcgaggaaat 450
actcatteta gctttaaatt gagatgggat cattttgatg gtgtggattg 500
ggatcagtcg cgtagactga acaatcgcg ctataaattt agaggtcag 550
gcaaagcttg ggattgggaa gttgatacgg aaaatggtaa ttatgattat 600
ttaatgtacg ctgatattga tatggatcac ccagaagtag taaatgaatt 650
aagaaattgg ggtgtttggg acacaaacac attaggactc gatggattta 700
gaatagatgc ggtaaacat ataaagtata gctttacgcg cgattggatt 750
aatcacgta gaagtgaac aggtaaaaat atgtttgagg ttgctgagtt 800
ttggaagaat gatttaggtg caattgaaa ctatctgcag aaaacaaact 850
ggaaccatc agtctttgat gtgccgttac attataatct ttataatgca 900
tcaaaaagcg gaggaacta tgatatgcga aacatattta atggaacggt 950
tgttcaacga catccaagtc atgctgtaac atttgttgat aatcatgatt 1000
cgcagcctga agaagcatta gaatcttttg ttgaagaatg gtttaacca 1050
ttagcgtatg cgcttacatt aacgcgtgaa caaggatacc cttctgtatt 1100
ttacggagat tattatggga ttccaacaca tggagtgcca gcaatgagat 1150
caaaaatcga tccgatttta gaagcacgtc aaaagtatgc atacggaaaa 1200
caaatgatt acttagacca tcataatata attggttggg cgcgtaagg 1250
gaatacagca cacccaatt caggcttagc taccatcatg tctgatggag 1300
cgggtggaag taagtggatg tttggtggg gtaataaggc tggtaagta 1350
tgagtgata ttacaggaaa ccgtacaggt acggttaca tcaatgcaga 1400
cgggtggggc aatttctctg tgaatggagg gtcagtttct atttgggtca 1450
acaaa-3' 1455

FIG. 3B

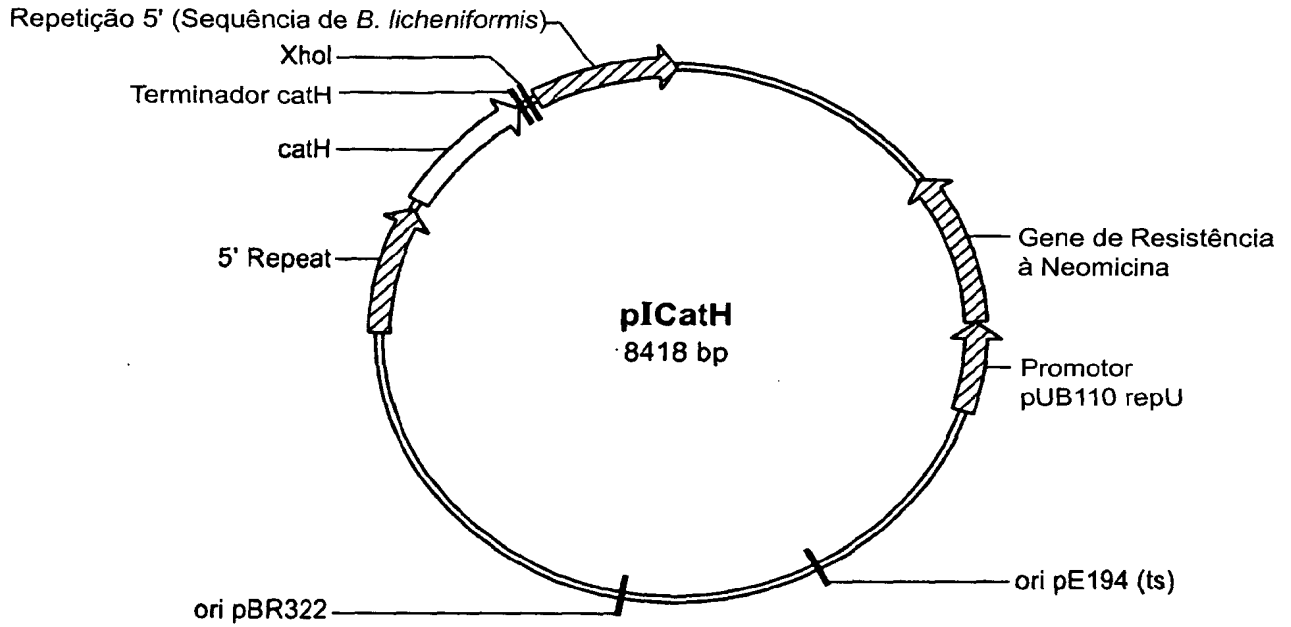


FIG. 4

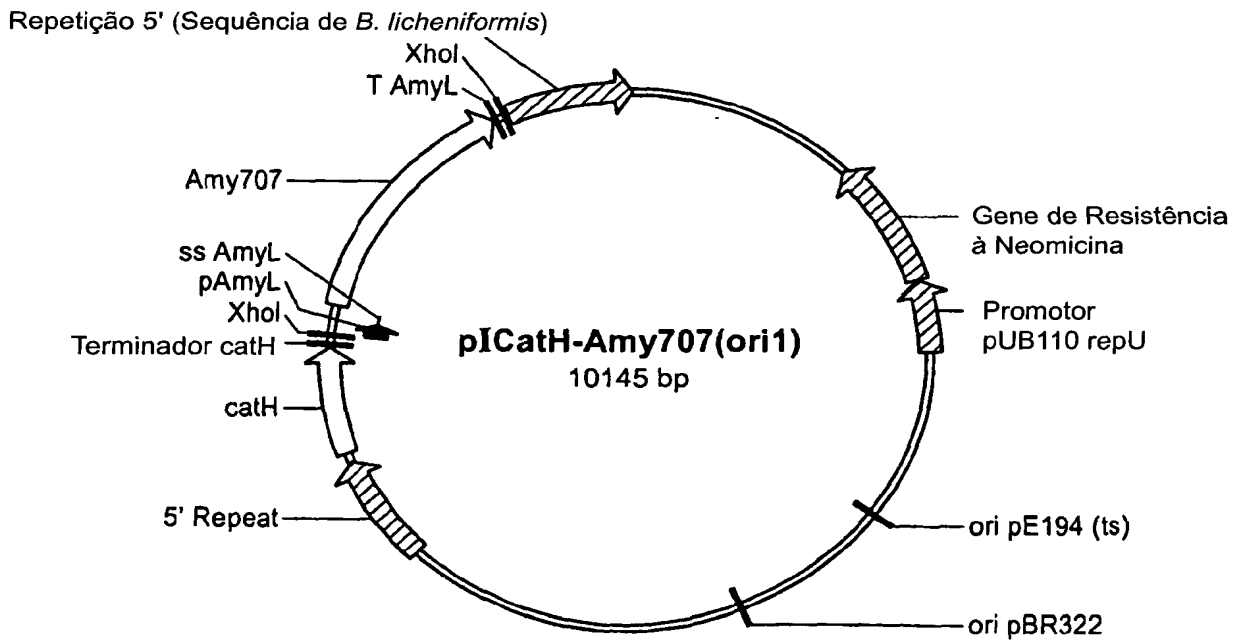


FIG. 5

Terg: Hapes a 5mM, 1,5 g/L de AATCC, 1,8 g/L de Tide Inativo, 102,6 mg/l (6 gpg) de Dureza de Água, 23 °C (74F), pH 7,5

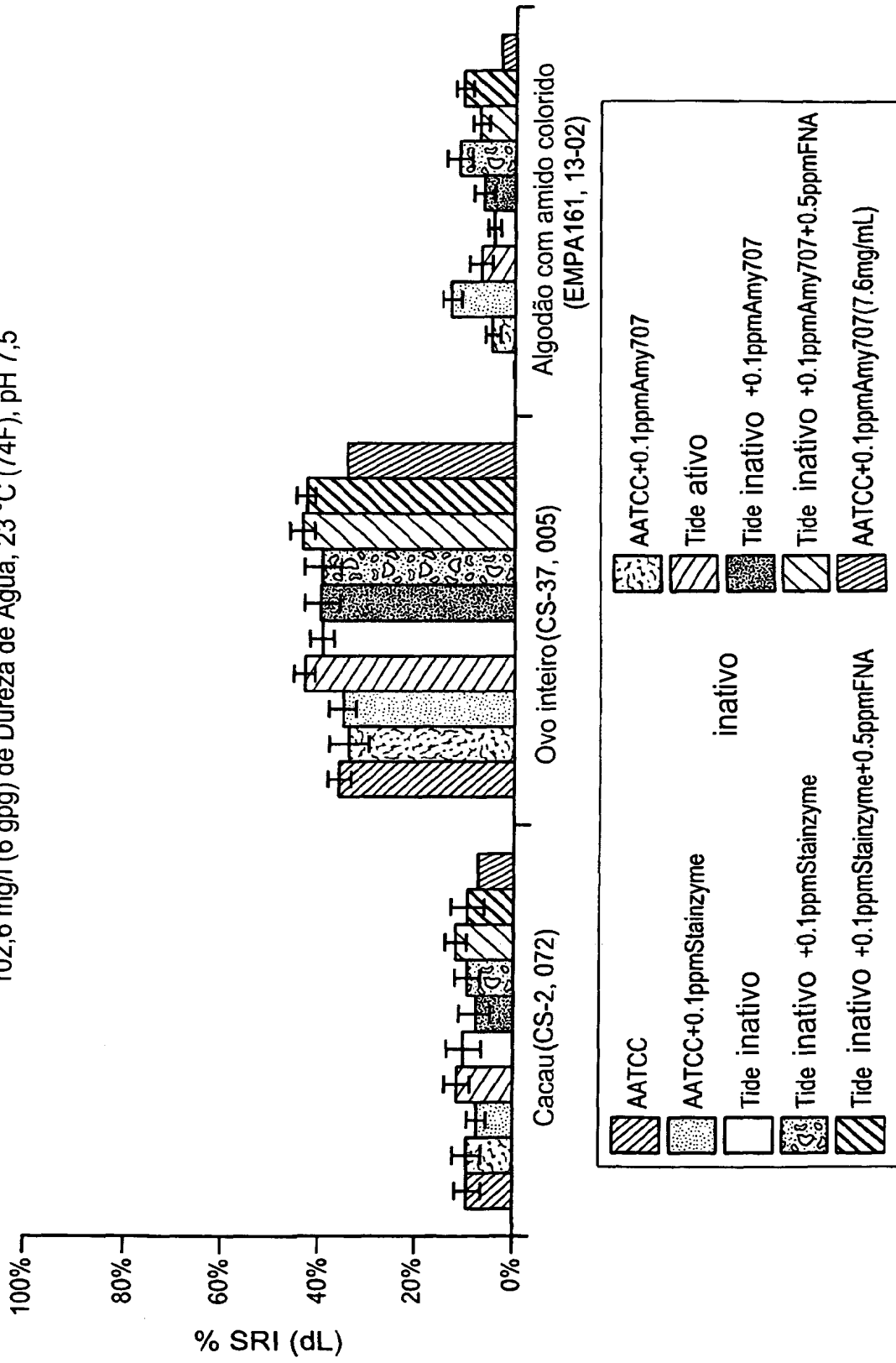


FIG. 6

LoM: 8g/L de IEC A* p/Alvejante, 205,2 mg/l (12 gpg) de Dureza de Água, 4 °C (40F)

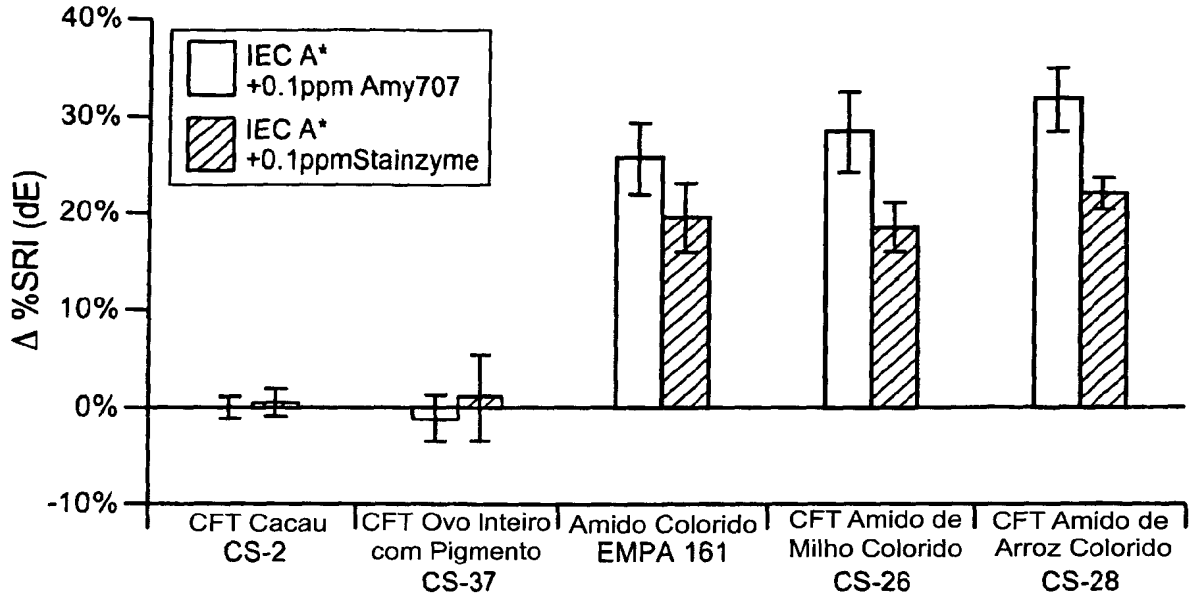


FIG. 7

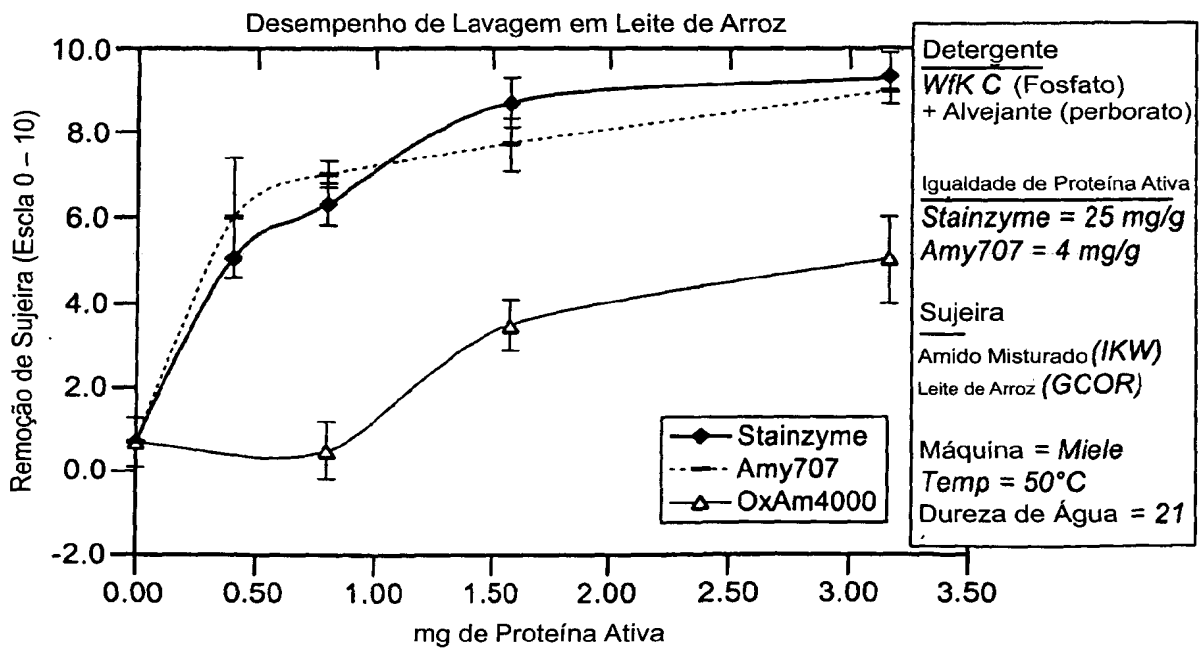


FIG. 8

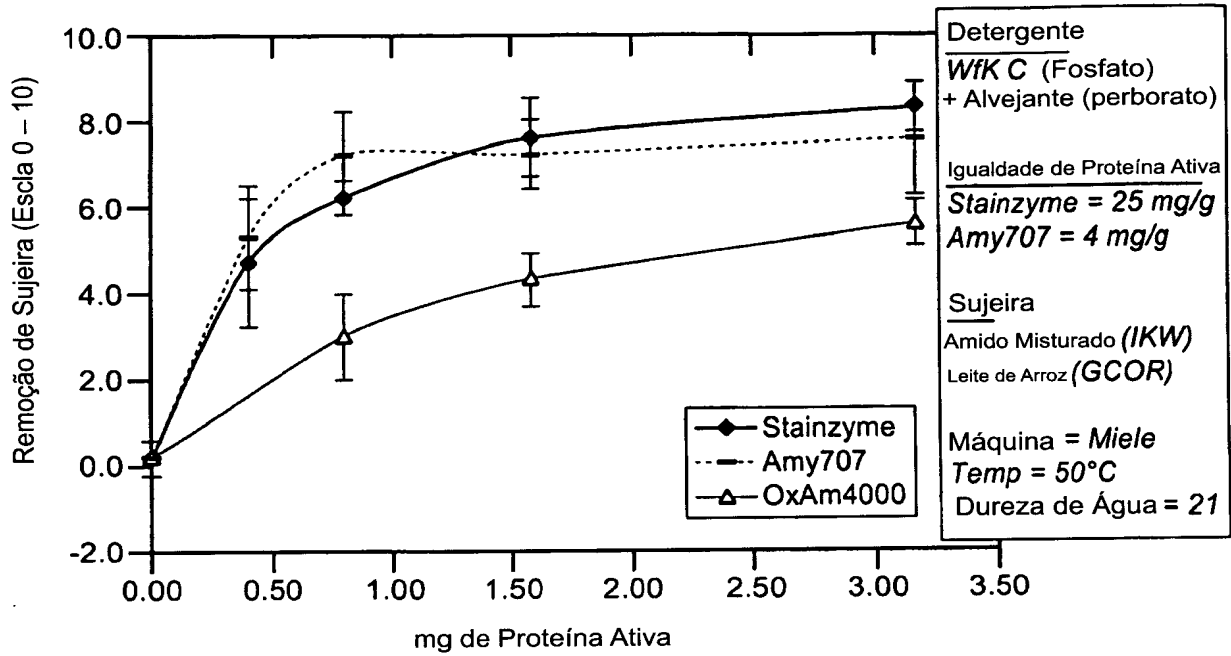


FIG. 9

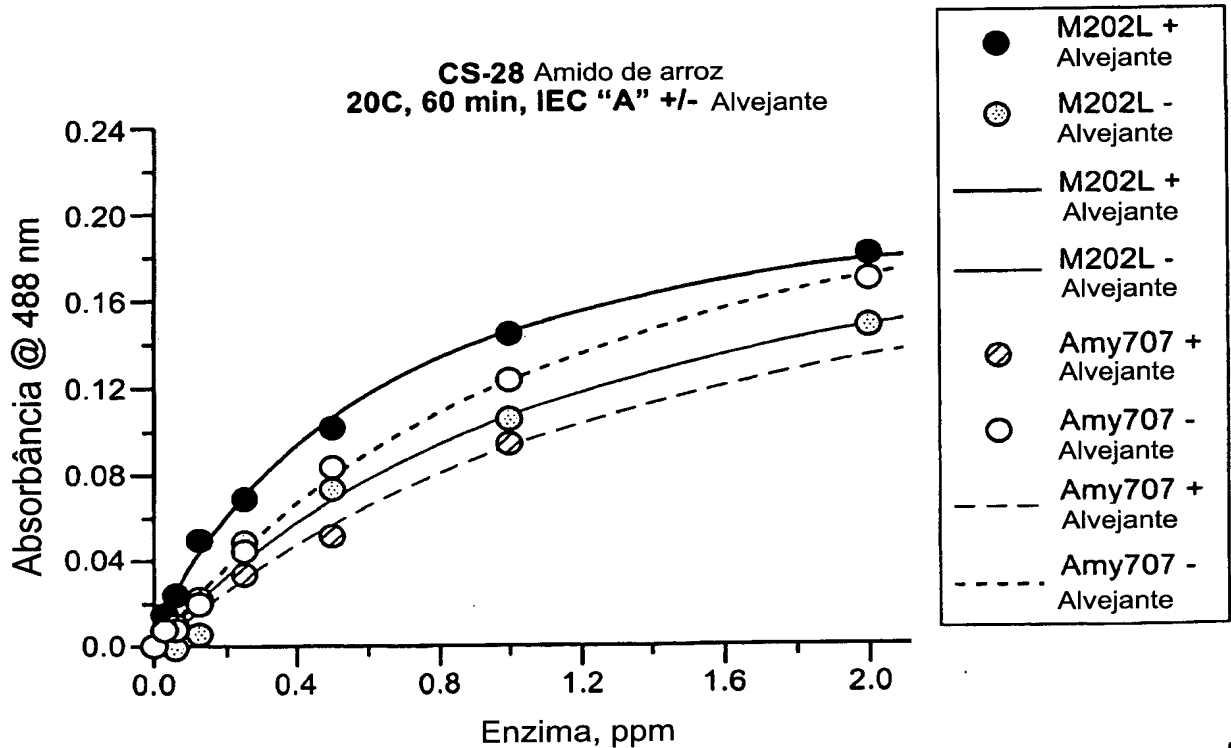


FIG. 10

RESUMO

Patente de Invenção: "**VARIANTES DE ALFA-AMILASE DE ESPÉCIES DE *BACILLUS* ALCALIFÍLICO, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO VARIANTES DE ALFA-AMILASE E MÉTODOS DE USO**".

5 A presente invenção refere-se a variantes da α -amilase derivadas de *Bacillus* sp. no. 707, composições compreendendo as ditas variantes, composições compreendendo as variantes e métodos de uso das variantes. Os métodos de uso incluem métodos de limpeza de superfícies, lavagem de têxteis, desengomagem, hidrólise de biofilmes de vários substratos e tratamento de amido (por exemplo, liquefação e sacarificação).

10