República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019018149-0 A2

BR112019018149A2

(22) Data do Depósito: 01/03/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 07/04/2020

(54) Título: COMPOSIÇÕES DETERGENTES QUE COMPREENDEM MANANASES BACTERIANAS

(51) Int. Cl.: C11D 3/386.

(30) Prioridade Unionista: 05/04/2017 EP 17164901.5.

(71) Depositante(es): AB ENZYMES GMBH.

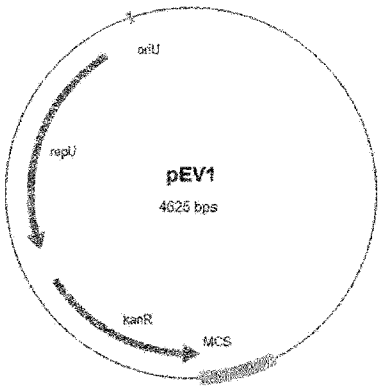
(72) Inventor(es): DANIELA HERBST; SUSANNE WIELAND; NINA MUSSMANN; TAIJA LEINONEN; LEENA VALTAKARI; MICHAEL RACHINGER; KARI JUNTUNEN; DANIELA DOLLAK; PATRICK LORENZ; JARI VEHMAAN-PERA; PENTTI OJAPALO; TERHI PURANEN; KRISTIINA JARVIEN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018055007 de 01/03/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/184767 de 11/10/2018

(85) Data da Fase Nacional: 30/08/2019

(57) Resumo: Essa invenção refere-se a composições detergentes que compreendem enzimas mananases bacterianas. As composições detergentes que compreendem as mananases bacterianas são úteis em lavanderia e aplicações de limpeza em que a degradação ou modificação da manana é desejada. A invenção também se refere ao uso das ditas composições detergentes em lavanderia e aplicações de limpeza assim como um método para degradar a manana.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSIÇÕES DETERGENTES QUE COMPREENDEM MANANASES BACTERIANAS".**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] Esta invenção refere-se a novas composições detergentes que compreendem enzimas mananase bacterianas. As composições detergentes que compreendem mananases bacterianas são úteis em aplicações em lavanderia e limpeza em que a degradação ou modificação da manana é desejada. A invenção também se refere à utilização das ditas composições detergentes em aplicações em lavanderia e limpeza, bem como a um método para degradar a manana.

ANTECEDENTES

[002] As mananas são polissacarídeos que contêm manose encontrados em várias plantas. As mananas são pouco solúveis em um ambiente aquoso e suas propriedades físico-químicas dão origem a dispersões viscosas. Além disso, as mananas possuem alta capacidade de ligação de água. Todas essas características causam problemas em vários setores, incluindo fabricação de cerveja, panificação, nutrição animal e aplicações em lavanderia e limpeza.

[003] Em dietas baseadas em plantas estão presentes β-mananas diferentes e, dependendo de suas quantidades e propriedades, elas podem comprometer a digestão de nutrientes, a colonização microbiana e o desempenho do crescimento. A degradação enzimática de mananas reduz a viscosidade da digesta de mananas altamente solúveis em água e leva à produção de mano-oligossacarídeos que podem formar mananas lineares insolúveis em água presentes nas leguminosas. A mananase aumenta o ganho médio diário, a eficiência alimentar, a uniformidade de peso e a habitabilidade em todos os animais monogástricos.

[004] Para aplicações em ração animal, como rações para ani-

mais monogástricos com dietas de cereais, a manana é um fator que contribui para a viscosidade do conteúdo do intestino e, dessa maneira, afeta adversamente a digestibilidade da ração e a taxa de crescimento do animal. Para ruminantes, manana representa um componente substancial da ingestão de fibra e uma digestão mais completa da manana facilitará a maior eficiência de conversão da ração.

[005] Para aplicações em lavanderia e limpeza, composições detergentes que compreendem mananase podem ser usadas para degradar a manana. No entanto, é difícil fornecer mananases que sejam estáveis em condições variáveis de armazenamento e uso e que ainda mostrem boa atividade de degradação da manana.

[006] É um objetivo da presente invenção fornecer composições detergentes que compreendam as novas enzimas que exibam atividade de mananase quando aplicadas nestas composições detergentes. Outro objetivo adicional da presente invenção é fornecer composições detergentes com um desempenho de remoção de manchas aumentado em manchas que contém manana.

SUMÁRIO

[007] De acordo com o primeiro aspeto da invenção, é fornecida uma composição detergente que compreende pelo menos uma enzima que possui uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 74% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16 (Man7), e/ou 93 % de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 12 (Man6) e/ou 79% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 20 (Man14).

[008] Em uma modalidade da invenção, a pelo menos uma enzima tem uma sequência de aminoácidos com pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81% %, pelo menos 82%, pelo menos

83%, pelo menos 84%, 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% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 16.

[009] Em uma modalidade da invenção, a pelo menos uma enzima tem uma sequência de aminoácidos com pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 12.

[0010] Em uma outra modalidade da invenção, a pelo menos uma enzima possui uma atividade de degradação da manana. As mananases compreendidas na composição detergente da invenção são adequadas para degradar e modificar o material que contém manana em vários ambientes químicos, preferivelmente em composições detergentes.

[0011] Em uma modalidade da presente invenção, a composição detergente compreende ainda uma ou mais enzimas adicionais selecionadas do grupo que consiste em protease, lipase, cutinase, amilase, carbo-hidrase, celulase, pectinase, pectatilase, mananase, arabinase, galactanase, xilanase, oxidase, xantanase, lacase e/ou peroxidase, preferencialmente selecionadas do grupo que consiste em proteases, amilases, celulases e lipases.

[0012] Em uma outra modalidade da presente invenção, a composição detergente está na forma de uma barra, um comprimido homogéneo, um comprimido que possui duas ou mais camadas, uma bolsa com um ou mais compartimentos, um pó regular ou compacto, um granulado, uma pasta, um gel, ou um líquido regular, compacto ou concentrado. Em uma outra modalidade, a composição detergente pode ser uma composição detergente para lavanderia, preferivelmente

uma composição detergente para lavanderia líquida ou sólida.

[0013] A presente invenção se refere, além disso, ao uso da composição detergente como aqui descrita para a degradação da manana.

[0014] Em uma outra modalidade, a presente invenção se refere à utilização da composição detergente como aqui descrita em um processo de lavagem de roupa.

[0015] A presente invenção se refere ainda a um método para remover uma mancha de uma superfície, que compreende contatar a superfície com uma composição detergente como aqui descrita.

[0016] A presente invenção também se refere a um método para degradar a manana que compreende a aplicação de uma composição detergente como aqui descrita a manana, preferivelmente em que a manana está na superfície de um têxtil.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0017] A Fig. 1 mostra a representação esquemática do vetor pEV1 para a replicação em Bacillus.

[0018] A Fig. 2 mostra esquematicamente os cassetes de expressão usados na transformação de protoplastos de *Trichoderma reesei* para superprodução das proteínas mananase recombinantes (Man6, Man7 e Man14). Os genes da mananase estavam sob o controle do promotor *cel7A/cbh1 (pcbhl) de T. reesei* e a terminação da transcrição foi assegurada com o uso da sequência terminadora *cel7A/cbh1 (tcbh1)* de *T. reesei*. O gene *amdS* foi incluído como um marcador de transformação.

[0019] A Fig. 3 mostra o perfil de temperatura da mananase recombinante Man6, Man7 e Man14 (produzidas por Bacillus) ensaiadas em tampão Britton-Robinson 40 mM, pH 7, utilizando um tempo de reação de 10 minutos, galactomanana de alfarroba reticulada com Azurine foi usada como substrato. Todas as medições foram feitas pelo menos em duplicata. Os pontos de dados são médias de medições

separadas.

[0020] A Fig. 4 descreve o efeito do pH sobre a atividade da proteína mananase recombinante Man6, Man7 e Man14 (produzida por Bacillus) em tampão Britton-Robinson 40 mM em pH 4 a pH 11. A temperatura da reação foi de 50ºC e o tempo de reação foi de 10 min. Galactomanana de alfarroba reticulada com Azurine foi usada como substrato. Todas as medições foram feitas pelo menos em duplicata. Os pontos de dados são médias de medições separadas.

[0021] A Fig. 5 mostra a análise por SDS PAGE de mananases bacterianas.

[0022] A Fig. 6 descreve o desempenho de remoção de manchas de Man6 e Man7 (produzidas em *Bacillus e Trichoderma*) como um aumento do clareamento (soma de ΔL* de 4 manchas) na presença de 4,4 g/l de detergente líquido comercial para limpeza pesada A a 40ºC, 16° dH, 60 min, pH aproximado de 8,3 e enzimas dosadas como unidades de atividade. A preparação comercial Mannaway® 4,0 L foi usada para comparação.

[0023] A Fig. 7 descreve o desempenho de remoção de manchas de Man6 e Man7 (produzidas em *Bacillus*) como um aumento do clareamento (soma de ΔL* de 4 manchas) na presença de 4,4 g/l de detergente líquido comercial para limpeza pesada A a 40ºC, 16° dH, 60 min, pH aproximado de 8,3 e enzimas dosadas como proteína enzimática ativa (AEP). A preparação comercial Mannaway® 4,0 L foi usada para comparação.

[0024] A Fig. 8 descreve o desempenho de remoção de manchas de Man6 e Man7 (produzidas em *Bacillus*) como um aumento do clareamento (soma de ΔL* de 4 manchas) na presença de 3,8 g/l de pó detergente de cor comercial a 40 ° C., 16° dH, 60 min, pH aproximado de 10 e enzimas dosadas como unidades de atividade. A preparação comercial Mannaway® 4,0 L foi usada para comparação.

[0025] A Fig. 9 descreve o desempenho de remoção de manchas de Man6 e Man7 (produzidas em *Bacillus*) como um aumento do clareamento (soma de ΔL* de 4 manchas) na presença de 3,8 g/l de pó detergente de cor comercial a 40 ° C., 16° dH, 60 min, pH aproximado de 10 e enzimas dosadas como proteína enzimática ativa. A preparação comercial Mannaway® 4,0 L foi usada para comparação.

[0026] A Fig. 10 descreve o desempenho de remoção de manchas de Man6 e Man7 (produzidas em *Bacillus*) como um aumento do clareamento (soma de ΔL* de 3 manchas) na presença de 4,2 g/l de detergente de branqueamento em pó comercial a 40ºC, 16° dH, 60 min, pH aproximado de 9,5 e enzimas dosadas como proteína enzimática ativa. A preparação comercial Mannaway® 4,0 L foi usada para comparação.

[0027] A Fig. 11 descreve o desempenho de remoção de manchas de Man14 (produzida em *Bacillus*) como um aumento do clareamento (soma de ΔL* de 2 manchas) na presença de 5 g/l de detergente líquido comercial para limpeza pesada B a 40°C, 16° dH, 60 min, pH aproximado de 8,3 e enzimas dosadas como unidades de atividade. A preparação comercial Mannaway® 4,0 L foi usada para comparação.

[0028] A Fig 12 descreve o desempenho de remoção de manchas de Man14 (produzida em *Bacillus*) como um aumento do clareamento (soma de ΔL* de 2 manchas) na presença de 5 g/l de detergente líquido comercial para limpeza pesada B a 40°C, 16° dH, 60 min, pH aproximado de 8,3 e enzimas dosadas como unidades de atividade. A preparação comercial Mannaway® 4,0 L foi usada para comparação.

[0029] A Fig. 13 descreve a estabilidade de Man6 e Man7 (produzidas em *Bacillus*) em detergente líquido (OMO Color) a 37°C. Preparação comercial Mannaway® 4,0 L foi usada para comparação

[0030] A Fig. 14 descreve a estabilidade de Man 6 (produzida em *Bacillus*) em detergente líquido para limpeza pesada comercial A. A

preparação comercial Mannaway® 4,0 L foi usada para comparação.

LISTAGENS DE SEQUÊNCIAS

[0031] SEQ ID NO: 1 Sequência do iniciador de oligonucleotídeo Man6_1

[0032] SEQ ID NO: 2 Sequência do iniciador de oligonucleotídeo Man6_2

[0033] SEQ ID NO: 3 Sequência do iniciador de oligonucleotídeo Man7_1

[0034] SEQ ID NO: 4 Sequência do iniciador de oligonucleotídeo Man7_2

[0035] SEQ ID NO: 5 Sequência do iniciador de oligonucleotídeo Man14_1

[0036] SEQ ID NO: 6 Sequência do iniciador de oligonucleotídeo Man14_2

[0037] SEQ ID NO: 7 Sequência do iniciador de oligonucleotídeo Vec_1

[0038] SEQ ID NO: 8 Sequência do iniciador de oligonucleotídeo Vec_2

[0039] SEQ ID NO: 9 Sequência de nucleotídeos de *man6 de Bacillus clausii*

[0040] SEQ ID NO: 10 Sequência de nucleotídeos de *man6 de Bacillus clausii* sem a sequência que codifica o peptídeo de sinal e com otimização de códon para *Trichoderma reesei*

[0041] SEQ ID NO: 11 Sequência de aminoácidos deduzida de Man6 de *Bacillus clausii*

[0042] SEQ ID NO: 12 Sequência de aminoácidos deduzida de Man6 de *Bacillus clausii* sem peptídeo de sinal

[0043] SEQ ID NO: 13 Sequência de nucleotídeos de *man7 de Bacillus hemicellulosilyticus*

[0044] SEQ ID NO: 14 Sequência de nucleotídeos de *man7 de*

Bacillus hemicellulosilyticus sem a sequência que codifica o peptídeo de sinal e com otimização de códon para *Trichoderma reesei*

[0045] SEQ ID NO: 15 Sequência de aminoácidos deduzida de Man7 de *Bacillus hemicellulosilyticus*

[0046] SEQ ID NO: 16 Sequência de aminoácidos deduzida de Man7 de *Bacillus hemicellulosilyticus* sem peptídeo de sinal

[0047] SEQ ID NO: 17 Sequência de nucleotídeos de *man14 de Virgibacillus soli*

[0048] SEQ ID NO: 18 Sequência de nucleotídeos de *man14 de Virgibacillus soli* sem a sequência que codifica o peptídeo de sinal e com otimização de códon para *Trichoderma reesei*

[0049] SEQ ID NO: 19 Sequência de aminoácidos deduzida de Man14 de *Virgibacillus soli*

[0050] SEQ ID NO: 20 Sequência de aminoácidos deduzida de Man14 de *Virgibacillus soli* sem peptídeo de sinal

[0051] SEQ ID NO: 21 Sequência do iniciador de oligonucleotídeo BMAN1

[0052] SEQ ID NO: 22 Sequência do iniciador de oligonucleotídeo BMAN2

[0053] SEQ ID NO: 23 Sequência do iniciador de oligonucleotídeo BMAN3

[0054] SEQ ID NO: 24 Sequência do iniciador de oligonucleotídeo BMAN4

[0055] SEQ ID NO: 25 Sequência de nucleotídeos de *man31* de *Bacillus pumilus*

[0056] SEQ ID NO: 26 Sequência de aminoácidos deduzida de Man 31 de *Bacillus pumilus*

[0057] SEQ ID NO: 27 Sequência de nucleotídeos de *man32* de *Bacillus amyloliquefaciens*

[0058] SEQ ID NO: 28 Sequência de aminoácidos deduzida de

Man 32 de *Bacillus amyloliquefaciens*

[0059] SEQ ID NO: 29 Sequência de nucleotídeos de *man33* de *Amphibacillus xylanus*

[0060] SEQ ID NO: 30 Sequência de aminoácidos deduzida de Man 33 *Amphibacillus xylanus*

[0061] SEQ ID NO: 31 Sequência de nucleotídeos de *man34* de *Paenibacillus polymixa*

[0062] SEQ ID NO: 32 Sequência de aminoácidos deduzida de Man 34 de *Paenibacillus polymixa*

[0063] SEQ ID NO: 33 Sequência de nucleotídeos de *man35* de *Bacillus hemicellulosilyticus*

[0064] SEQ ID NO: 34 Sequência de aminoácidos deduzida de Man 35 de *Bacillus hemicellulosilyticus*

[0065] SEQ ID NO: 35 Sequência de nucleotídeos de *man36* de *Bacillus alcalophilus*

[0066] SEQ ID NO: 36 Sequência de aminoácidos deduzida de Man 36 de *Bacillus alcalophilus*

[0067] SEQ ID NO: 37 Sequência de nucleotídeos de *man37* de *Bacillus sp.*

[0068] SEQ ID NO: 38 Sequência de aminoácidos deduzida de Man 37 de *Bacillus sp.*

[0069] SEQ ID NO: 39 Sequência de nucleotídeos de *man38* de *Bacillus circulans*

[0070] SEQ ID NO: 40 Sequência de aminoácidos deduzida de Man 38 de *Bacillus circulans*

[0071] SEQ ID NO: 41 Sequência de nucleotídeos de *man39* de *Paenibacillus sp.*

[0072] SEQ ID NO: 42 Sequência de aminoácidos deduzida de Man 39 de *Paenibacillus sp.*

[0073] SEQ ID NO: 43 Sequência de nucleotídeos de *man40* de

Bacillus circulans

[0074] SEQ ID NO: 44 Sequência de aminoácidos deduzida de Man 40 de *Bacillus circulans*

[0075] SEQ ID NO: 45 Sequência de nucleotídeos de *man41* de *Bacillus nealsonii*

[0076] SEQ ID NO: 46 Sequência de aminoácidos deduzida de Man 41 de *Bacillus nealsonii*

[0077] SEQ ID NO: 47 Sequência de nucleotídeos de *man42* de *Bacillus circulans*

[0078] SEQ ID NO: 48 Sequência de nucleotídeos de Man42 de *Bacillus circulans*

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0079] Como usado aqui, "isolado" significa uma substância em uma forma ou ambiente em que não ocorre na natureza. Exemplos não limitantes de substancias isoladas incluem (1) qualquer substancia que não ocorre naturalmente, (2) qualquer substancia que inclua qualquer enzima, variante, ácido nucleico, proteína, peptídeo ou cofator, que seja pelo menos parcialmente removido de um ou mais ou todos os constituintes que ocorrem naturalmente com os quais está associado na natureza; (3) qualquer substância modificada pela mão do homem em relação àquela substância encontrada na natureza; ou (4) qualquer substância modificada pelo aumento ou diminuição da quantidade da substância em relação a outros componentes com os quais ela está naturalmente associada (por exemplo, produção recombinante em uma célula hospedeira; uma ou múltiplas cópias de um gene que codifica a substância; um promotor alternativo ao promotor naturalmente associado ao gene que codifica a substância). Em uma modalidade, um polipeptídeo, enzima, polinucleotídeo, célula hospedeira ou composição da invenção é isolado.

[0080] Como usada aqui, a expressão "compreendendo" inclui os

significados mais amplos de "incluindo", "contendo" e "que compreende", assim como as expressões mais restritas "consistindo em" e "consistindo apenas em".

[0081] Como usado aqui, "fragmento" significa uma proteína ou um polinucleotídeo que possui um ou mais aminoácidos ou nucleotídeos deletados. No contexto do DNA, um fragmento inclui DNA de cadeia simples e de cadeia dupla de qualquer extensão. Um fragmento pode ser um fragmento ativo que tem a função biológica, tal como atividade enzimática ou atividade reguladora, da proteína ou do polinucleotídeo. Um fragmento pode também ser um fragmento inativo, isto é, não possui um ou mais efeitos biológicos da proteína ou polinucleotídeo nativos.

[0082] Como usado aqui, "variante" significa um fragmento de sequência (nucleotídeo ou aminoácido) inserido ou eliminado por um ou mais nucleotídeos/aminoácidos ou que é quimicamente modificado.

[0083] Como usado aqui, um "peptídeo" e um "polipeptídeo" são sequências de aminoácidos que incluem uma pluralidade de resíduos de aminoácidos polimerizados consecutivos. Para os propósitos desta invenção, os peptídeos são moléculas que incluem até 20 resíduos de aminoácidos e os polipeptídeos incluem mais do que 20 resíduos de aminoácidos. O peptídeo ou polipeptídeo pode incluir resíduos de aminoácidos modificados resíduos de aminoácidos que ocorrem naturalmente não codificados por um códon e resíduos de aminoácidos que não ocorrem naturalmente. Como usado aqui, uma "proteína" pode se referir a um peptídeo ou a um polipeptídeo de qualquer tamanho. Uma proteína pode ser uma enzima, uma proteína, um anticorpo, uma proteína de membrana, um hormônio peptídico, regulador ou qualquer outra proteína.

[0084] A expressão "polinucleotídeo" designa um polímero de bases de desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos de cadeia simples

ou dupla lido da extremidade 5' para a extremidade 3'. Os polinucleotídeos incluem RNA e DNA e podem ser isolados a partir de fontes naturais, sintetizados in vitro ou preparados a partir de uma combinação de moléculas naturais e sintéticas.

[0085] Como usado aqui, "modificação", "modificado" e expressões semelhantes no contexto de polinucleotídeos se referem a modificação em uma região codificadora ou não codificadora do polinucleotídeo, tal como uma sequência reguladora, região 5' não traduzida, região 3' não traduzida, elemento genético de regulação positiva, elemento genético de regulação negativa, região intensificadora, supressora, promotora, de éxon ou íntron. A modificação pode, em algumas modalidades, ser apenas estrutural, não tendo efeito sobre efeito, ação ou função biológicas do polinucleotídeo. Em outras modalidades, a modificação é uma modificação estrutural que fornece uma alteração no efeito, ação ou função biológicas do polinucleotídeo. Tal modificação pode aumentar, suprimir ou alterar a função biológica do polinucleotídeo.

[0086] Como usado aqui, "identidade" significa o percentual de correspondências exatas de resíduos de aminoácidos entre duas sequências alinhadas em relação ao número de posições onde existem resíduos presentes em ambas as sequências. Quando uma sequência tem um resíduo sem nenhum resíduo correspondente na outra sequência, o programa de alinhamento permite uma lacuna no alinhamento e essa posição não é contada no denominador do cálculo de identidade. IA identidade é um valor determinado com a ferramenta Pairwise Sequence Alignment EMBOSS Needle no website EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

[0087] Como usado aqui, célula hospedeira significa qualquer tipo de célula que seja suscetível à transformação, transfecção, transdução, reprodução, cruzamento ou semelhante com um construto de áci-

do nucleico ou vetor de expressão que compreendem um polinucleotídeo. A expressão "célula hospedeira" abrange qualquer progênie que não seja idêntica devido a mutações que ocorrem durante a replicação. Exemplos não limitantes de uma célula hospedeira são células fúngicas, células fúngicas filamentosas da Divisão *Ascomycota*, Subdivisão *Pezizomycotina*; preferivelmente do grupo que consiste em membros da classe *Sordariomycetes*, Subclasse *Hypocreomycetidae*, Ordens *Hypocreales* e *Microascales* e *Aspergillus*, *Chrysosporium*, Myceli*ophthora* e *Humicola*; mais preferivelmente do grupo que consiste nas Famílias *Hypocreacea, Nectriaceae, Clavicipitaceae, Microascaceae*, e Gêneros *Trichoderma* (anamorfo de *Hypocrea*), *Fusarium, Gibberella, Nectria, Stachybotrys, Claviceps, Metarhizium, Villosiclava, Ophiocordyceps, Cephalosporium e Scedosporium*; mais preferivelmente do grupo que consiste em *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*), *T. citrinoviridae, T. longibrachiatum, T. virens, T. harzianum, T. asperellum, T. atroviridae, T. parareesei, Fusarium oxysporum, F. graminearum, F. pseudograminearum, F. venenatum, Gibberella fujikuroi, G. moniliformis, G. zeae*a, *Nectria hematococca (Haematonectria*), *Stachybotrys chartarum, S. clorohalonata, Claviceps purpurea, Metarhizium acridum, M. anisopliae, Villosiclava virens, Ophiocordyceps sinensis, Acremonium (Cephalosporium) chrysogenum e Scedosporium apiospermum e Aspergillus niger, Aspergillus awamori, Aspergillus oryzae, Chrysosporium lucknowense, Myceliophthora termophila, Humicola insolens e Humicola grisea*, mais preferivelmnte *Trichoderma reesei.* Exemplos não limitantes de células hospedeiras são células bacterianas, preferencialmente Bacilos Gram-positivos (por exemplo, *B. subtilis, B. licheniformis, B. megaterium, B. amyloliquefaciens, B. pumilus*), actinomicetos (por exemplo, *Streptomyces* sp.) e leveduras (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris, Yarrowia lipolytica*).

[0088] Em um exemplo, a modalidade da célula hospedeira é uma célula fúngica, de preferência uma célula fúngica filamentosa, tal como *Trichoderma* ou *Trichoderma reesei*. Em um exemplo, a modalidade da célula hospedeira é uma célula bacteriana, de preferência uma célula de *Bacillus* Gram positiva, tal como *B. subtilis, B. licheniformis, B. megaterium, B. amyloliquefaciens, B. pumilus*.

[0089] Uma "célula recombinante" ou "célula hospedeira recombinante" se refere a uma célula ou célula hospedeira que tenha sido geneticamente modificada ou alterada para compreender uma sequência de ácido nucleico que não é nativa da referida célula ou célula hospedeira. Em uma modalidade, a modificação genética compreende a integração do polinucleotídeo no genoma da célula hospedeira. Em outra modalidade, o polinucleotídeo é exógeno em comparação com a célula hospedeira.

[0090] Como usado aqui, "expressão" inclui qualquer etapa envolvida na produção de um polipeptídeo em uma célula hospedeira incluindo, mas não limitado a transcrição, tradução, modificação pós-traducional e secreção. A expressão pode ser seguida pela coleta, isto é, recuperação, das células hospedeiras ou do produto expresso.

[0091] A expressão "vetor de expressão" denota uma molécula de DNA, linear ou circular, que compreende um segmento que codifica um polipeptídeo de interesse operativamente ligado a segmentos adicionais que fornecem sua transcrição. Tais segmentos adicionais podem incluir sequências promotoras e terminadoras, e podem opcionalmente incluir uma ou mais origens de replicação, um ou mais marcadores selecionáveis, um intensificador, um sinal de poliadenilação, transportador e semelhantes. Os vetores de expressão são geralmente derivados do DNA de plasmídeo ou viral, ou podem conter elementos de ambos. O vetor de expressão pode ser qualquer vetor de expressão que seja convenientemente submetido a procedimentos de DNA

recombinante e a escolha do vetor dependerá frequentemente da célula hospedeira na qual o vetor será introduzido. Assim, o vetor pode ser um vetor de replicação autônoma, isto é, um vetor, que existe como uma entidade extracromossômica, cuja replicação é independente da replicação do cromossomo, por exemplo, um plasmídeo. Alternativamente, o vetor pode ser aquele que, quando introduzido em uma célula hospedeira, é integrado no genoma da célula hospedeira e replicado em conjunto com o(s) cromossomo(s) no(s) qual/quais ele tenha sido integrado.

[0092] A expressão "expresso recombinante" ou "expresso recombinantemente" como usada aqui em conexão com a expressão de um polipeptídeo ou proteína é definida de acordo com a definição padrão na técnica.

[0093] A expressão "obtido de" e "obtenível" como usada aqui em conexão com uma fonte microbiana específica, significa que o polinucleotídeo e/ou polipeptídeo é produzido pela fonte específica (expressão homóloga), ou por uma célula na qual um gene da fonte foi inserido (expressão heteróloga).

[0094] A expressão "composição enzimática" significa um produto de fermentação enzimática convencional, possivelmente isolado e purificado, de uma única espécie de um microrganismo, tal preparação compreendendo geralmente várias atividades enzimáticas diferentes; ou uma mistura de monocomponentes de enzimas, preferivelmente enzimas derivadas de espécies bacterianas ou fúngicas utilizando técnicas recombinantes convencionais, enzimas essas que foram fermentadas e possivelmente isoladas e purificadas separadamente e que podem ser originadas de diferentes espécies, preferivelmente espécies fúngicas ou bacterianas ou o produto de fermentação de um microrganismo que atua como uma célula hospedeira para expressão de uma mananase recombinante, mas cujo microrganismo produz simultane-

amente outras enzimas.

[0095] A expressão "operativamente ligado", quando se refere a segmentos de DNA, denota que os segmentos estão dispostos de modo a funcionarem em conjunto para os fins pretendidos, por exemplo, iniciar a transcrição no promotor e prosseguir através do segmento codificador para o terminador.

[0096] A expressão "promotor" denota uma porção de um gene que contém sequências de DNA que fornecem a ligação da RNA polimerase e o início da transcrição. As sequências promotoras são comumente, mas nem sempre, encontradas nas regiões 5' não codificadoras dos genes.

[0097] A expressão "sequência de sinal secretora" denota uma sequência de DNA que codifica um polipeptídeo (um "peptídeo secretório") que, como componente de um polipeptídeo maior, direciona o polipeptídeo maior através de uma via secretória de uma célula hospedeira na qual é sintetizado. A sequência de sinal secretora pode ser nativa ou pode ser substituída por sequência de sinal secretora ou sequência de transporte de outra fonte. Dependendo da célula hospedeira, o peptídeo maior pode ser clivado para remover o peptídeo secretor durante o trânsito através da via secretória.

[0098] A expressão "região do núcleo" denota um domínio de uma enzima que pode ou não ter sido modificada ou alterada, mas que reteve a sua atividade original; o domínio catalítico como conhecido na técnica permaneceu funcional.

[0099] Pela expressão "ligante" ou "espaçador" entende-se um polipeptídeo que compreende pelo menos dois aminoácidos que podem estar presentes entre os domínios de uma proteína de múltiplos domínios, por exemplo, uma enzima que compreende um núcleo de enzima e um domínio de ligação tal como um módulo de ligação a carboidrato (CBM) ou qualquer outra enzima híbrida ou entre duas proteí-

nas ou polipeptídeos expressos como um polipeptídeo de fusão, por exemplo, uma proteína de fusão que compreende dois núcleos de enzima. Por exemplo, a proteína de fusão de uma enzima de núcleo com um CBM é fornecida pela fusão de uma sequência de DNA que codifica o núcleo da enzima, uma sequência de DNA que codifica o ligante e uma sequência de DNA que codifica o CBM sequencialmente em uma fase de leitura aberta e que expressa este construto.

[00100] A expressão "composição detergente" inclui, a menos que indicado ao contrário, agentes de lavagem granulados ou em forma de pó para todos os propósitos ou para serviços pesados, especialmente detergentes de limpeza; agentes de lavagem líquidos, em forma de gel ou pasta para todos os fins, especialmente os assim chamados tipos de líquidos para limpeza pesada (HDL); detergentes líquidos para tecidos finos; agentes de lavar louça à mão ou detergentes para lavagem ligeira, especialmente os do tipo com alto poder de formação de espuma; agentes para máquinas de lavar louça, incluindo os vários tipos de auxiliar de lavagem em comprimidos, granulados, líquidos para uso doméstico e institucional; agentes líquidos de limpeza e desinfecção, xampus para carros ou carpetes, produtos de limpeza para banheiros; limpadores de metal; assim como auxiliares de limpeza, tais como aditivos de branqueamento e tipos de "removedor de mancha" ou pré-tratamento. As expressões "composição detergente" e "formulação detergente" são utilizados em referência a misturas que se destinam a ser utilizadas em um meio de lavagem para a limpeza de objetos sujos. Em algumas modalidades, a expressão é usada em referência a lavagem de tecidos e/ou roupas (por exemplo, "detergentes para lavanderia"). Em modalidades alternativas, a expressão se refere a outros detergentes, tais como aqueles usados para lavar pratos, talheres, etc (por exemplo, "detergentes para lavar louça") Não é pretendido que a presente invenção seja limitada a qualquer formulação ou com-

posição detergente em particular. É pretendido que, em adição as variantes de acordo com a invenção, a expressão abranja detergente que podem conter, por exemplo, tensoativos, construtores, quelantes ou agentes de quelação, sistema de branqueamento ou componentes para branqueamento, polímeros, condicionadores de tecido, reforçadores de espuma, supressores de sujeira, corantes, perfumes, inibidores de manchas, abrilhantadores ópticos, bactericidas, fungicidas, agentes de suspensão, agentes anticorrosão, inibidores ou estabilizadores de enzima, ativadores de enzima, transferases, enzimas hidrolíticas, óxido redutases, agentes para manutenção da brancura e corantes fluorescentes, antioxidantes e solubilizantes.

[00101] A expressão "têxtil" significa qualquer material têxtil, incluindo fios, intermediários de fios, fibras, materiais não tecidos, materiais naturais, materiais sintéticos e qualquer outro material têxtil, tecidos feitos desses materiais e produtos feitos de tecidos (por exemplo, roupas e outros artigos). O têxtil ou tecido pode ser na forma de malhas, tecidos, brins, não-tecidos, feltros, fios e atoalhados. O têxtil pode ser baseado em celulose, tais como celuloses naturais, incluindo algodão, linho, juta, rami, sisal ou coco ou celulósicos sintéticos (por exemplo, originários de polpa de madeira) incluindo viscose/rayon, rami, fibras de acetato de celulose (tricell), lyocell ou misturas dos mesmos. O têxtil ou tecido também pode ser não celulósico, como poliamidas naturais, incluindo lã, camelo, caxemira, mohair, coelho e seda ou polímero sintético, como nylon, aramida, poliéster, acrílico, polipropileno e spandex/ elastano, ou misturas dos mesmos, assim como mistura de fibras à base de celulose e não celulósica. Exemplos de misturas são misturas de algodão e/ou rayon/viscose com um ou mais materiais complementares tais como lã, fibras sintéticas (por exemplo fibras de poliamida, fibras acrílicas, fibras de poliéster, fibras de álcool polivinílico, fibras de cloreto de polivinila, fibras de poliuretano, fibras de poliu-

réia, fibras de aramida) e fibras que contêm celulose (por exemplo, rayon/viscose, rami, linho, juta, fibras de acetato de celulose, liocel). O tecido pode ser uma roupa lavável em lavanderia convencional, por exemplo, roupa de uso doméstico tingida. Quando a expressão tecido ou vestuário é usada, pretende-se incluir também a expressão mais ampla têxteis também.

[00102] A expressão "estabilidade" inclui estabilidade durante o armazenamento e estabilidade durante o uso, por exemplo, durante um processo de lavagem (em estabilidade de lavagem) e reflete a estabilidade da variante de protease de acordo com a invenção em função do tempo, por exemplo, quanta atividade é retida quando a protease é mantida em solução, em particular em uma solução detergente. A estabilidade é influenciada por muitos fatores, por exemplo, pH, temperatura, composição detergente, por exemplo, quantidade de construtor, tensoativos, etc. A estabilidade da protease pode ser medida utilizando o "ensaio de estabilidade", como descrito na seção de Materiais e Métodos. A expressão "estabilidade melhorada" ou "estabilidade aumentada" é aqui definida como uma variante de protease que exibe uma estabilidade aumentada em soluções, em relação à estabilidade da protease parental. As expressões "estabilidade melhorada" e "estabilidade aumentada" incluem "estabilidade química melhorada", "estabilidade do detergente" ou "estabilidade melhorada do detergente.

Composição Detergente

[00103] A presente invenção refere-se a novas composições detergentes que compreendem enzimas mananase bacterianas. As composições detergentes que compreendem mananases bacterianas são úteis em aplicações em lavanderia e limpeza em que a degradação ou modificação de manana é desejada. A invenção também se refere à utilização das referidas composições detergentes em aplicações em lavanderia e limpeza, assim como a um método para degradar a ma-

nana.

[00104] Como usada aqui, a expressão "manana" se refere a polissacarídeos que consistem em um arcabouço de manose ligado em conjunto por ligações β-1,4 com cadeias laterais de galactose ligadas ao arcabouço por ligações α-1,6. As mananas compreendem material à base de plantas, tais como goma de guar e goma de alfarroba. Glicomananas são polissacarídeos que possuem um arcabouço de manose e glicose mais ou menos regularmente alternadas com β-1,4, galactomananas e galactoglicomananas são mananas e glicomananas com cadeias laterais de galactose ligadas em alfa-1,6.

[00105] Como usada aqui, a expressão "mananase" ou "galactomanase" denota uma enzima mananase definida de acordo com a técnica como manana endo-1,4-beta-manosidase e que possui os nomes alternativos de beta-mananase e endo-1,4-mananase e que catalise a hidrólise das ligações 1,4-beta-D-manosídicas em mananas, galactomananas, glicomananas e galactoglicomananas. As mananases são classificadas de acordo com a Nomenclatura de Enzimas como EC 3.2.1.78.

[00106] "Atividade de mananase", tal como usado aqui, se refere à atividade de degradação da manana de um polipeptídeo. Degradar ou modificar como usado aqui significa que as unidades de manose são hidrolisadas a partir do polissacárido de manana pela mananase. A atividade de degradação de manana dos polipeptídeos de acordo com a presente invenção pode ser testada de acordo com procedimentos de teste padronizados conhecidos na técnica. O Exemplo 7 fornece um exemplo de um método padronizado para determinar a atividade da mananase.

[00107] De acordo com o primeiro aspecto, a composição detergente da presente invenção compreende pelo menos uma enzima que possui uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 74% de

identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16 (Man7), e/ou 93% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 12 (Man6) e/ou 79% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 20 (Man14).

[00108] Em uma modalidade da invenção, a pelo menos uma enzima tem uma sequência de aminoácidos com pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, 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% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

[00109] Em uma modalidade da invenção, a pelo menos uma enzima tem uma sequência de aminoácidos com pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 12.

[00110] Em uma modalidade adicional da invenção, a pelo menos uma enzima possui uma atividade de degradação da manana. As mananases compreendidas na composição detergente da invenção são adequadas para degradar e modificar o material que contém manana em vários ambientes químicos, preferivelmente em composições detergentes.

[00111] Em uma modalidade da presente invenção, a composição detergente compreende ainda uma ou mais enzimas adicionais selecionadas do grupo que consiste em protease, lipase, quitinase, amilase, carboidrase, celulase, pectinase, pectatilase, mananase, arabinase,

galactanase, xilanase, oxidase, xantanase, lacase e/ou peroxidase, preferencialmente selecionadas do grupo consistindo em proteases, amilases, celulases e lipases.

[00112] Em geral, as propriedades da(s) enzima(s) selecionada(s) devem ser compatíveis com o detergente selecionado (isto é, pH ótimo, compatibilidade com outros ingredientes enzimáticos e não enzimáticos, etc.), e a(s) enzima(s) deve(m) estar presente(s) em quantidades efetivas.

Celulases

[00113] Celulases adequadas incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Os mutantes de proteína manipulados ou quimicamente modificados estão incluídos. Celulases adequadas incluem celulases dos gêneros *Bacillus, Pseudomonas, Humicola, Fusarium, Thielavia, Acremonium*, por exemplo, as celulases de fungos produzidas a partir de *Humicola insolens, Myceliophthora thermophila e Fusarium oxysporum* descritas em US 4.435.307, US 5.648.263, US 5.691.178, US 5.776.757 e WO 89/09259. Celulases especialmente adequadas são as celulases alcalinas ou neutras que possuem benefícios de cuidados com a cor. Exemplos de tais celulases são as celulases descritas em EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Outros exemplos são variantes de celulase tais como aquelas descritas em WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5.457.046, US 5.686.593, US 5.763.254, WO 95/24471, WO 98/12307 e PCT/DK98/00299. Exemplo de celulases que exibem atividade de endo-beta-1,4-glicanase (EC 3.2.1.4) são aquelas descritas no WO02/099091. Outros exemplos de celulases incluem as famílias de 45 celulases descritas no WO96/29397 e, especialmente, as suas variantes que possuem substituição, inserção e/ou eliminação em uma ou mais das posições que correspondem às seguintes posições na SEQ ID NO: 8 de WO 02/099091: 2, 4, 7, 8, 10, 13, 15, 19, 20, 21, 25,

26, 29, 32, 33, 34, 35, 37, 40, 42, 42a, 43, 44, 48, 53 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 70, 72, 76, 79, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 91, 93, 95, 95d, 95h, 95j 97, 100, 101, 102, 103, 1 13, 1 14, 1 17, 1 19, 121, 133, 136, 137, 138, 139, 140a, 141, 143a, 145, 146, 147, 150e, 150j 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160c, 160e, 160k, 161, 162, 164, 165, 168, 170, 171, 172, 173, 175, 176, 178, 181, 183, 184, 185, 186, 188, 191, 192, 195, 196, 200, e/ou 20, preferivelmente selecionadas entre P19A, G20K, Q44K, N48E, Q119H ou Q146R. Celulases disponíveis comercialmente incluem Celluclean™, Celluzyme™ e Carezyme™ (Novozymes A / S), Clazinase™ e Puradax HA™ (Genencor International Inc.) e KAC-500 (B)™ (Kao Corporation).

Proteases

[00114] Proteases adequadas incluem aquelas de origem bacteriana, fúngica, vegetal, viral ou animal, por exemplo, origem vegetal ou microbiana. Origem microbiana é preferida. Os mutantes de proteina manipulada ou modificada quimicamente estão incluídos. Pode ser uma protease alcalina, tal como uma serina protease ou uma metaloprotease. Uma serina protease pode ser, por exemplo, da família S1, tal como a tripsina ou da família S8, tal como a subtilisina. Uma protease de metaloproteases pode por exemplo ser uma termolisina, por exemplo, da família M4 ou outra metaloprotease, tais como aquelas das famílias M5, M7 ou M8.

[00115] A expressão "subtilases" se refere a um subgrupo de serina protease de acordo com Siezen et al., Protein Engng. 4 (1991) 719-737 e Siezen et al. Protein Science 6 (1997) 501-523. Serina proteases são um subgrupo de proteases caracterizado por ter uma serina no sítio ativo, que forma um aduto covalente com o substrato. As subtilases podem ser divididas em 6 subdivisões, isto é, a família Subtilisina, a família Termitase, a família Proteinase K, a família das Lantibiotico peptidase, a família Kexin e a família Pirolisina. Exemplos de subti-

lases são aqueles derivados de Bacillus tais como *Bacillus lentus, B. alkalophilus, B. subtilis, B. amyloliquefaciens, Bacillus pumilus e Bacillus gibsonii* descritos em US7262042 e WO09/021867 e *subtilisina lentus, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, Bacillus licheniformis, subtilisina BPN ', subtilisina 309, subtilisina 147 e subtilisina 168* descritas no WO89/06279 e protease PD138 descrita em (WO93 / 18140). Outras proteases úteis podem ser aquelas descritas nos documentos WO92/175177, WO01/ 016285, WO02/026024 e WO02/016547. Exemplos de proteases semelhantes a tripsina são tripsina (por exemplo, de origem suína ou bovina) e a protease de *Fusarium* descrita no WO89/06270, W094/25583 e WO05/040372 e as quimotripsina proteases derivadas de *Cellumonas* descritas em WO05/052161 e WO05/052146. Uma outra protease preferida é a protease alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483, como descrito, por exemplo, em W095/23221 e suas variantes, que são descritas em WO92/21760, W095/23221, EP1921147 e EP1921148. Exemplos de metaloproteases são as metaloproteases neutras como descritas em WO07/044993 (Genencor Int.), tais como as derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[00116] Exemplos de proteases úteis são as variantes descritas em: WO92/19729, WO96/034946, WO98/20115, WO98/20116, WO99/ 011768, WO01/44452, WO03/006602, WO04/03186, WO04/041979, WO07/006305, W011/036263, W011/036264, especialmente as variantes com substituições em uma ou mais das seguintes posições: 3, 4, 9, 15, 27, 36, 57, 68, 76, 87, 95, 96 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 1 18, 120, 123, 128, 129, 130, 160, 167, 170, 194, 195, 199, 205, 206, 217, 218, 222, 224, 232, 235, 236, 245, 248, 252 e 274 que utilizam a numeração BPN. Mais preferidas, as variantes da subtilase podem compreender as mutações: S3T, V4I, S9R, A15T, K27R, *36D, V68A, N76D, N87S,R, *97E, A98S, S99G,D,A, S99AD, S101G,M,R, S103A, V104I,Y,N, S106A, G118V,R, H120D,N, N123S, S128L,

P129Q, S130A, G160D, Y167A, R170S, A194P, G195E, V199M, V205I, L217D, N218D, M222S, A232V, K235L, Q236H, Q245R, N252K, T274A (usando a numeração BPN). Enzimas protease comercialmente adequadas disponíveis incluem aquelas vendidas sob os nomes comerciais Alcalase®, Duralase™, Durazym™, Relase®, Relase® Ultra, Savinase®, Savinase® Ultra, Primase®, Polarzyme®, Kannase®, Liquanase® , Liquanase® Ultra, Ovozyme®, Coronase®, Coronase® Ultra, Neutrase®, Everlase® e Esperase® (Novozymes A/S), vendidas com o nome comercial Maxatase®, Maxacal®, Maxapem®, Purafect®, Purafect Prime®, Preferenz ™, Purafect MA®, Purafect Ox®, Purafect OxP®, Puramax®, Properase®, Effectenz™, FN2®, FN3®, FN4®, Excellase®, Opticlean® e Optimase ® (Danisco / DuPont), Axapem™ (GistBrocases N.V.), BLAP (sequência apresentada na Figura 29 de US5352604) e suas variantes (Henkel AG) e KAP (subtilisina de *Bacillus alkalophilus*) de Kao.

Lipases e Quitinases

[00117] Lipases e quitinases adequadas incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Enzimas mutantes de proteina manipulada ou modificada estão incluídas. Exemplos incluem lipase de *Thermomyces*, por exemplo, de *T. lanuginosus* (anteriormente denominada *Humicola lanuginosa*) como descrito em EP258068 e EP305216, a quitinase de *Humicola*, por exemplo, *H. insolens* (WO 96/13580), lipase de cepas de *Pseudomonas* (algumas das quais são renomeadas para *Burkholderia*), por exemplo, *P. alcaligenes* ou *P. pseudoalcaligenes* (EP218272), *P. cepacia* (EP 331376), *P. sp.* cepa SD705 (WO95/06720 & WO96/ 27002), *P. wisconsinensis* (WO96/12012), lipases de *Streptomyces* do tipo GDSL (W010/065455), quitinase de *Magnaporthe grisea* (W010/ 107560), quitinase de *Pseudomonas mendocina* (US5.389,.536), lipase de *Thermobifida fusca* (W011/084412), lipase de *Geobacillus stearothermophilus* (W011/084417), lipase de *Bacillus*

subtilis (W011/084599), e lipase de *Streptomyces griseus* (W011/150157) e *S. pristinaespiralis* (WO12/137147). Outros exemplos são as variantes de lipase tais como aquelas descritas em EP407225, WO92/05249, WO94/01541, WO94/25578, W095/14783, WO95/30744, W095/35381, W095/22615, WO96/00292, WO97/04079, WO97/07202, WO00/34450, WO00/60063, WO01/92502, WO07/87508 e WO09/109500.

[00118] Produtos de lipase comercial preferidos incluem Lipolase™, Lipex™; Lipolex™ e Lipoclean™ (Novozymes A S), Lumafast (originalmente da Genencor) e Lipomax (originalmente da Gist-Brocades).

[00119] Ainda outros exemplos são as lipases às vezes referidas como aciltransferases ou per-hidrolases, por exemplo, aciltransferases com homologia com a lipase A de *Candida antarctica* (WO10/11143), aciltransferase de *Mycobacterium smegmatis* (WO05/56782), per-hidrolases da família CE 7 (WO09/67279) e variantes da per-hidrolase de *M. smegmatis* em particular a variante S54V usada no produto comercial Gentle Power Bleach da Huntsman Textile Effects Pte Ltd (W010/100028).

Amilases

[00120] Amilases adequadas que podem ser utilizadas em conjunto com variantes da subtilase da invenção podem ser uma alfa-amilase ou uma glicoamilase e podem ser de origem bacteriana ou fúngica. Os mutantes de proteína manipulada ou modificada quimicamente estão incluídos. As amilases incluem, por exemplo, alfa-amilases obtidas de *Bacillus*, por exemplo, uma cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita em maiores detalhes em GB 1.296.839.

[00121] Amilases adequadas incluem amilases que possuem a SEQ ID NO: 3 no WO 95/10603 ou variantes que possuem 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 3 desta. Variantes preferidas estão descritas em WO 94/02597, WO 94/18314, WO 97/43424 e

SEQ ID NO: 4 da WO 99/019467, tais como as variantes com substituições em uma ou mais das seguintes posições: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 178, 179, 181, 188, 190, 197, 201, 202, 207, 208, 209, 21 1, 243, 264, 304, 305, 391, 408 e 444. Amilases diferentes adequadas incluem amilases que possuem a SEQ ID NO: 6 no documento WO 02/010355 ou suas variantes que possuem uma identidade de sequência de 90%. Variantes preferidas são aquelas que têm uma deleção nas posições 181 e 182 e uma substituição na posição 193.

[00122] Outras amilases, que são adequadas, são a alfa-amilase híbrida que compreende os resíduos 1-33 da alfa-amilase derivada de *B. amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO: 6 da WO 2006/066594 e os resíduos 36-483 da alfa-amilase de *B. licheniformes* mostrada na SEQ ID NO: 4 da WO 2006/066594 ou variantes que possuem 90% de identidade de sequência com esta. As variantes preferidas desta alfa-amilase híbrida são aquelas que possuem uma substituição, uma deleção ou uma inserção em uma ou mais das seguintes posições: G48, T49, G107, H156, A181, N190, M197, 1201, A209 e Q264. Variantes mais preferidas da alfa-amilase híbrida que compreendem os resíduos 1-33 da alfa-amilase derivada de *B. amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO: 6 da WO 2006/066594 e resíduos 36-483 da SEQ ID NO: 4 da WO2006/066594 são aquelas que possuem as substituições:

[00123] M197T;

[00124] H 156Y+ A181T+N 190F+A209V+Q264S; ou

[00125] G48A+ T49I + G107A + H156Y+A181T+N190F+I201F+ A209V+ Q264S.

[00126] Outras amilases que são adequadas são as amilases com a SEQ ID NO: 6 no documento WO 99/019467 ou suas variantes com 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 6. As variantes preferidas da SEQ ID NO: 6 são aquelas que têm uma substituição,

uma deleção ou uma inserção em uma ou mais das seguintes posições: R181, G182, H183, G184, N195, I206, E212, E216 e K269. Amilases particularmente preferidas são aquelas que têm deleção nas posições R181 e G182 ou posições H183 e G184. As amilases adicionais que podem ser utilizadas são aquelas que possuem a SEQ ID NO: 1, a SEQ ID NO: 3, a SEQ ID NO: 2 ou a SEQ ID NO: 7 da WO 96/023873 ou suas variantes que possuem 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 7. Variantes preferidas de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 7 são aquelas que têm uma substituição, uma deleção ou uma inserção em uma ou mais das seguintes posições: 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 212, 243, 260, 269, 304 e 476. Variantes mais preferidas são aquelas que têm uma deleção nas posições 181 e 182 ou posições 183 e 184. As variantes de amilase mais preferidas de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 7 são aquelas que têm uma deleção nas posições 183 e 184 e uma substituição em uma ou mais das posições 140, 195, 206, 243, 260, 304 e 476.

[00127] Outras amilases que podem ser utilizadas são as amilases com a SEQ ID NO: 2 do WO 08/153815, SEQ ID NO: 10 do WO 01/66712 ou suas variantes com 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2 do WO 08/153815 ou 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 10 do documento WO 01/66712. Variantes preferidas da SEQ ID NO: 10 no WO 01/66712 são aquelas que têm uma substituição, uma deleção ou uma inserção em uma ou mais das seguintes posições: 176, 177, 178, 179, 190, 201, 207, 211 e 264

[00128] Outras amilases adequadas são amilases que possuem a SEQ ID NO: 2 de WO 09/061380 ou variantes que possuem 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2 da mesma. Variantes preferidas de SEQ ID NO: 2 são aquelas que têm um truncamento C terminal e/ou uma substituição, uma deleção ou uma inserção em uma

ou mais das seguintes posições: Q87, Q98, S125, N128, T131, T165, K178, R180, S181, T182, G183, M201, F202, N225, S243, N272, N282, Y305, R309, D319, Q320, Q359, K444 e G475. Variantes mais preferidas de SEQ ID NO: 2 são aquelas que possuem uma substituição em uma ou mais das seguintes posições: Q87E, R, Q98R, S125A, N128C, T131I, T165I, K178L, T182G, M201L, F202Y, N225E,R, N272E,R, S243Q, A, E, D, Y305R, R309A, Q320R, Q359E, K444E e G475K e/ou uma deleção na posição R180 e/ou S181 ou de T182 e/ou G183. As variantes de amilase mais preferidas da SEQ ID NO: 2 são aquelas que possuem as substituições.

[00129] N128C + K178L + T182G + Y305R + G475K;

[00130] N128C + K178L + T182G + F202Y + Y305R + D319T + G475K;

[00131] S125A + N 128C + K178L + T182G + Y305R + G475K; ou

[00132] S125A + N128C + T131I + T165I + K178L + T182G + Y305R + G475K em que as variantes são truncadas na terminação C e opcionalmente compreendem ainda uma substituição na posição 243 e/ou uma deleção na posição 180 e/ou na posição 181.

[00133] Outras amilases adequadas são a alfa-amilase que possui a SEQ ID NO: 12 em WO01/66712 ou uma variante que possui pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 12. Variantes de amilase preferidas são aquelas que têm uma substituição, uma deleção ou uma inserção em uma ou mais das seguintes posições da SEQ ID NO: 12 no documento WO01 66712: R28, R118, N174; R181, G182, D183, G184, G186, W189, N195, M202, Y298, N299, K302, S303, N306, R310, N314; R320, H324, E345, Y396, R400, W439, R444, N445, K446, Q449, R458, N471, N484. As amilases particularmente preferidas incluem as variantes que possuem uma deleção de D183 e G184 e que possuem as substituições R118K, N195F, R320K e R458K e uma variante que possui adicionalmente as substituições

em uma ou mais posições selecionadas do grupo: M9, G149, G182, G186, M202, T257, Y295, N299, M323, E345 e A339, mais preferida é uma variante que adicionalmente tem substituições em todas estas posições.

[00134] Outros exemplos são variantes de amilase tais como as descritas nos documentos WO201/098531, WO2013/001078 e WO2013/001087.

[00135] As amilases comercialmente disponíveis são Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™, Stainzyme™, Stainzyme Plus™, Natalase™, Liquozyme X e BAN™ (da Novozymes A/S) e Rapidase™, Purastar™/Effectenz™, Powerase e Preferenz S100 (da Genencor International Inc./DuPont).

Peroxidases/Oxidases

[00136] As peroxidases/oxidases adequadas incluem aquelas de origem vegetal, bacteriana ou fúngica. Os mutantes de proteína manipulada ou quimicamente modificados estão incluídos. Exemplos de peroxidases úteis incluem peroxidases de *Coprinus*, por exemplo, de *C. cinereus* e suas variantes como aquelas descritas em WO 93/24618, WO 95/10602 e WO 98/15257.

[00137] Peroxidases comercialmente disponíveis incluem Guardzyme™ (Novozymes A/S).

[00138] As enzimas detergentes podem ser incluídas em uma composição detergente pela adição de aditivos separados que contêm uma ou mais enzimas ou pela adição de um aditivo combinado que compreende todas estas enzimas. Um aditivo de detergente da invenção, isto é, um aditivo separado ou um aditivo combinado, pode ser formulado, por exemplo, como um granulado, líquido, emulsão, etc. As formulações de aditivo de detergente preferidas são granuladas, em particular granulados não polvilhados, líquidos, em particular líquidos estabilizados, ou emulsões.

[00139] Granulados não polvilhados podem ser produzidos, por exemplo, como descrito em US 4.106.991 e 4.661.445 e podem opcionalmente ser revestidos por métodos conhecidos na técnica. Exemplos de materiais de revestimento ceroso são produtos de poli(óxido de etileno) (polietilenoglicol, PEG) com pesos molares médios de 1000 a 20000; nonilfenóis etoxilados que possuem 16 a 50 unidades de óxido de etileno; álcoois graxos etoxilados nos quais o álcool contém de 12 a 20 átomos de carbono e nos quais existem 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 que formam filme adequados para aplicação pelas técnicas de leito fluidizado são dados em GB 1483591. Preparações enzimáticas líquidas podem, por exemplo, ser estabilizadas pela adição de um poliol tal como propilenoglicol, um açúcar ou álcool de açúcar, ïácido lático ou ácido bórico de acordo com métodos estabelecidos. Enzimas protegidas podem ser preparadas de acordo com o método descrito no EP 238.216.

[00140] Uma composição para uso em detergente sólido para lavanderia, por exemplo, pode incluir 0,000001% a 5%, tal como 0,000005% a 2%, tal como 0,00001% a 1%, tal como 0,00001% a 0,1% da proteína enzimática em peso da composição.

[00141] Uma composição para uso no líquido para lavagem de roupa, por exemplo, pode incluir 0,000001% a 3%, tal como 0,000005 a 1%, tal como 0,00001% a 0,01% da proteína enzimática em peso da composição.

[00142] Uma composição para uso em lava-louças automática, por exemplo, pode incluir 0,000001% a 5%, tal como 0,000005% a 2%, tal como 0,00001% a 1%, tal como 0,00001% a 0,1% da proteína enzimática em peso da composição.

[00143] As enzimas da composição detergente da invenção podem ser estabilizadas utilizando agentes estabilizantes convencionais, por

exemplo, um poliol tal como propilenoglicol ou glicerol, um açúcar ou álcool de açúcar, ácido láctico, ácido bórico ou um derivado de ácido bórico, por exemplo, um éster de borato aromático ou um derivado de ácido fenilborônico, tal como ácido 4-formilfenil borônico e a composição pode ser formulada como descrito, por exemplo, em WO92/19709 e WO92/19708.

[00144] Em uma modalidade, a invenção é dirigida a composições detergentes que compreendem uma enzima da presente invenção em combinação com um ou mais componentes adicionais de composição de limpeza. A escolha de componentes adicionais está dentro do conhecimento daquele versado na técnica e inclui ingredientes convencionais, que incluem os componentes exemplificadores não limitantes apresentados abaixo.

[00145] A escolha dos componentes pode incluir, para o tratamento de têxteis, a consideração do tipo de têxtil a ser limpo, o tipo e/ou grau de sujeira, a temperatura na qual a limpeza deve ocorrer e a formulação do produto detergente. Embora os componentes mencionados abaixo sejam categorizados por um título geral de acordo com uma funcionalidade particular, isto não deve ser interpretado como uma limitação, uma vez que um componente pode compreender funcionalidades adicionais, como será apreciado por aquele versado na técnica.

Tensoativos

[00146] A composição detergente pode compreender um ou mais tensoativos, que podem ser aniônicos e/ou catiônicos e/ou não iônicos e/ou semi-polares e/ou zwiteriônicos ou uma mistura destes. Em uma modalidade particular, a composição detergente inclui uma mistura de um ou mais tensoativos não iônicos e um ou mais tensoativos aniônicos. O tensoativo está tipicamente presente em um nível entre cerca de 0,1% a 60% em peso, tal como cerca de 1% a cerca de 40%, ou cerca de 3% a cerca de 20%, ou cerca de 3% a cerca de 10%. O ten-

soativo é escolhido com base na aplicação de limpeza desejada e inclui qualquer tensoativo convencional conhecido na técnica. Qualquer tensoativo conhecido na técnica para uso em detergentes pode ser utilizado.

[00147] Quando incluído, o detergente conterá normalmente entre cerca de 1% e cerca de 40% em peso, tal como entre cerca de 5% e cerca de 30%, incluindo entre cerca de 5% e cerca de 15%, ou entre cerca de 20% e cerca de 25% um tensoativo aniônico. Exemplos não limitantes de tensoativo aniônicos incluem sulfatos e sulfonatos, em particular, alquilbenzenossulfonatos lineares (LAS), isômeros de LAS, alquilbenzenossulfonatos ramificados (BABS), fenilalcanossulfonatos, alfa-olefinossulfonatos (AOS), sulfonatos de olefinas, alceno sulfonatos, alcano-2,3-diilbis(sulfatos), hidroxialcanossulfonatos e dissulfonatos, alquilsulfatos (AS) tais como dodecil sulfato de sódio (SDS), sulfatos de álcool graxo (FAS), sulfatos de álcoois primários (PAS), éter sulfatos de álcool (AES ou AEOS ou FES, também conhecidos como etoxissulfatos alcoólicos ou éter sulfatos de álcool graxo), alcanosulfonatos secundários (SAS), sulfonatos de parafina (PS), sulfonatos de éster, ésteres de glicerol de ácidos graxos sulfonados, ésteres metílicos de ácidos graxos alfa-sulfo (alfa-SFMe ou SES) incluindo éster metílico de sulfonato (MES), ácido alquil- ou alquenil-succínico, ácido dodecenil/tetradecenil succínico (DTSA), derivados de ácidos graxos de aminoácidos, diésteres e monoésteres de ácido sulfo-succínico ou sabão e suas combinações.

[00148] Quando incluído, o detergente conterá normalmente cerca de 0% a cerca de 10% em peso de um agente tensoativo catiônico. Exemplos não limitantes de agentes tensoativos catiônicos incluem alquildimetiletanolamina quaternária (ADMEAQ), brometo de cetiltrimetilamônia (CTAB), cloreto de dimetildestearilamônia (DSDMAC) e alquilbenzildimetilamônia, compostos de alquil amônio quaternário,

compostos alcoxilados de amônia quaternária (AQA) e suas combinações.

[00149] Quando incluído, o detergente conterá normalmente cerca de 0,2% a cerca de 40% em peso de um agente tensoativo não iônico, por exemplo de cerca de 0,5% a cerca de 30%, em particular de cerca de 1% a cerca de 20% % a cerca de 10%, tal como de cerca de 3% a cerca de 5%, ou de cerca de 8% a cerca de 12%. Exemplos não limitatantes de tensoativos não iônicos incluem álcool etoxilados (AE ou AEO), álcool propoxilados, álcoois graxos propoxilados (PFA), ésteres alquílicos de ácidos graxos alcoxilados, tais como ésteres alquílicos de ácidos graxos etoxilados e/ou propoxilados, etoxilatos de alquilfenol (APE), etoxilatos de nonilfenol (NPE), alquilpoliglicosídeos (APG), aminas alcoxiladas, monoetanolamidas de ácidos graxos (FAM), dietanolamidas de ácidos graxos (FADA), monoetanolamidas de ácidos graxos etoxilados (EFAM), monoetanolamidas de ácidos graxos propoxilados (PFAM), poli-hidroxi alquil amidas de ácidos graxos ou derivados N-acil N-alquil de glicosamina (glucamidas, GA ou glucamida de ácido graxo, FAGA), bem como produtos disponíveis sob os nomes comerciais SPAN e TWEEN e combinações destes.

[00150] Quando incluído, o detergente conterá normalmente cerca de 0% a cerca de 10% em peso de um agente tensoativo semi-polar. Exemplos não limitantes de tensoativos semi-polares incluem óxidos de amina (AO) tais como óxido de alquildimetilamina, óxido de *N*- (coco alquil coco)-*N,N*-dimetilamina e óxido de *N*-(sebo-alquil)-*N.N*-bis(2-hidroxietil)amina, alcanolamidas de ácido graxo e alcanolamidas de ácido graxo etoxilado, e suas combinações.

[00151] Quando incluído, o detergente conterá normalmente cerca de 0% a cerca de 10% em peso de um agente tensoativo zwiteriônico. Exemplos não limitantes de tensoativos zwitteriônicos incluem betaína, alquildimetilbetaína, sulfobetaína e suas combinações

Hidrótropos

[00152] Um hidrótropo é um composto que solubiliza compostos hidrofóbicos em soluções aquosas (ou, em oposição, substâncias polares em um ambiente não polar). Tipicamente, os hidrótropos têm ambos os caráteres hidrofílico e hidrofóbico (as chamadas propriedades anfifílicas conhecidas dos tensoativos); entretanto, a estrutura molecular dos hidrótropos geralmente não favorece a auto-agregação espontânea. Os hidrótropos não apresentam uma concentração crítica acima da qual ocorre a auto-agregação, como encontrado nos tensoativos e lipídios que formam micelas, lamelas ou outras mesofases bem definidas. Em vez disso, muitos hidrótropos mostram um processo de agregação do tipo contínuo em que os tamanhos dos agregados crescem à medida que a concentração aumenta. No entanto, muitos hidrótropos alteram o comportamento de fase, a estabilidade e as propriedades coloidais de sistemas que contêm substâncias de caráter polar e não polar, incluindo misturas de água, óleo, tensoativos e polímeros. Os hidrótropos são usados classicamente em todas as indústrias, desde farmacêutica, higiene pessoal, alimentos até aplicações técnicas. A utilização de hidrótropos em composições detergentes permite, por exemplo, formulações mais concentradas de agentes tensoativos (como no processo de compactação de detergentes líquidos através da remoção de água) sem induzir fenómenos indesejáveis, tais como separação de fases ou alta viscosidade.

[00153] O detergente pode conter 0 a 5% em peso, tal como cerca de 0,5 a cerca de 5%, ou cerca de 3% a cerca de 5%, de um hidrótropo. Qualquer hidrótropo conhecido na técnica para uso em detergentes pode ser utilizado. Exemplos não limitantes de hidrótropos incluem benzeno sulfonato de sódio, p-tolueno sulfonato de sódio (STS), xileno sulfonato de sódio (SXS), cumeno sulfonato de sódio (SCS), sulfonato cianossódico, óxidos de amina, álcoois e ésteres de poliglicol, hidro-

xinaftoato de sódio, hidroxinaftaleno de sulfonato de sódio, etil-hexil-sulfato de sódio e suas combinações.

Construtores e Coadjuvantes

[00154] A composição detergente pode conter cerca de 0 a 65% em peso, tal como cerca de 5% a cerca de 45% de um construtor ou coadjuvante de detergente ou sua mistura. Em um detergente para lavar louça, o nível de construtor é tipicamente 40 a 65%, particularmente 50 a 65%. O construtor e/ou coadjuvante podem ser particularmente um agente quelante que forma complexos solúveis em água com Ca e Mg. Qualquer construtor e/ou coadjuvante conhecido na técnica para uso em detergentes para lavanderia pode ser utilizado. Exemplos não limitantes de construtores incluem zeólitas, difosfatos (pirofosfatos), trifosfatos como trifosfato de sódio (STP ou STPP), carbonatos como carbonato de sódio, silicatos solúveis como metassilicato de sódio, silicatos em camadas (por exemplo, SKS-6 da Hoechst), etanolaminas tais como 2-aminoetan-1-ol (MEA), dietanolamina (DEA, também conhecido como iminodietanol), trietanolamina (TEA, também conhecida como 2,2',2''- nitrilotrietanol) e carboximetilinulina (CMI) e combinações dos mesmos.

[00155] A composição detergente também pode conter 0-20% em peso, tal como cerca de 5% a cerca de 10%, de um coadjuvante de detergente ou sua mistura. A composição detergente pode incluir um coadjuvante sozinho, ou em combinação com um construtor, por exemplo um construtor de zeólita. Exemplos não limitantes de coadjuvantes incluem homopolímeros de poliacrilatos ou copolímeros dos mesmos, tais como poli(ácido acrílico) (PAA) ou copolímero de (ácido acrílico/ácido maleico) (PAA/PMA). Outros exemplos não limitantes incluem citrato, quelantes tais como aminocarboxilatos, aminopolicarboxilatos e fosfonatos e ácido alquil- ou alquenil-succínico. Exemplos específicos adicionais incluem ácido 2,2',2''-nitrilotriacético (NTA), áci-

do etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), ácido iminodisuccínico (IDS), ácido etilenodiamino-*N,N*-disuccínico (EDDS), ácido metilglicinodiacético (MGDA), ácido glutâmico-ácido N,N-diacético (GLDA), ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfônico (HEDP), ácido etilenodiaminatetra-(metilenofosfônico) (EDTMPA), ácido dietilenotriaminopentacis(metilenofosfônico) (DTPMPA) ou DTMPA), ácido N-(2-hidroxietil)iminodiacético (EDG), ácido *N*-mono- acético aspártico (ASMA), ácido *N.N*-diacético aspártico (ASDA), ácido *N*-monopropiônico aspártico (ASMP), ácido iminodisuccínico (IDA), ácido *N*- (2-sulfometil) -aspártico (SMAS), ácido *N*- (2-sulfoetil)-aspártico (SEAS), ácido *N*-(2-sulfometil)-glutâmico (SMGL), ácido *N*- (2-sulfoetil)-glutâmico (SEGL), ácido *N*-metiliminodiacético (MIDA), ácido α-alanina-*N,N*-diacético (a-ALDA), ácido serina-*N,N*-diacético (SEDA), ácido isosserina-*N,N*-diacético (ISDA), ácido fenilalanina-*N,N*-diacético (PHDA), ácido antranílico-*N,N*-diacético (ANDA), ácido sulfanílico-*N,N*-diacético (SLDA), ácido taurina-*N,N*-diacético (TUDA) e ácido sulfometil-*N,N*-diacético (SMDA), *N,N',N'*-triacetato de *N*-(2-hidroxietil)-etilidenodiamina (HEDTA), dietanolglicina (DEG), dietilenotriamina ácido penta(metilenofosfônico) (DTPMP), ácido aminotris(metilenofosfônico) (ATMP), suas combinações e seus sais. Outros construtores e/ou co-adjuvantes exemplificadores são descritos, por exemplo, em WO 09/102854, US 5977053.

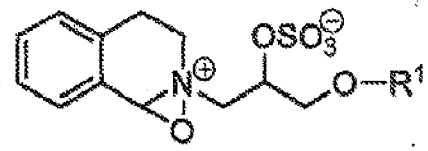
Sistemas de branqueamento

[00156] O detergente pode conter 0 a 50% em peso, tal como cerca de 0,1% a cerca de 25% de um sistema de branqueamento. Qualquer sistema de branqueamento conhecido na técnica para uso em detergentes de lavandaria pode ser utilizado. Componentes adequados do sistema de branqueamento incluem catalisadores de branqueamento, fotobranqueadores, ativadores de branqueamento, fontes de peróxido de hidrogênio tais como percarbonato de sódio e perboratos de sódio,

perácidos pré-formados e suas misturas. Perácidos pré-formados adequados incluem, mas não estão limitados a ácidos peroxicarboxílicos e sais, ácidos percarbônicos e sais, ácidos e sais perimídicos, ácidos peroximonossulfúricos e sais, por exemplo, Oxone(R), e suas misturas. Exemplos não limitantes de sistemas de branqueamento incluem sistemas de branqueamento à base de peróxido, que podem compreender, por exemplo, um sal inorgânico, incluindo sais de metais alcalinos tais como sais de sódio de perborato (geralmente mono- ou tetra-hidrato), percarbonato, persulfato, perfosfato, sais de persilicato, em combinação com um ativador de branqueamento que forma perácido. A expressão ativador de branqueamento é aqui entendida como um composto que reage com branqueador de peroxigênio como peróxido de hidrogénio para formar um perácido. O perácido assim formado constitui o alvejante ativado. Ativadores de branqueamento adequados para serem usados aqui incluem aqueles que pertencem à classe de ésteres de amidas, imidas ou anidridos. Exemplos adequados são tetracetiletileno diamina (TAED), 4-[(3,5,5-trimetilhexanoil) oxi] benzeno sulfonato de sódio (ISONOBS), ácido diperoxidodecanóico, 4-(dodecanoiloxi)benzenossulfonato (LOBS), 4-(decanoiloxi) benzenossulfonato, 4-(decanoiloxi)benzoato (DOBS), 4-(nonanoiloxi) benzenossulfonato (NOBS) e/ou aqueles descritos em WO98/17767. Uma família particular de ativadores de branqueamento de interesse foi descrita no EP624154 e, particularmente preferido nessa família é o citrato de acetiltrietila (ATC). ATC ou um triglicerídeo de cadeia curta, como a triacetina, tem a vantagem de ser ecologicamente correto, pois eventualmente se degrada em ácido cítrico e álcool. Além disso, o citrato de acetiltrietila e a triacetina têm uma boa estabilidade hidrolítica no produto após armazenamento e é um eficiente ativador do branqueamento. Finalmente, o ATC fornece uma boa capacidade de construção para o aditivo de lavanderia. Alternativamente, o sistema de branque-

amento pode compreender peroxiácidos, por exemplo, do tipo amida, imida ou sulfona. O sistema de branqueamento pode também compreender perácidos tais como ácido 6- (ftalimido)peroxi-hexanóico (PAP). O sistema de branqueamento pode também incluir um catalisador de branqueamento. Em algumas modalidades, o componente de branqueamento pode ser um catalisador orgânico selecionado do grupo que consiste em catalisadores orgânicos que possuem as seguintes fórmulas.

(i) 

(ii) 

(iii) e suas misturas; em que cada R^1 é independentemente um grupo alquilo ramificado que contém 9 a 24 carbonos ou grupo alquila linear que contém 1 a 24 carbonos, preferivelmente cada R é independentemente um grupo alquila ramificado que contém de 9 a 18 carbonos ou grupo alquila linear que contém 11 a 18 carbonos, mais preferivelmente cada R^1 é independentemente selecionado do grupo que consiste em 2-propil-heptila, 2-butiloctila, 2-pentilnonila, 2-hexildecila, n-dodecila, n-tetradecila, n-hexadecila, n-octadecila, iso-nonila, iso-decilo, iso-tridecilo e iso-pentadecilo. Outros sistemas de branqueamento exemplificadores estão descritos, por exemplo, em WO2007/087258, WO2007/087244, WO2007/087259 e WO2007/087242. Fotobranqueadores adequados podem ser, por exemplo, ftalocianina de zinco sulfonada.

Polímeros

[00157] O detergente pode conter 0 a 10% em peso, tal como 0,5 a 5%, 2 a 5%, 0,5 a 2% ou 0,2 a 1% de um polímero. Qualquer polímero conhecido na técnica para uso em detergentes pode ser utilizado. O

polímero pode funcionar como um coadjuvante como mencionado acima, ou pode fornecer antirredeposição, proteção de fibra, liberação de sujeira, inibição de transferência de corante, limpeza de graxa e/ou propriedades antiespumantes. Alguns polímeros podem ter mais de uma das propriedades acima mencionadas e/ou mais de um dos motivos mencionados abaixo. Polímeros exemplificadores incluem (carboximetil) celulose (CMC), álcool polivinílico(PVA), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli (etilenoglicol) ou poli (óxido de etileno) (PEG), poli (etilenoimina) etoxilada, carboximetilinulina (CMI) e policarboxilatos como PAA, PAA/PMA, ácido poliaspártico e copolímeros de laurilmetacrilato/ácido acrílico, CMC modificada hidrofobicamente (HM-CMC) e silicones, copolímeros de ácido tereftálico e glicóis oligoméricos, copolímeros de poli (tereftalato de etileno)) e poli (tereftalato de oxietileno) (PET-POET), PVP, poli (vinilimidazol) (PVI), *N*-óxido de poli (vinilpiridina) (PVPO ou PVPNO) e polivinilpirrolidona-vinilimidazol (PVPVI). Outros polímeros exemplificadores incluem policarboxilatos sulfonados, óxido de polietileno e óxido de polipropileno (PEO-PPO) e etoxi sulfato di-quaternário. Outros polímeros exemplificadores estão descritos, por exemplo, no documento WO 2006/130575. Sais dos polímeros acima mencionados são também contemplados.

Agentes de coloração de tecido

[00158] As composições detergentes da presente invenção podem também incluir agentes de coloração de tecido tais como corantes ou pigmentos, que quando formulados em composições detergentes podem depositar em um tecido quando o referido tecido é colocado em contato com um liquido de lavagem que compreende as referidas composições detergentes e alterando assim a coloração do dito tecido através da absorção/reflexão da luz visível. Agentes de branqueamento fluorescentes emitem pelo menos alguma luz visível. Em contraste, os agentes de coloração de tecido alteram a coloração de uma super-

fície à medida que absorvem pelo menos uma porção do espectro de luz visível. Agentes de coloração de tecido adequados incluem corantes e conjugados de corante-argila e podem também incluir pigmentos. Corantes adequados incluem corantes de moléculas pequenas e corantes poliméricos. Corantes de moléculas pequenas adequados incluem corantes de moléculas pequenas selecionadas do grupo que consiste em corantes que caem nas classificações do Colour Index (C.I) de Direct Blue, Direct Red, Direct Violet, Acid Blue, Acid Red, Acid Violet, Basic Blue, Basic Violet e Basic Red, ou suas misturas, por exemplo, como descrito em WO2005/03274, WO2005/03275, WO2005/03276 e EP1876226 (aqui incorporado por referência). A composição detergente compreende preferivelmente entre cerca de 0,00003% em peso a cerca de 0,2% em peso, de cerca de 0,00008% em peso a cerca de 0,05% em peso ou mesmo de cerca de 0,0001% em peso a cerca de 0,04% em peso do agente de coloração de tecido. A composição pode compreender de 0,0001% em peso a 0,2% em peso de agente de coloração de tecido, isto pode ser especialmente preferido quando a composição está na forma de uma bolsa de dose unitária. Agentes de coloração adequados também estão descritos em, por exemplo, WO 2007/087257 e WO2007/087243.

Materiais adjuntos

[00159] Quaisquer componentes detergentes conhecidos na técnica para utilização em detergentes para lavanderia também podem ser utilizados. Outros componentes detergentes opcionais incluem agentes anticorrosão, agentes antiencolhimento, agentes de antirredeposição de sujeira, agentes antienrugamento, bactericidas, ligantes, inibidores de corrosão, desintegrantes/agentes de desintegração, corantes, estabilizadores enzimáticos (incluindo ácido bórico, boratos, CMC e/ou polióis tais como propilenoglicol), condicionadores de tecidos incluindo argilas, cargas/auxiliares de processamento, agentes branque-

adores fluorescentes/branqueadores ópticos, reforçadores de espuma, reguladores de espuma (bolhas de sabão), perfumes, agentes de suspensão de sujeira, amaciantes, supressores de bolhas, inibidores de manchas e agentes de capilaridade, isoladamente ou em combinação. Qualquer ingrediente conhecido na técnica para uso em detergentes para lavanderia pode ser utilizado. A escolha de tais ingredientes está bem dentro da habilidade daquele versado na técnica.

[00160] Dispersantes: As composições detergentes da presente invenção também podem conter dispersantes. Em particular, os detergentes em pó podem compreender dispersantes. Materiais orgânicos solúveis em água adequados incluem os ácidos homo- ou copoliméricos ou os seus sais, nos quais o ácido policarboxílico compreende pelo menos dois radicais carboxila separados um do outro por não mais do que dois átomos de carbono. Dispersantes adequados são, por exemplo, descritos em Powdered Detergents, Surfactant science series volume 71, Marcel Dekker, Inc.

[00161] Agentes inibidores da transferência de corante: As composições detergentes da presente invenção também podem incluir um ou mais agentes inibidores da transferência de corantes. Agentes de inibição de transferência de corante poliméricos adequados incluem, mas não estão limitados a polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona e N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas e polivinilimidazóis ou suas misturas. Quando presentes em uma composição em questão, os agentes inibidores da transferência de corantes podem estar presentes em níveis entre cerca de 0,0001% a cerca de 10%, entre cerca de 0,01% a cerca de 5% ou mesmo entre cerca de 0,1% a cerca de 3% em peso da composição.

[00162] Agente de branqueamento fluorescente: As composições detergentes da presente invenção conterão também, preferivelmente,

componentes adicionais que podem tingir artigos a serem limpos, tais como agente branqueador fluorescente ou abrilhantadores ópticos. Quando presente, o branqueador está preferencialmente em um nível de cerca de 0,01% a cerca de 0,5%. Qualquer agente de branqueamento fluorescente adequado para uso em uma composição detergente de roupa pode ser utilizado na composição da presente invenção. Os agentes de branqueamento fluorescentes mais comumente utilizados são os que pertencem às classes de derivados de ácido diaminoestilbeno-sulfônico, derivados de diarilpirazolina e derivados de bis-fenil-distirila. Exemplos de derivado de ácido diaminoestilbeno-sulfônico de agentes de branqueamento fluorescentes incluem os sais de sódio de: 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-s-triazin-6-ilamina) estilbeno-2,2'- dissulfonato; 4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ilamina) estilbeno-2,2'-dissulfonato; 4,4'-bis- (2-anilino-4 (N-metil-N-2-hidroxi- etilamino)-s-triazin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-dissulfonato, 4,4'-bis - (4-fenil-2, 1, 3-triazol-2-il) estilbeno-2,2'-dissulfonato; 4,4'-bis- (2-anilino-4 (1-metil-2-hidroxi-etilamino) -s-triazin-6- ilamina)estilbeno-2,2'-dissulfonato e 2-(estilbil-4 "- nafto-1, 2',4,5) -1, 2,3-trizol-2"-sulfonato. Agentes de branqueamento fluorescente preferidos são Tinopal DMS e Tinopal CBS disponibilizados pela Ciba-Geigy AG, Basileia, Suíça. Tinopal DMS é o sal dissódico do dissulfonato de 4,4'-bis- (2-morfolino-4 anilino-s-triazin-6-ilamino) estilbeno. Tinopal CBS é o sal dissódico do 2,2'-bis-(fenil-estiril) dissulfonato. Também preferidos são os agentes de branqueamento fluorescentes é o Parawhite KX comercialmente disponível, fornecido pela Paramount Minerals and Chemicals, Mumbai, Índia. Outros fluorescentes adequados para utilização na invenção incluem as 1-3-diaril pirazolinas e as 7-alquilaminocumarinas. Níveis de branqueador fluorescente adequados incluem níveis mais baixos entre cerca de 0,01, de 0,05, entre cerca de 0,1 ou mesmo entre cerca de 0,2% em peso até níveis superiores de 0,5 ou mesmo 0,75% em peso.

[00163] Polímeros de liberação de sujeira: As composições detergentes da presente invenção podem também incluir um ou mais polímeros de liberação de sujeira que auxiliam a remoção de sujeira de tecidos tais como tecidos à base de algodão e poliéster, em particular a remoção de sujeiras hidrofóbicas de tecidos à base de poliéster. Os polímeros de liberação de sujeira podem ser, por exemplo, polímeros baseados em tereftalato não iônico ou aniônico, polivinil caprolactama e copolímeros relacionados, copolímeros de enxerto de vinila, poliamidas de poliéster, ver, por exemplo, Chapter 7 em Powdered Detergents, Surfactant science series volume 71, Marcel Dekker, Inc. Outro tipo de polímeros de liberação de sujeira são polímeros de limpeza de gorduras alcoxilados anfifílicos que compreendem uma estrutura de núcleo e uma pluralidade de grupos alcoxilados ligados a essa estrutura de núcleo. A estrutura do núcleo pode compreender uma estrutura de polialquilenimina ou uma estrutura de polialcanolamina como descrito em detalhes no WO 2009/087523 (incorporado aqui por referência). Além disso, os copolímeros de enxerto aleatórios são adequados como polímeros de liberação de sujeira. Os copolímeros de enxerto adequados estão descritos com mais detalhes no WO 2007/138054, WO 2006/108856 e WO 2006/113314 (aqui incorporados por referência). Outros polímeros de liberação de sujeira são estruturas de polissacarídeos substituídos, especialmente estruturas celulósicas substituídas, tais como derivados de celulose modificada, tais como os descritos em EP 1867808 ou WO 2003/040279 (ambos estão aqui incorporados por referência). Polímeros celulósicos adequados incluem celulose, éteres de celulose, ésteres de celulose, amidas de celulose e suas misturas. Polímeros celulósicos adequados incluem celulose modificada anionicamente, celulose modificada não ionicamente, celulose modificada cationicamente, celulose modificada zwitterionicamente, e suas misturas. Os polímeros celulósicos adequados incluem metilcelu-

lose, carboximetilcelulose, etilcelulose, hidroxiletilcelulose, hidroxilpropilmetilcelulose, éster de carboximetilcelulose e suas misturas.

[00164] Agentes antirredeposição: As composições detergentes da presente invenção podem também incluir um ou mais agentes antirredeposição tais como carboximetilcelulose (CMC), álcool polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), polioxietileno e/ou polietilenoglicol (PEG), homopolímeros de ácido acrílico, copolímeros de ácido acrílico e ácido maleico e polietilenoiminas etoxiladas. Os polímeros à base de celulose descritos em polímeros de liberação de sujeira acima também podem funcionar como agentes antirredeposição.

[00165] Outros materiais adjuvantes adequados incluem, mas não estão limitados a agentes antiencolhimento, agentes antienrugamento, bactericidas, aglutinantes, transportadores, corantes, estabilizantes enzimáticos, amaciantes de tecidos, cargas, reguladores de espuma, hidrótropos, perfumes, pigmentos, supressores de bolas, solventes e estruturantes para detergentes líquidos e/ou agentes estruturantes de elastificação.

[00166] Em uma modalidade adicional da presente invenção, a composição detergente está na forma de uma barra, um comprimido homogéneo, um comprimido com duas ou mais camadas, uma bolsa com um ou mais compartimentos, um pó regular ou compacto, um granulado, uma pasta, um gel, ou um líquido regular, compacto ou concentrado. Em uma modalidade, a composição detergente pode ser uma composição detergente para lavanderia, preferivelmente uma composição detergente para lavanderia, líquida ou sólida. Existem várias formas de formulação de detergente, tais como camadas (fases iguais ou diferentes), bolsas, bem como formas unitárias de dosagem para máquinas.

[00167] As bolsas podem ser configuradas com compartimentos únicos ou múltiplos compartimentos. Pode ser de qualquer forma, mo-

delo e material que seja adequado para conter a composição, por exemplo, sem permitir a liberação da composição da bolsa antes do contato com a água. A bolsa é feita de filme solúvel em água que inclui um volume interno. O dito volume interno pode ser dividido em compartimentos da bolsa. Filmes preferidos são materiais poliméricos, preferivelmente polímeros que são formados em um filme ou folha. Polímeros, copolímeros ou seus derivados preferidos são poliacrilatos selecionados e copolímeros de acrilato solúveis em água, metilcelulose, carboximetilcelulose, dextrina de sódio, etilcelulose, hidroxietilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, maltodextrina, polimetacrilatos, mais preferivelmente copolímeros de álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Preferivelmente, o nível de polímero no filme, por exemplo, PVA, é de pelo menos cerca de 60%. O peso molecular médio preferido será tipicamente de cerca de 20.000 a cerca de 150.000. Os filmes podem também ser de composições de mistura que compreendem misturas de polímeros hidroliticamente degradáveis e solúveis em água, tais como polilactídeo e álcool polivinílico (conhecidos sob a referência comercial M8630 como vendido por Chris Craft In. Prod. Of Gary, Ind., US) mais plastificantes como glicerol, etileno glicerol, propilenoglicol, sorbitol e suas misturas. As bolsas podem compreender uma composição sólida de detergente de lavanderia ou parte dos componentes e/ou uma composição de limpeza líquida ou parte dos componentes separados pelo filme solúvel em água. O compartimento para componentes líquidos pode ser diferente em composição do que os compartimentos que contêm sólidos. Ref. (US2009 / 0011970A1).

[00168] Os ingredientes detergentes podem ser separados fisicamente uns dos outros por compartimentos em bolsas solúveis em água ou em diferentes camadas de comprimidos. Assim, a interação negativa de armazenamento entre os componentes pode ser evitada. Diferentes perfis de dissolução de cada um dos compartimentos tam-

bém podem dar origem a uma dissolução prolongada dos componentes selecionados na solução de lavagem.

[00169] Um detergente líquido ou em gel, que não tem dose unitária, pode ser aquoso, tipicamente contendo pelo menos 20% em peso e até 95% de água, até cerca de 70% de água, até cerca de 65% de água, até cerca de 55% de água, até cerca de 45% de água, até cerca de 35% de água. Outros tipos de líquidos, incluindo sem limitação, alcanóis, aminas, dióis, éteres e polióis podem ser incluídos em um líquido ou gel aquoso. Um detergente líquido aquoso ou em gel pode conter entre 0 a 30% de solvente orgânico. Um detergente líquido ou em gel pode ser não aquoso.

[00170] As composições detergentes da presente invenção podem ser fornecidas sob a forma de barras de sabão e utilizadas para lavagem a mão de roupa, tecidos e/ou têxteis. A expressão barra de sabão de lavanderia inclui barras de lavanderia, barras de sabão, barras combinadas, barras sintéticas e barras de detergente. Os tipos de barra normalmente diferem no tipo de tensoativo que contêm, e a expressão barra de sabão para lavanderia inclui aqueles que contêm sabões de ácidos graxos e/ou sabões sintéticos. A barra de sabão para lavanderia tem uma forma física que é sólida e não líquida, gel ou um pó à temperatura ambiente. A expressão sólida é definida como uma forma física que não se altera significativamente ao longo do tempo, isto é, se um objeto sólido (por exemplo, barra de sabão para lavanderia) é colocado dentro de um recipiente, o objeto sólido se altera para encher o recipiente em que é colocado. A barra é um sólido tipicamente em forma de barra, mas pode estar em outras formas sólidas, como redonda ou oval

[00171] A barra de sabão para lavanderia pode conter uma ou mais enzimas adicionais, inibidores de protease tais como aldeídos peptídicos (ou aduto de hidrosulfito ou aduto de hemiacetal), ácido bórico,

borato, bórax e/ou derivados do ácido fenilborônico como o ácido 4-formilfenilborônico, um ou mais sabões ou tensoativos sintéticos, polióis, tais como glicerina, compostos de controle de pH, tais como ácidos graxos, ácido cítrico, ácido acético e/ou ácido fórmico e/ou um sal de um cátion monovalente e um ânion orgânico, em que o cátion monovalente pode ser, por exemplo, Na^+, K^+ ou Nh_4^+ e o ânion orgânico pode ser, por exemplo, formato, acetato, citrato ou lactato de modo que o sal de um cátion monovalente e um ânion orgânico podem ser, por exemplo, formato de sódio

[00172] A barra de sabão para lavanderia também pode conter agentes complexantes como EDTA e HEDP, perfumes e/ou diferentes tipos de cargas, tensoativos, por exemplo, tensoativos sintéticos aniônicos, construtores, agentes poliméricos de liberação de sujeira, quelantes de detergentes, agentes estabilizantes, cargas, corantes, inibidores de transferência de corantes, policarbonatos alcoxilados, supressores de espuma, agentes estruturantes, agentes lixiviantes, ativadores de branqueamento, agentes de remoção de sujeira, agentes de redeposição, agentes dispersantes poliméricos, branqueadores, amaciantes de tecidos, perfumes e/ou outros compostos conhecidos na técnica.

[00173] A barra de sabão em pó pode ser processada em equipamento de fabricação convencional de barras de sabão para roupa, tais como, mas não limitados a: misturadores, empilhadeiras, por exemplo, uma empilhadeira a vácuo de dois estágios, extrusoras, cortadores, carimbadores de logotipos, túneis de resfriamento e embalagens. A invenção não está limitada à preparação das barras de sabão para lavanderia por qualquer método único. A pré-mistura da invenção pode ser adicionada ao sabão em diferentes fases do processo. Por exemplo, a pré-mistura contendo um sabão, uma enzima, opcionalmente uma ou mais enzimas adicionais, um inibidor de protease e um sal de

um cátion monovalente e um ânion orgânico podem ser preparados e a mistura é então aglomerada. A enzima e enzimas adicionais opcionais podem ser adicionadas ao mesmo tempo que o inibidor de protease, por exemplo na forma líquida. Além da etapa de mistura e da etapa de aglomeraçãp, o processo pode ainda compreender as etapas de moagem, extrusão, corte, estampagem, resfriamento e/ou embalagem.

[00174] A presente invenção se refere, além disso, a diferentes utilizações da composição detergente como aqui descrita, tal como para degradar a manana e para utilização em um processo de lavagem.

[00175] A presente invenção se refere ainda a um método para remover uma mancha de uma superfície, compreendendo o contacto da superfície com uma composição detergente como aqui divulgada.

[00176] A presente invenção também se refere a um método para degradar a manana compreendendo a aplicação de uma composição detergente como aqui descrita a manana, de preferência em que a manana está na superfície de um têxtil. Ao degradar a manana ligada ao têxtil ou ao tecido, a sujeiro ligada à manana é liberada e não é capaz de se ligar de novo à manana ou às manchas de manana.

[00177] Em uma modalidade da presente invenção, a mananase compreendida na composição detergente da presente invenção tem uma atividade relativa de pelo menos 30% na faixa de temperatura de 45º a 65ºC. O fornecimento de mananases que retêm a atividade em temperaturas acima da temperatura ambiente e em pH ácido é vantajoso para aplicações em que a degradação da manana é necessária em tais condições.

[00178] Em uma modalidade, a mananase compreendida nas composições detergentes da presente invenção hidrolisa ligações endo-beta-1,4-manosídicas aleatoriamente.

[00179] Em uma modalidade, a mananase compreendida nas com-

posições detergentes da presente invenção é obtida ou derivada de uma fonte bacteriana.

[00180] Em uma modalidade, a mananase compreendida nas composições detergentes da presente invenção é fundida com pelo menos um outro polipeptídeo, formando assim um polipeptídeo de fusão. O polipeptídeo de fusão ou o polipeptídeo adicional pode ter outras atividades catalíticas ou de ligação em adição aquelas da mananase. Em uma modalidade, o outro polipeptídeo compreende ou consiste em um módulo de ligação a carboidrato, que é opcionalmente um fragmento de outra proteína ou enzima derivada do mesmo ou de um organismo diferente da mananase. A mananase pode ser ligada ao outro polipeptídeo com um ligante.

EXEMPLOS

[00181] Os exemplos a seguir são fornecidos para ilustrar vários aspectos da presente invenção. Eles não pretendem limitar a invenção, que é definida pelas reivindicações em anexo.

Exemplo 1: Rastreamento

[00182] Para a identificação de novas bases de dados públicas de beta-1,4-mananases (NCBI, EBI) e genomas patenteados e públicos selecionados foram rastreados. Todos os genomas patenteados e públicos utilizados neste trabalho são mostrados na Tab. 1. Todos os acertos foram agrupados e finalmente 15 genes de origem bacteriana foram selecionados para clonagem em Bacillus com base na distância filogenética entre um e outro (Tabela 2).

Tabela 1: Lista de genomas patenteados e públicos usados para o rastreamento de beta-1,4-mananases

Espécie	Cepa	Fonte
Bacillus pumilus	MS8	ABE
Amphibacillus xylanus	NBRC 15112	NCBI
Bacillus hemicellulosilyticus	JCM 9152	NCBI
Bacillus clausii	KSM-K16	NCBI
Bacillus amyloliquefaciens	RH1330	ABE
Virigibacillus soli	PL205	NCBI

Tabela 2: Lista de genes selecionados para a clonagem em Bacillus

ID Sequência	Espécie	Família GH	Comprimento
orf2511	Bacillus amyloliquefaciens	26	360 aa
AXY_08250	Amphibacillus xylanus	5	497 aa
Man7	Bacillus hemicellulosilyticus	5	490 aa
T1Z249.2	Bacillus nealsonii	5	369 aa
Man6	Bacillus clausii	5	324 aa
Q9EYQ3	Clostridium cellulolyticum	5	424 aa
YdhT	Bacillus cellulosilyticus	26	1183 aa
V5X1N9	Paenibacillus polymyxa	5	588 aa
Q9ZI87	Geobacillus stearothermoplilus	5	694 aa
Q49HI4	Bacillus circulans	5	327 aa
orf0659	Bacillus pumilus	5	376 aa
JCM152_1090	Bacillus hemicellulosilyticus	26	489 aa
D3HC62	Streptococcus gallolyticus	5	487 aa
A0LSH9	Acidothermus cellulolyticus	5	763 aa
Man14	Virgibacillus soli	5	482 aa

Exemplo 2: Clonagem de mananases bacterianas em *Bacillus*

[00183] A menos que indicado de outra maneira, os métodos de biologia molecular incluindo manipulações e transformações de DNA foram realizados como descrito em Sambrook e Russell (2001) e Harwood e Cutting (1990). Os genes *man6, man7 e man14* foram amplificados por PCR utilizando Pfx Accu Prime Polymerase (Invitrogen). PCRs foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. As seguintes condições de PCR foram utilizadas para construção dos plasmídeos de expressão: 120 seg de desnaturação inicial a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 15 seg a 94°C, 30 segundos de anelamento em uma das seguintes 50/55°C, 110/290 seg de extensão a 68°C e a extensão final a 68°C por 10 min. Para amplificação de *man7* foi usado o DNA genômico de *Bacillus hemicellulosilyticus* JCM 9152. *man6* e *man14* foram ordenados como genes sintéticos sem otimização de códon (Eurofins MWG, Alemanha). As sequências de iniciadores usados para clonagem são mostradas na Tabela 3. As protuberâncias para hibridização estão sublinhadas.

Tabela 3: Lista de iniciadores para amplificação de *man6, man7* e *man14*

Modelo	Iniciador	bp	Sequência	Seq ID No
syn. gene *man6*	Man6_1	39	CAACCGCCTCTGCAGCTTATGCACAAA ACGGATTTCACG	1
syn. gene *man6*	Man6_2	39	CGGTATATCTCTGTCTTAATCACTCTTA AGCCCATTTTC	2
gDNA *B. hemicellulosilyticus*	Man7_1	37	CAACCGCCTCTGCAGCTTCTGATGGTC ATAGCCAAAC	3
gDNA *B. hemicellulosilyticus*	Man7_2	36	CGGTATATCTCTGTCTTATTGGATTGTT ACATGATC	4
syn. Gene *man14*	Man14_1	40	CAACCGCCTCTGCAGCTGCAAGCGGG TTTTATGTAAACGG	5
syn. Gene *man14*	Man14_2	39	CGGTATATCTCTGTCTTATTTAATGGTA ACGTTATCAAC	6
pUB110 derivate	Vec_1	17	AGCTGCAGAGGCGGTTG	7
pUB110 derivate	Vec_2	21	GACAGAGATATACCGACAGTG	8

Legenda: pb= pb, derivate= derivado

[00184] Os genes foram clonados em um vetor padronizado pEV1 (Fig. 1), um derivado pUB110 que inclui o promotor PaprE de *Bacillus licheniformis* e o peptídeo de sinal de xilanase de *Bacillus amyloliquefaciens*, utilizando NEBuilder®Hifi DNA Assembly Master Mix (NEB, Frankfurt). A proporção entre vetor:inserto de 1: 3 foi aplicada para clonagem. A quantidade total de fragmentos foi de 0,2 pmol em um volume total de 20 µl. As amostras foram incubadas durante 40 min a 50°C. Para fins de construção, os plasmídeos de expressão foram transformados por competência induzida em *Bacillus subtilis* SCK6 como descrito em Zhang & Zhang 2011. As células transformadas foram plaqueadas em placas LB (Luria-Bertani) suplementadas com 10 mg/l de Canamicina. As placas foram incubadas por 20h a 37°C. Colônias que surgiram foram coletadas e o plasmídeo foi isolado usando o kit QiaPrep MiniPrep (Qiagen, Hilden). O procedimento de isolamento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante para preparações de plasmídeos Gram positivos. Os insertos foram sequenciados através do sequenciamento de Sanger (GATC, Alemanha)

e as sequências de DNA correspondentes às partes maduras das mananases Man6, Man7 e Man14 foram reveladas. As comparações de sequência foram realizadas utilizando o alinhamento de sequências ClustalW (Thompson et al. 1994). Finalmente, plasmídeos de expressão foram transformados em uma cepa apropriada de produção de *Bacillus* através de eletroporação. A cepa de produção de Bacillus foi cultivada em meio de eletroporação contendo Trypton 20 g/l, extrato de levedura 10 g/l, NaCl 10 g e sacarose 2 M e 10 mL foram coletados em uma DO(600 nm) de 0,4. As células foram lavadas com tampão de eletroporação contendo sacarose 0,272 M, $MgCl_2$ 1 mM e KH_2PO_4 7 mM e finalmente ressuspensas em 250 µl de tampão de eletroporação. Eletroporação foi realizada usando as seguintes condições: 1,2 kV, 150 Ω, 50 µF. 1 mL de meio de eletroporação foi adicionado depois e as células foram incubadas durante 3 h a 37ºC. As células foram plaqueadas em placas LB suplementadas com 20 mg/l de canamicina e incubadas durante 18 h a 37ºC. Os clones foram verificados como descrito acima e utilizados para geração de material para testes analíticos. Portanto, as cepas foram inoculadas em uma expressão padrão sob condições indutoras de proteína e incubadas por 30h a 37°C. Os sobrenadantes foram coletados e utilizados para testes analíticos e de aplicação. As características dos genes e enzimas são mostradas na Tabela 4 e 5.

Tabela 4: Sumário dos genes que codificam a mananase da família GH5 de *Bacillus clausii* KSM-K16, *Bacillus hemicellulosilyticus* JCM 9152 e *Virgibacillus soli* PL205

Gene	Comprimento incluindo SP (pb)	SEQ ID NO
man6	975	9
man7	1473	13
man14	1449	17

Tabela 5: Sumário das sequências de aminoácido deduzidas a partir das sequências de gene que codifica a mananase GH5 de *Bacillus clausii* JCM9152 e *Virgibacillus soli* PL205

Proteína Man	No. de AAs	Comprimento de SS	CBM	MW predito (Da) ss não incluído	pI predito, ss não incluído	SEQ ID NO
Man6	324	35		31,84	4,56	11
Man7	490	21	Sim	51,36	4,81	15
Man14	482	16	Sim	50,68	4,35	19

Exemplo 3: Clonagem por PCR de mananases bacterianas *man6* e *man7* em *Trichoderma reesei*

[00185] Métodos de biologia molecular padronizados foram usados no isolamento e tratamentos enzimáticos de DNA (por exemplo, isolamento de plasmídeo DNA, digestão de DNA para produzir fragmentos de DNA), em transformações em *E. coli*, sequenciamento etc. Os métodos básicos utilizados foram como descritos pelo fabricante da enzima, reagente ou kit ou como descrito no manual de biologia molecular padronizado, por exemplo, Sambrook e Russell (2001). O isolamento do DNA genômico foi realizado como descrito em detalhes por Raeder e Broda (1985).

[00186] Man6 e man7 de *Bacillus clausii e Bacillus hemicellulosilyticus*, respectivamente, também foram clonadas para expressão em Trichoderma reesei. Os genes foram clonados por PCR usando genes sintéticos com otimização de códons para *Trichoderma reesei*. As sequências de DNA que codificam os peptídeos de sinal de man6 e man7 foram removidas utilizando PCR e novos sítios de clonagem. As sequências dos iniciadores são mostradas na Tabela 6 (SEQ ID NOs: 21-24).

[00187] Comprimento (pb)

Tabela 6. Oligonucleotídeos usados como iniciadores de PCR para amplificar os genes de mananase de *Bacillus clausii e Bacillus hemicellulosilyticus*

Modelo, DNA (sintético) de	Oligonucleotídeos	Length (bp)	Sequência[a]	SEQ ID NO:
Bacillus hemicellulosilyticus	BMAN1	60	5'-AGTCAATCGCGACAAGCGCCAGACCCACTCGGGCTTCTACATCGAGGGCTCGACGCTCTA-3' (s)	21
Bacillus hemicellulosilyticus	BMAN2	46	5'-CGCGCCGGATCCTTACTGGATCGTGACGTGGTCCAGGTAGATGGCG-3' (as)	22
Bacillus clausii	BMAN3	60	5'-AGTCAATCGCGACAAGCGCCAGAACGGCTTCCACGTCTCCGGCACGGAGCTCCTGGACAA-3' (s)	23
Bacillus clausii	BMAN4	50	5'-CGCGCCGGATCCTTAGTCGCTCTTCAGGCCGTTCTCGCCGTAGACGATGCG-3' (as)	24

[a]"s" entre parênteses = fita senso, "as" = fita antissenso

[00188] Os genes foram amplificados por PCR com os iniciadores descritos na Tabela 6 e usando DNAs sintéticos como modelos nas reações. As misturas de PCR de *man6* de *Bacillus clausii* e man7 de *Bacillus hemicellulosilyticus* continham cada uma, 1x tampão HF para Phusion HF Polymerase (NEB/BioNordika, Finlândia), mistura de mMdNTP 0,2 (Thermo Fisher Scientific, Finlândia), 1 µM de cada iniciador, DMSO 3% (Thermo Fisher Scientific), 1 unidade de Phusion High Fidelity Polymerase (NEB / BioNordika, Finlândia) e 50 ng do DNA de plasmídeo correspondente. As condições para as reações de PCR foram as seguintes: 30 segundos de desnaturação inicial a 98ºC, seguida por 28 ciclos de 10 seg a 98ºC, 30 segundos de anelamento em uma das seguintes 45/50/55/60ºC, 45 segundos de extensão de segundo a 72°C e a extensão final a 72°C por 7 min.

[00189] A combinação de iniciadores descrita na Tabela 6 produziu produtos de DNA específicos com os tamanhos esperados. Os produ-

tos de PCR foram isolados do gel de agarose com o GenJet Gel Extraction KIT (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante, digeridos com as enzimas de restrição *Nru*I e *Bam*HI (Thermo Fisher Scientific) e clonados em um vetor de expressão clivado com *Nru*I e *Bam*HI. As misturas de ligação foram transformadas em *Escherichia coli* XL1- Blue (AH Diagnostics) e plaqueadas em placas LB (Luria-Bertani) contendo 50-100 mg/mL de ampicilina. Várias colônias de *E. coli* foram coletadas das placas e o DNA foi isolado com o kit GenJet Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific). Os clones positivos foram rastreados utilizando digestões de restrição. Os genes que codificam as mananases GH5 de *man6* de *Bacillus clausii* e *man7* de *Bacillus hemicellulosilyticus* sem as suas próprias sequências que codificam o peptídeo de sinal foram sequenciados e os plasmídeos foram denominados pALK4274 e pALK4273, respectivamente (Para detalhes ver Exemplo 6).

Exemplo 4: Clonagem de mananase sintética bacteriana man14

[00190] Métodos de biologia molecular padronizados foram usados no isolamento e tratamentos enzimáticos de DNA (por exemplo, isolamento de plasmídeo DNA, digestão de DNA para produzir fragmentos de DNA), em transformações em *E. coli*, sequenciamento etc. Os métodos básicos utilizados foram como descritos pelo fabricante da enzima, reagente ou kit ou como descrito no manual de biologia molecular padronizado, por exemplo, Sambrook e Russell (2001). O isolamento do DNA genômico foi realizado como descrito em detalhes por Raeder e Broda (1985).

[00191] O gene *man14* da mananase de *Virgibacillus soli* também foi clonado para expressão em Trichoderma. O gene que codifica mananase Man14 da família GH5 de *Virgibacillus soli* foi encomendado a GenScript como um construto sintético com otimização de códon para *Trichoderma reesei*.

[00192] O DNA de plasmídeo obtido de GenScript incluindo o gene *man14* foi suspenso novamente em água estéril, digerido com as enzimas de restrição *Nru*I e *Bam*HI (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante e clonado em um vetor de expressão clivado com *Nru*I e *Bam*HI. A mistura de ligação foi transformada em *Escherichia coli* XL1-Blue (AH Diagnostics) e plaqueada em placas LB (Luria-Bertani) contendo 50-100 mg/mL de ampicilina. Várias colônias de *E. coli* foram coletadas das placas e o DNA foi isolado com o kit GenJet Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific). Os clones positivos foram rastreados utilizando digestões de restrição e mostraram conter inserções de tamanhos esperados. Os sítios de fusão de *man14 de Virgibacillus soli* com o plasmídeo de expressão foram sequenciados e o plasmídeo foi denominado pALK4414 (para detalhes, ver Exemplo 6).

Exemplo 5: Produção de proteínas mananase GH5 bacteriana recombinante em *Bacillus*

[00193] Os plasmídeos de expressão foram construídos para a produção de proteínas recombinantes mananase GH5 (Man6, Man7 e Man14) de *Bacillus clausii, Bacillus hemicellulosilyticus e Virgibacillus soli*. Os plasmídeos de expressão construídos estão listados na Tabela 7. Os genes GH5 recombinantes (*man6, man7* e *man14*), sem as suas próprias sequências sinal, foram fundidos ao promotor *PaprE* de *Bacillus licheniformis* e ao peptídeo sinal da xilanase de *B. amyloliquefaciens*. A terminação da transcrição foi assegurada por um terminador forte e foi utilizado um marcador de resistência a canamicina para seleção dos transformantes. As transformações foram realizadas conforme descrito no Exemplo 2.

Tabela 7. Plasmídeos de expressão construídos para produzir proteínas recombinantes Man6, Man7 e Man14 de *Bacillus clausii, Bacillus hemicellulosilyticus e Virgibacillus soli* em uma cepa de expressão apropriada de *Bacillus.*

Proteína Mananase (GH5)	Plasmídeo de Expressão
Man6	pEV1 Man6
Man7	pEV1 Man7
Man14	pEV1 Man14

[00194] A produção de GH5 dos transformantes foi analisada a partir dos sobrenadantes das culturas do frasco de agitação. Os transformantes foram inoculados a partir das placas LB para frascos de agitação que contêm glicose 2%, milho em pó 6%, $(NH_4)_2HPO_4$ 1,3%, $MgSO_4$ 0,05% x $7H_2O$ e $CaCl_2$ 0,5%. O pH foi ajustado para pH 7,5. A produção de proteína GH5 dos transformantes foi analisada a partir de sobrenadantes de cultura depois de cultivados durante 30 horas a 37ºC, 180 rpm. A produção heteróloga de proteínas recombinantes foi analisada por SDS-PAGE com coloração subsequente com Coomassie. Os melhores transformantes produtores foram escolhidos para serem cultivados em biorreatores de escala laboratorial. Os transformantes foram cultivados em biorreatores a 37°C sob condições de indução de proteína e alimentação adicional até que um rendimento adequado foi atingido. Os sobrenadantes foram recuperados para testes de aplicação por centrifugação ou filtração.

Exemplo 6: Produção de proteínas mananase GH5 bacterianas recombinantes em *Trichoderma reesei*

[00195] Os plasmídeos de expressão foram construídos para a produção de proteínas mananase GH5 recombinantes (Man6, Man7 e Man14) de *Bacillus clausii, Bacillus hemicellulosilyticus e Virgibacillus soli* (Ver Exemplos 3 e 4) em *Trichoderma reesei*. Os plasmídeos de expressão construídos estão listados na Tabela 8. Os genes GH5 recombinantes (*man6, man7 e man14*), sem as suas próprias sequên-

cias sinal, foram fundidos com o promotor *cel7A/cbh1* de *T. reesei* com transportador e ligante *cel6A/cbh2* CBM de *T. reesei* seguido pelo sítio de reconhecimento de protease Kex2. A terminação da transcrição foi assegurada pelo terminador de *cel7A/cbh1* de *T. reesei* e o gene marcador *amdS* de *A. nidulans* foi utilizado para seleção dos transformantes, como descrito em Paloheimo ef al. (2003). Os cassetes de expressão linear (Fig. 2) foram isolados a partir dos arcabouços do vetor após as digestões de *Not*I e foram transformados em protoplastos de *T. reesei*. As cepas hospedeiras utilizadas não produzem nenhuma das quatro principais celulases de *T. reesei* (CBHI, CBHII, EGI, EGII). As transformações foram realizadas como em Penttila ef al. (1987) com as modificações descritas em Karhunen ef al. (1993), selecionando acetamidase como única fonte de nitrogênio (gene marcador *amd*S). Os transformantes foram purificados em placas de seleção através de conídios únicos antes de serem esporulados em PD

Tabela 8. Cassetes de expressão construídos para produzir proteínas recombinantes Man6, Man7 e Man14 de *Bacillus clausii, Bacillus hemicellulosilyticus e Virgibacillus soli* em *Trichoderma reesei.* A estrutura global dos cassetes de expressão era como descrita na Gig. 2.

Proteína Mananase (GH5)	Plasmídeo de Expressão	Cassete de Expressão (a
Man6	pALK4274	7,0 kb *Not*I
Man7	pALK4273	7,5 kb *Not*I
Man14	pALK4414	7,6 kb *Not*I

(a O cassete de expressão para a transformação de *T. reesei* foi isolado a partir do arcabouço do vetor pelo uso da digestão com *Not*I.

[00196] A produção de mananase dos transformantes foi analisada a partir dos sobrenadantes das culturas dos frascos de agitação. Os transformantes foram inoculados a partir de PD inclinado para frascos de agitação contendo 50 ml de meio complexo indutor de celulase baseado em lactose (Joutsjoki et al. 1993) tamponado com KH_2PO_4 5%. A produção de proteína GH5 dos transformantes foi analisada a partir de sobrenadantes de cultura depois da cultura durante 7 dias a 30ºC,

250 rpm. A produção heteróloga de proteínas recombinantes foi analisada por SDS-PAGE com coloração subsequente com Coomassie. Os melhores transformantes produtores foram escolhidos para serem cultivados em biorreatores de escala laboratorial. Os transformantes foram cultivados em biorreatores em lote ou por meio de um tipo de processo adicional de alimentação sob condições indutoras de proteína em uma temperatura típica de cultura fúngica mesofílica e condições ligeiramente ácidasA cultura foi continuada até a depleção dos açúcares do meio ou até um rendimento adequado ser atingido. Os sobrenadantes foram recuperados para testes de aplicação por centrifugação ou por filtração.

Exemplo 7. Ensaio de atividade de galactomananase pelo método DNS

[00197] A atividade de mananase (MNU) foi medida como a liberação de açúcares redutores de galactomanana (0,3% p/p) a 50ºC e pH 7,0 em 5 min. A quantidade de carboidratos redutores liberados foi determinada por espectrofotometria utilizando ácido dinitrossalicílico. O substrato (0,3% p/p) utilizado no ensaio foi preparado como se segue: 0,6 g de goma de alfarroba (Sigma G-0753) em tampão citrato de sódio 50 mM pH 7 (ou tampão citrato fosfato pH 7) a cerca de 80°C utilizando um agitador magnético de aquecimento e foi aquecido até ao ponto de ebulição. A solução foi resfriada e deixada a dissolver durante a noite em uma sala fria (2 - 8°C) com agitação contínua e os resíduos insolúveis foram removidos por centrifugação. Depois disso, a solução foi preenchida com até 200 ml com tampão. O substrato foi armazenado congelado e fundido por aquecimento num banho de água fervente a cerca de 80°C, resfriado até à temperatura ambiente e misturado cuidadosamente antes da utilização. O reagente de DNS utilizado no ensaio foi preparado pela dissolução de 50 g de ácido 3,5-dinitrosalisílico (Sigma D-550) em cerca de 4 litros de água. Com agi-

tação magnética contínua, 80,0 g de NaOH foram gradualmente adicionadas e deixadas dissolver. Uma quantidade de 1500 g de Sal de Rochelle (tartarato de K-Na, Merck 8087) foi adicionada em pequenas porções com agitação contínua. A solução que foi cuidadosamente aquecida em uma temperatura máxima de 45°C, foi resfriada até à temperatura ambiente e completada até 5000 ml. Depois disso, foi filtrada através de papel filtro Whatman 1 e armazenado em um frasco escuro em temperatura ambiente. A reação começou com a adição de 1,8 ml de solução de substrato a cada um dos dois tubos de ensaio e foi deixada equilibrar a 50°C durante 5 minutos, após o que foram adicionados 200 µl de solução enzimática adequadamente diluída a um dos tubos, bem misturada com misturador centrífugo e incubada exatamente durante 5 min a 50°C. Os espaços em branco da enzima não precisaram ser equilibrados ou incubados. A reação foi paralisada pela adição de 3,0 mL de reagente de DNS a ambos os tubos e misturação. 200 µl de solução de amostra foram adicionados aos tubos em branco da enzima. Ambos os tubos foram colocados em um banho de água fervente. Depois de ferver por exatamente 5 minutos, os tubos foram colocados em um banho de água de resfriamento e deixados esfriar até a temperatura ambiente. A absorbância da amostra foi medida contra o branco da enzima a 540 nm e a atividade foi lida a partir da curva de calibração e multiplicada pelo fator de diluição. Uma amostra diluída adequada produziu uma diferença de absorbância de 0,15-0,4. A curva padronizada foi preparada a partir de uma solução estoque 20 mM de manose pela dissolução de 360 mg de manose (SigmaM-6020, armazenada em um dessecador) em tampão de ensaio e diluída para soluções contendo 3, 6, 10 e 14 µmol/mg de manose. Os padrões foram manipulados como as amostras, exceto pela incubação a 50°C. As absorbâncias foram medidas contra o branco do reagente (contendo tampão em vez da diluição padrão de manose) a 540 nm. A curva

de calibração foi construída para cada série de ensaios. Uma unidade de mananase (MNU) foi definida como a quantidade de enzima que produz carboidratos redutores que têm uma potência redutora correspondente a um nmol de manose de galactomanana em um segundo sob as condições de ensaio (1 MNU = 1 nkat).

Exemplo 8. Purificação da Mananase Man6

[00198] As células e os sólidos foram removidos do meio de cultura de fermentação por centrifugação durante 10 min, 4000 g a 4°C. O sobrenadante de 10 ml foi utilizado para purificação de proteína. A amostra foi filtrada através de membrana PVDF de 0,44 µm (Millex-HV, Merck Millipore Ltd, Carrigtwohill, IRL). O filtrado foi carregado em uma coluna de Dessalinização HiPrep 26/10 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) equilibrada em HEPES 20 mM em pH 7. A amostra dessalinizada foi então carregada em uma coluna HiTrap Q HP de 5 ml (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) pré-equilibrada com HEPES 20 mM em pH 7. Após o carregamento da amostra, a coluna foi lavada com o mesmo tampão para 20 ml. As proteínas foram eluídas com gradiente linear de sal HEPES 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7 em 15 CVs. Frações de 5 ml foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE. As frações contendo a proteína alvo foram combinadas e concentradas para 2 ml utilizando dispositivos de ultrafiltração Vivaspin 20, 10 kDa MWCO (GE Healthcare). A amostra concentrada foi adicionalmente fracionada utilizando uma coluna de filtração em gel Superdex 75 26/60 equilibrada com MES 20 mM, NaCl 200 mM pH 6,5. Foram coletadas frações de 2 ml e analisadas por SDS-PAGE. As frações contendo mananase pura foram combinadas. Outras mananases foram purificadas usando o mesmo protocolo, mas alterando a composição do tampão nas etapas de dessalinização e troca iônica. As composições de tampão são mostradas na Tabela 9.

Tabela 9. Tampões usados na cromatografia de troca de íon

Mananase	Tampões usados na cromatografia de troca de íon
Man6	HEPES 20 mM pH 7
Man 7	HEPES 20 mM pH 7
Man14	HEPES 20 mM pH 6

[00199] As amostras purificadas eram mais do que 95% puras.

[00200] O conteúdo enzimático da amostra purificada foi determinado utilizando medições de absorbância UV a 280 nm. Os coeficientes de excitação para cada mananase foram calculados com base na sequência de aminoácidos da enzima usando o ExPASy Server http://web.expasy.org/protparam/. (Gasteiger E et al 2005). A atividade enzimática (MNU) das amostras purificadas foi medida como a liberação de acúcares redutores como descrito no Exemplo 7. A atividade específica (MNU/mg) de mananases foi calculada dividindo a atividade de MNU da amostra purificada com a quantidade de enzima purificada. Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo das dosagens enzimáticas usadas nos Exemplos 10 e 11.

Perfis de pH das mananases

[00201] Os perfis de pH das mananases purificadas foram determinados utilizando o ensaio do comprimido de beta-manazima galactomanana de alfarroba reticulada com Azurina (T-MNZ 11/14) de Megazyme com pequenas modificações do protocolo sugerido. A linearidade do ensaio foi verificada com cada enzima purificada. O ensaio foi realizado em tampão Britton-Robinson 40 mM ajustado para valores de pH entre 4 e 11. A solução de enzima foi diluída no tampão de ensaio e 500 µl da solução de enzima foi equilibrada em banho-maria a 50°C durante 5 min antes da adição de um comprimido de substrato. Após 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 10 ml de Tris 2% pH 12. Os tubos de reação foram deixados em temperatura ambiente durante 5 min, agitados e o líquido foi filtrado através de um filtro de papel Whatman No.1. A liberação de corante azul do substrato foi

quantificada medindo a absorbância a 595 nm. A atividade enzimática em cada pH foi relatada como atividade relativa, onde a atividade no pH ótimo foi ajustada para 100%. Os perfis de pH foram mostrados na Figura 3.

[00202] A atividade relativa (%) da mananase é calculada dividindo a atividade de mananase de uma amostra pela atividade de mananase de uma amostra de referência. No caso do perfil de pH, a amostra de referência é uma amostra no pH ótimo. No caso do perfil de temperatura, a amostra de referência é uma amostra em temperatura ideal.

Perfis de temperatura das mananases

[00203] A temperatura ótima das mananases purificadas foi determinada utilizando o ensaio do comprimido de beta-manazima galactomanana de alfarroba reticulada com Azurina (T-MNZ 11/14) de Megazyme com pequenas modificações ao protocolo sugerido. O ensaio foi realizado a temperaturas que variaram entre 30-90°C durante 10 minutos em tampão Britton-Robinson 40 mM pH7. A atividade enzimática foi relatada como atividade relativa onde a atividade na temperatura ótima foi ajustada para 100%. Os perfis de temperatura foram mostrados na Figura 4.

Características de temperatura e pH das mananases

[00204] Man6 tem uma massa molecular entre 30 e 35 kDa. A temperatura ótima da enzima em pH 7 é de 50°C a 70°C. A referida enzima tem pH ótimo na faixa de pH de pelo menos pH 6 a pH 9 a 50°C. A temperatura ótima e o pH ótimo foram determinados utilizando um tempo de reação de 10 minutos e galactomanana de alfarroba reticulada com Azurina como substrato.

[00205] Man7 tem uma massa molecular entre 50-55 kDa. A temperatura ótima da enzima a pH 7 é de 50°C a 70°C. A dita enzima tem pH ótimo na faixa de pH de pelo menos pH 7 a pH 10 a 50°C. A temperatura ótima e o pH ótimo foram determinados utilizando um tempo

de reação de 10 minutos e galactomanana de alfarroba reticulada com Azurina como substrato.

[00206] Man14 tem uma massa molecular entre 30 e 40 kDa. A temperatura ótima da enzima a pH 7 é de 50°C a 70°C. A dita enzima tem pH ótimo na faixa de pH de pelo menos pH 7 a pH 8 a 50°C. A temperatura ótima e o pH ótimo foram determinados utilizando um tempo de reação de 10 minutos e galactomanana de alfarroba reticulada com Azurina como substrato.

Exemplo 9. Desempenho na remoção de manchas das mananases Man6 e Man7 com detergentes comerciais sem agentes alvejantes.

[00207] Mananases Man6 e Man7 produzidas em *Bacillus* (como descrito no Exemplo 5) e em *Trichoderma* (como descrito no Exemplo 6), foram testadas quanto à sua capacidade de remover manchas padronizadas sensíveis à mananase a 40°C e dureza da água de 16° dH com detergentes comerciais sem agentes alvejantes e comparadas com a preparação comercial de mananase Mannaway® 4,0 L (Novozymes). Foram utilizados os seguintes tecidos de teste artificialmente manchados da Center for testmaterial B.V. (Países Baixos): Pudim de chocolate sensível a mananase em algodão (E-165), goma de alfarroba, com pigmento em algodão (CS-73) e poliéster/algodão (PC-S-73) e goma guar com negro de fumo em algodão (CS-43). O tecido foi cortado em amostras de 6 cm x 6 cm e foram utilizados 2 pedaços de cada um no teste.

[00208] Um detergente líquido comercial para limpeza pesada contendo todas as outras enzimas, exceto a mananase, foi usado em uma concentração de 4,4 g por litro de líquido de lavagem e foi utilizado detergente em pó Commercial Color sem enzimas em 3,8 g/l. O detergente contendo o líquido de lavagem, nós preparamos em água de torneira sintética com dureza de 16° dH. Protease Savinase® 16 L (0,5% p/p) e amilase Stainzyme® 12 L (0,4% p/p) foram adicionados a

água dura utilizada com o detergente em pó Commercial Color, o detergente líquido já continha amilase e protease. O pH do líquido de lavagem do detergente em pó Color era de aproximadamente 10 e com o detergente líquido de aproximadamente 8,3.

[00209] Dosagens de mananase estavam na faixa entre 0 - 0,2/ 0,25% em peso do detergente, mas para a avaliação as dosagens foram calculadas como unidades de atividade enzimática (MNU) por ml de líquido de lavagem ou como mg de proteína enzimática ativa (AEP) por l de licor de lavagem. A atividade foi medida como descrito no Exemplo 7. O conteúdo de AEP de cada preparação foi calculado dividindo a atividade da enzima com atividade específica, definida no Exemplo 8. A amostra controle continha a solução de detergente, mas não a mananase.

[00210] Para água de torneira sintética com dureza de 16° dH, as seguintes soluções estoque foram preparadas em água desionizada (Milli-Q ou equivalente):

Solução estoque com dureza de cálcio de 1000° d: $CaCl_2$ x 2 H_2O (1.02382.1000, Merck KGaA, Alemanha) 26,22 g/l

Solução estoque com dureza de magnésio de 200° d: $MgSO_4$ x 7 H_2O (1 .05886.1000, Merck KGaA, Alemanha) 8,79 g/l H2O

Solução estoque de NaHC03: NaHC03 (1.06329.1000 Merck KGaA, Alemanha) 29,6 g/l

[00211] 13,3 ml de solução de $CaCl_2$, 13,3 ml de solução de $MgSO_4$ e 10,0 ml de solução de $NaHCO_3$ feita recentemente foram adicionados a um balão volumétrico na ordem indicada, preparados até 1 litro com água deionizada e misturados. A dureza da água foi determinada por titulação complexométrica e encontrada correta.

[00212] Os tratamentos de remoção de manchas foram realizados no Atlas LP-2 Launder-Ometer da seguinte forma. Launder- Ometer foi primeiro pré-aquecido a 40°C. Em seguida, detergente, 250 ml de

água de torneira sintética com dureza de 16° dH e enzima diluída (<1,0 ml) foram adicionados em recipientes de 1,2 litros. As manchas foram adicionadas e o Launder-Ometer foi corrido a 40°C durante 60 min com uma velocidade de rotação de 42 rpm. Depois disso, as amostras foram cuidadosamente lavadas em água corrente e secas durante a noite no ar interno, em uma grade protegida contra a luz do dia. O efeito de remoção de manchas foi avaliado medindo a cor como valores de reflectância com o espectrofotômetro Konica Minolta CM-3610A utilizando coordenadas de espaço de cor L*a*b* (iluminante D65/10º, 420 nm de ponto de corte). O desvanecimento das manchas, indicando o desempenho da mananase (eficiência de remoção de manchas) foi calculado como ΔL* (delta L*), o que significa um valor de luminosidade L* do tecido tratado com enzima menos o valor de luminosidade L* do tecido tratado com líquido de lavagem sem mananase (controle). Os resultados finais (efeito total de remoção de manchas) foram mostrados como a soma de ΔL* de cada mancha. Os valores de cor de cada mancha foram, em média, de duas amostras. Os resultados obtidos com detergente líquido comercial são mostrados nas Figs. 6-7. As mananases de acordo com a invenção têm desempenho de remoção de mancha semelhante (Man6) ou consideravelmente melhor (Man7) com detergente líquido quando dosado como unidades de atividade ou como proteína enzimática ativa comparada à preparação de mananase comercial Mannaway® 4,0 L. Desempenho semelhante foi obtido com Man6 e Man7 independentemente do hospedeiro de expressão, Bacillus ou *Trichoderma* (Fig. 6). Os resultados obtidos com o detergente em pó comercial Color (Figs. 8-9) mostram que as mananases de acordo com a invenção têm melhor desempenho na remoção de manchas com detergente em pó quando dosado como unidades de atividade ou como proteína enzimática ativa comparada à preparação comercial de mananase Mannaway® 4 0 L.

[00213] Exemplo 10: Desempenho na remoção de manchas das mananases Man6 e Man7 com detergente contendo alvejante

[00214] Mananases Man6 e Man7 produzidas em *Bacillus* (como descrito no Exemplo 5), foram testadas quanto à sua capacidade de remover manchas padronizadas sensíveis à mananase a 40°C e dureza da água de 16° dH com detergente em pó comercial com alvejante e comparadas com a preparação comercial de mananase Mannaway® 4,0 L (Novozymes). O sistema de teste foi semelhante ao descrito no Exemplo 9, exceto que foram usados 3 tecidos de teste diferentes artificialmente sujos da Center for testmaterial BV (Holanda): Pudim de chocolate sensível a mananase em algodão (E-165), goma de alfarroba, com pigmento em algodão (CS-73) e goma guar com negro de fumo em algodão (CS-43). Foi usado um detergente em pó Commercial Color em uma concentração de 4,2 g por litro de líquido de lavagem e o pH do líquido de lavagem er de aproximadamente 9,5. Protease Savinase® 16 L (0,5% p/p) e amilase Stainzyme® 12 L (0,4% p/p) foram adicionadas à água dura utilizada no teste, uma vez que o detergente não continha enzimas. A cor das amostras após o tratamento foi medida e os resultados foram calculados como a soma de ΔL^* de cada 3 manchas, como descrito no Exemplo 9. Os resultados (Fig. 10) obtidos com detergente comercial contendo alvejante indicam que a mananase de acordo com a invenção (Man7) tem um desempenho de remoção de mancha consideravelmente melhor comparado à mananase comercial Mannaway® 4,0 L quando dosada como proteína enzimática ativa. Com Man6, é obtido um desempenho pelo menos semelhante em comparação com uma mananase bacteriana comercial.

<u>Exemplo 11: Desempenho na remoção de manchas da mananase Man14 com detergente líquido comercial</u>

[00215] A mananase Man14 produzida em *Bacillus* (tal como descrito no Exemplo 5) foi testada quanto à sua capacidade de remover

manchas padrão sensíveis à mananase a 40°C e dureza da água de 16° dH com detergente líquido comercial para limpeza pesada B e comparada com a preparação de mananase comercial Mannaway® 4,0 L (Novozymes). O sistema de teste foi semelhante ao descrito no Exemplo 9, com exceção de que foram usados dois tecidos de teste diferentes artificialmente sujos da Center for testmaterial BV (Holanda): Pudim de chocolate sensível a mananase em algodão (E-165) e goma de alfarroba, com pigmento de algodão (CS-73). Foi usado um detergente líquido comercial para limpeza pesada B na concentração de 5 g por litro de líquido de lavagem e o pH do líquido de lavagem era de aproximadamente 8,3. Protease Savinase® 16 L (0,5% p/p) e amilase Stainzyme® 12 L (0,4% p/p) foram adicionadas à água dura utilizada no teste, uma vez que o detergente não continha enzimas. A cor das amostras após o tratamento foi medida e os resultados foram calculados como a soma de ΔL* de cada 2 manchas, como descrito no Exemplo 9. Os resultados (Figs. 11 - 12) obtidos com líquido comercial contendo detergente indicam que Man 14 apresentou bom desempenho em detergente líquido, comparável ao produto comercial, quando dosado como unidades de atividade ou como proteína enzimática ativa.

Exemplo 12: Estabilidade das mananases Man6 e Man7 em detergentes líquidos comerciais

[00216] A estabilidade das preparações de mananase Man6 e Man7 produzidas em *Bacillus* foi testada em OMO Color líquido obtido em supermercado local e comparada a preparações comerciais de mananase Mannaway® 4,0 L. Preparações de mananase foram adicionadas 0,5% p/p em detergentes e as amostras foram incubadas em tubos de plástico com tampas a 37°C durante 5 semanas. A atividade foi medida em intervalos determinados pelo ensaio de atividade descrito no Exemplo 7, exceto que foi utilizado um tempo de incubação de

30 min. Os resultados foram calculados como atividade residual (%), que foi obtida pela divisão da atividade de uma amostra tomada em certo ponto de tempo pela atividade inicial da amostra. A estabilidade de Man7 produzida tanto em *Bacillus* como em *Trichoderma* e Man6 produzidos em *Trichoderma* foi testada contra Mannaway® 4,0 L também no detergente líquido comercial para limpeza pesada A que contém protease mas sem mananase. Neste teste foram utilizados 1% (p/p) de mananases e amostras incubadas a 37°C durante 12 semanas. Os resultados em Omo Color (Fig. 13) mostram que Man6 tinha estabilidade consideravelmente melhor e Man7 tinha estabilidade similar em comparação com Mannaway® 4,0 L. Man7 e especialmente Man6 eram mais estáveis que Mannaway® 4,0 L com outro detergente líquido comercial A, como mostrado na Fig 14.

[00217] Os resultados obtidos em outro teste nas mesmas condições mostraram que Man6 tinha estabilidade semelhante, independentemente do hospedeiro de expressão, *Bacillus ou Trichoderma* (dados não mostrados). Os resultados das experiências de estabilidade mostram que a mananase de acordo com a invenção é estável em detergentes durante várias semanas, mesmo quando armazenada em alta temperatura como 37°C. A estabilidade das mananases de acordo com a invenção (Man6 e Man7) é melhorada em comparação com uma mananase bacteriana comercial em detergente líquido.

[00218] Exemplo 13: Desempenho de lavagem de composições detergentes líquidas de acordo com a invenção

[00219] O desempenho de lavagem das composições detergentes líquidas de acordo com a presente invenção foi determinado utilizando manchas padronizadas obteníveis de CFT (Center for Testmaterials) BV, Vlaardingen, Holanda ("CFT"), Eidgenössische Material und Prufanstalt Testmaterialien AG [Federal Materials and testing agency, Testmaterials], St. Gallen, Suíça ("EMPA") e Warwick Equest Ltd Unit 55,

Consett Business Park, Consett, County Durham ("Equest").

[00220] Um agente de lavagem líquido com a seguinte composição foi usado como base para a formulação (todos os valores em percentagem em peso):

Nome químico	Matéria-prima da substância ativa [%]	Formulação detergente da substância ativa [%]
Água desmineralizada	100	Rest
Ácido alquil benzeno sulfônico	96	2 - 7
Tensoativos aniônicos	70	6-10
Sal de sódio de ácido graxo C12-C18	30	1-4
Tensoativos não iônicos	100	4-7
Fosfonatos	40	0,1-2
Ácido cítrico	100	1-3
NaOH	50	1-4
Ácido borônico	100	0,1-2
Agente antiespumante	100	0,01-1
Glicerol	100	1-3
Enzimas	100	0,1-2
Agente conservante	100	0,05-1
Etanol	93	0,5-2
Abrilhantador óptico	90	0,01-1
Perfume	100	0,1-1
Corante	100	0,001-0,1

O pH da composição detergente estava entre 8,2 a 8,6.

[00221] Com base nessa formulação, as composições detergentes líquidas 1 e 2 foram preparadas pela adição das respectivas enzimas como indicado abaixo:

[00222] Composição 1: Enzima de acordo com a SEQ ID NO: 12 (Man6)

[00223] Composição 2: Enzima de acordo com a SEQ ID NO: 16 (Man7)

[00224] A lavagem foi realizada da seguinte forma, de acordo com o método AISE: 3,5 kg de pano de lastro limpo, 4 tecidos SBL, máquina de lavar roupa Miele, 20°C e 40°C Programa curto.

[00225] Todas as mananases foram adicionadas nas mesmas quantidades com base na quantidade total de proteína.

[00226] A proporção de dosagem do agente de lavagem líquido foi de 4,0 gramas por litro de líquido de lavagem. O procedimento de lavagem foi realizado durante 60 minutos a uma temperatura de 20°C e 40°C, tendo a água uma dureza da água entre 15,5 e 16,5° (graus

alemães de dureza).

[00227] Os resultados obtidos são os valores de diferença entre as unidades de remissão obtidas com os detergentes e as unidades de remissão obtidas com o detergente contendo a mananase de referência comercialmente disponível (Mannaway 4.0L, obtida da Novozymes). Um valor positivo indica, portanto, um desempenho de lavagem melhorado das composições detergentes que compreende as mananases da presente invenção em comparação com a mesma composição detergente que compreende a mananase de referência. Dentro do teste de lavagem, uma grande variedade de manchas foi testada.

[00228] A brancura, isto é, o branqueamento das manchas, foi determinada fotometricamente como uma indicação do desempenho da lavagem. Foi utilizado um espectrômetro Minolta CM508d, que foi calibrado previamente usando um padrão branco fornecido com a unidade.

[00229] Os resultados obtidos são os valores de diferença entre as unidades de remissão obtidas com os detergentes e as unidades de remissão obtidas com o detergente contendo as combinações enzimáticas. Um valor positivo indica, portanto, um melhor desempenho de lavagem devido às combinações de enzimas presentes no detergente. As mananases da invenção em composições detergentes mostram um desempenho melhorado em uma variedade de manchas que compreendem manana.

	20ºC		40ºC	
Mancha	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 1	Comp. 2
Sorvete de Chocolate (Equest)	1,3	4,2	n.d.	n.d.
Sorvete de chocolate Carte Dór (Equest)	n.d.	3,3	n.d.	0,7
Cacau [CO] (Equest)	n.d.	2,3	n.d.	n.d.
Maionese/cor negro de fumo (CFT CS05S [CO])	1,3	4,3	1,1	2,2
Molho de salada, com preto natural (CFT CS06 [CO]	1,2	3,5	1,2	2,6
Batom, diluído, vermelho (CFT CS216 [CO])	n.d.	1,5	n.d.	0,7

Exemplo 14: Desempenho de lavagem das composições detergentes em pó de acordo com a invenção

[00230] O desempenho de lavagem das composições detergentes em pó de acordo com a presente invenção foi determinado utilizando corantes padronizados obtidos a partir de CFT (Center for Testmaterials) BV, Vlaardingen, Holanda ("CFT"), Eidgenossische Material- und Prufanstalt Testmaterialien AG [Federal Materials and testing agency, Testmaterials], St. Gallen, Suíça ("EMPA") Warwick Equest Ltd Unidade 55, Consett Business Park, Consett, County of Durham ("Equest").

[00231] Um agente de lavagem sólido com a seguinte composição foi usado como formulação de base (todos os valores em percentagem em peso):

Nome químico	Matéria-prima da substância ativa [%]	Formulação detergente da substância ativa [%]
Água desmineralizada	100	1-4
Ácido alquil benzeno sulfônico	97	9-13
Tensoativos não iônicos	100	4-7
Percarbonatos	88	9-13
TAED	92	1-5
Fosfonatos	60	0,1-3
Poliacrilatos	45	1-4
Silicato de sódio	40	5-10
Carbonato de sódio	100	18-22
Carboximetilcelulose	69	1-4
Polímero de liberação de sujeira	100	0,1-1
Abrilhantador óptico	70	0,1-1
Agente antiespumante	t.q.	0,01-1
Sulfato de sódio	100	22-30
Perfume	100	0,1-1
MaOH	100	0,1-1
Rest	*	1-4

[00232] Com base nessa formulação, as composições detergentes sólidas 3 e 4 foram preparadas pela adição das respectivas enzimas como indicado abaixo:

[00233] Composição 3: Enzima de acordo com a SEQ ID NO: 12 (Man6)

[00234] Composição 4: Enzima de acordo com a SEQ ID NO: 16 (Man7)

[00235] A lavagem foi realizada da seguinte forma, de acordo com o método AISE: 3,5 kg de tecido de lastro limpo, 4 tecidos SBL, máquina de lavar roupa Miele, 20°C e 40°C Programa curto. Todas as manana-

ses foram adicionadas nas quantidades iguais com base no conteúdo total de proteína.

[00236] A proporção de dosagem do agente de lavagem em pó foi de 3,8 gramas por litro de líquido de lavagem. O procedimento de lavagem foi realizado durante 60 minutos em uma temperatura de 20°C e 40°C, tendo a água uma dureza da água entre 15,5 e 16,5° (graus alemães de dureza).

[00237] A brancura, isto é, o branqueamento das manchas, foi determinada fotometricamente como uma indicação do desempenho da lavagem. Foi utilizado um dispositivo espectrofotométrico Minolta CM508d, que foi calibrado previamente usando um padrão branco fornecido com a unidade.

[00238] Os resultados obtidos são os valores de diferença entre as unidades de remissão obtidas com os detergentes e as unidades de remissão obtidas com o detergente contendo a mananase de referência (Mannaway 4.0L, obtida da Novozymes). Um valor positivo indica, portanto, um melhor desempenho de lavagem das variantes no detergente. As mananases da invenção mostram um melhor desempenho em várias manchas. Portanto, é evidente que as mananases de acordo com a invenção apresentam um desempenho de lavagem melhorado em comparação com Mannaway.

	20ºC		40ºC	
Mancha	Comp. 3	Comp. 4	Comp. 3	Comp. 4
Sorvete de chocolate Carte Dór (Equest)	1,4	2,8	2,1	0,5
Vienetta (Equest)	0,5	0,8	0,5	n.d.
Sorvete de chocoçate L [CO] (Equest)	0,9	0,9	1,1	n.d.
Mingau (EMPA 163 [CO])	n.d.	n.d.	1,3	5,1
Cacau (CFT CS02 [CO])	1,8	3,1	n.d.	n.d.
Maionese/cor negro de fumo (CFT CS05S [CO])	n.d.	1,0	n.d.	2,7
Molho de salada, com preto natural (CFT CS32 [CO])	2,0	4,8	1,3	5,1
Sebo BEY com negro de fumo (CFT CS32 [CO])	0,7	1,4	0,5	0,7
Bebida de chocolate, pura (CFT CS44 [CO])	n.d.	1,4	n.d.	0,8

[00239] Sem limitar o escopo e a interpretação das reivindicações da patente, certos efeitos técnicos de um ou mais dos aspectos ou modalidades aqui descritas são listados a seguir: Um efeito técnico é a

degradação ou modificação da manana. Outro efeito técnico é o fornecimento de mananase que possui boa estabilidade de armazenamento. A descrição anterior forneceu, por meio de exemplos não limitantes de implementações e modalidades particulares da invenção, uma descrição completa e informativa do melhor modo presentemente contemplado pelos inventores para realizar a invenção. Entretanto, está claro para aquele versado na técnica que a invenção não está restrita a detalhes das modalidades apresentadas acima, mas que pode ser implementada em outras modalidades que usam meios equivalentes sem se desviar das características da invenção.

[00240] Além disso, algumas das características dos aspectos e modalidades acima descritas desta invenção podem ser utilizadas com vantagem sem o uso correspondente de outras características. Como tal, a descrição anterior deve ser considerada como meramente ilustrativa dos princípios da presente invenção, e não na sua limitação. Assim, o escopo da invenção é apenas restringido pelas reivindicações de patente anexas. Em uma modalidade, pelo menos, um componente das composições da invenção tem uma característica química, estrutural ou física diferente comparada com o componente natural correspondente do qual o, pelo menos, um componente é derivado. Em uma modalidade, a dita característica é pelo menos um tamanho uniforme, dispersão homogênea, isoforma diferente, degeneração de códon diferente, modificação pós-traducional diferente, metilação diferente, estrutura terciária ou quaternária diferente, atividade enzimática diferente, afinidade diferente, atividade de ligação diferente e imunogenicidade diferente.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição detergente caracterizada pelo fato de compreender pelo menos uma enzima que possui uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 74% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, 95% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e/ou 79% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

2. Composição detergente de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a pelo menos uma enzima tem uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81% %, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, 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% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

3. Composição detergente de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a pelo menos uma enzima tem uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

4. Composição detergente de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a pelo menos uma enzima tem atividade de degradação da manana.

5. Composição detergente de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a composição ainda compreende uma ou mais enzimas adicionais selecionadas do

grupo que consiste em protease, lipase, cutinase, amilase, carbohidrase, celulase, pectinase, pectatliase, mananase, arabinase, galactanase, xilanase, oxidase, xantanase, lacase e/ou peroxidase.

6. Composição detergente de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que a composição está na forma de uma barra, um tablete homogêneo, um tablete que possui duas ou mais camadas, uma bolsa que possui um ou mais compartimentos, um pó regular ou compacto, um grânulo, uma pasta, um gel ou um líquido regular, compacto ou concentrado.

7. Composição detergente de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que a composição detergente é uma composição detergente para lavanderia, preferivelmente uma composição detergente para lavanderia líquida ou sólida.

8. Uso de uma composição detergente como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de ser para a degradação da manana.

9. Uso de uma composição detergente como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de ser para um processo de lavanderia.

10. Método para remoção de uma mancha de uma superfície, caracterizado pelo fato de compreender contatar a superfície com uma composição detergente como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

11. Método para degradação da manana, caracterizado pelo fato de compreender aplicar uma composição detergente como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, à manana, preferivelmente em que a manana está sobre a superfície de um têxtil.

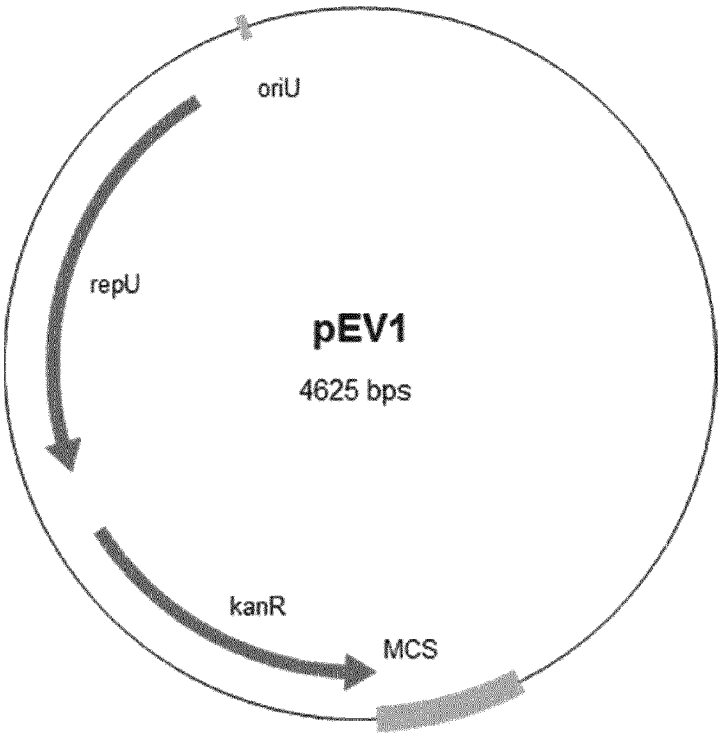

oriU
repU
pEV1
4625 bps
kanR
MCS

Fig.1

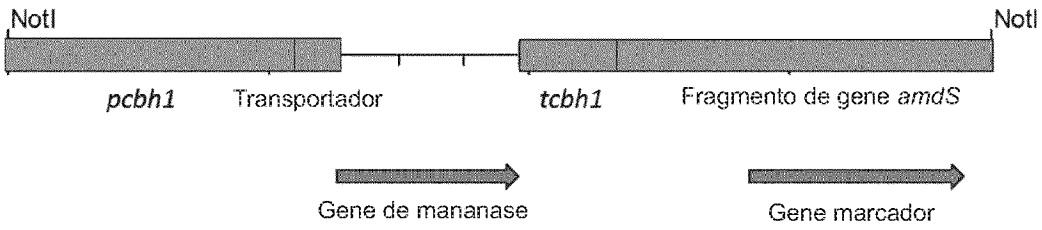

NotI
NotI
pcbh1
Transportador
tcbh1
Fragmento de gene amdS
Gene de mananase
Gene marcador

Fig. 2

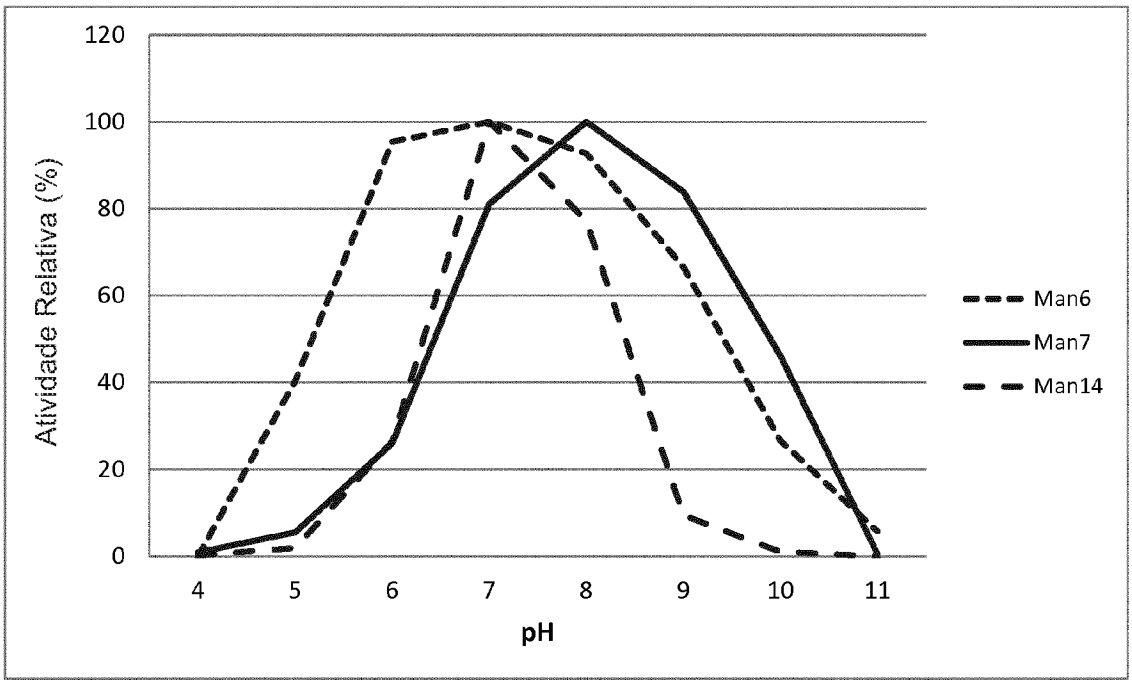

120
100
80
60
40
20
0
Atividade Relativa (%)
4
5
6
7
8
9
10
11
pH
Man6
Man7
Man14

Fig. 3

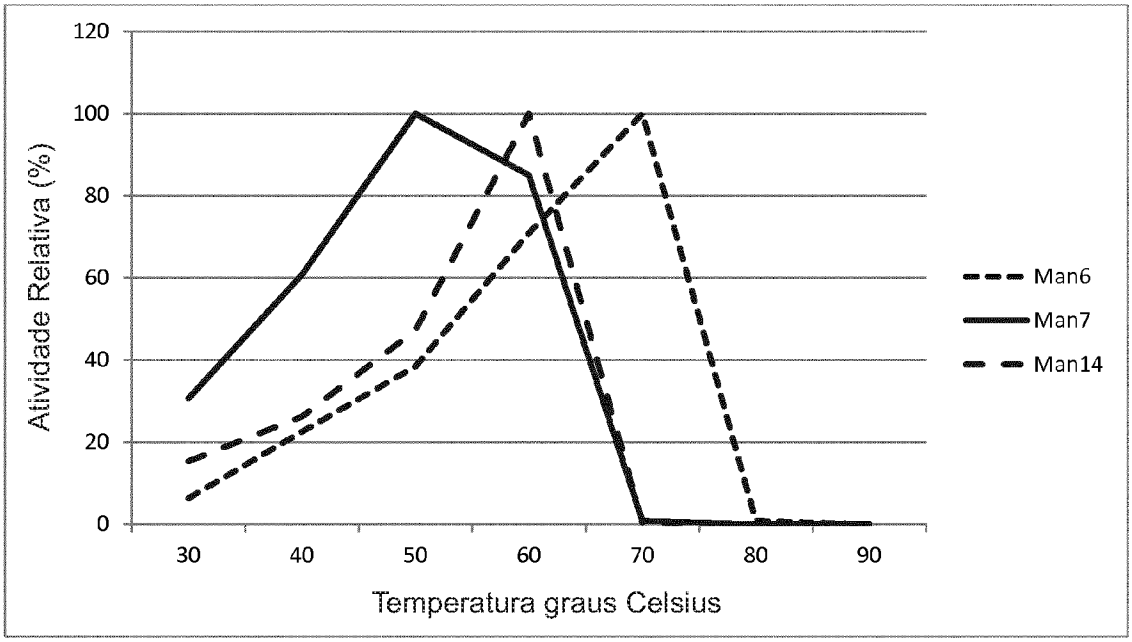
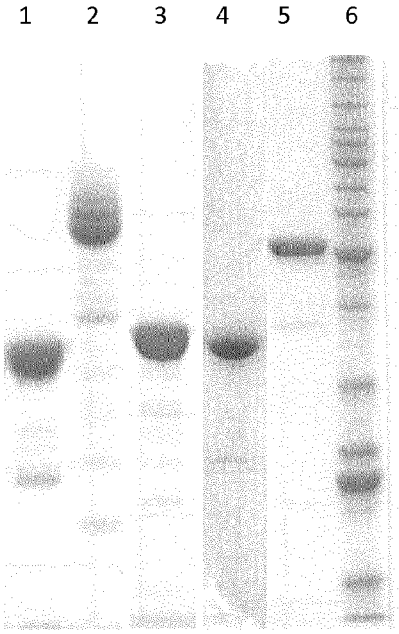

120
100
80
60
40
20
0
Atividade Relativa (%)
30
40
50
60
70
80
90
Temperatura graus Celsius
Man6
Man7
Man14

Fig. 4



1. Man6 Tr
2. Man7 Tr
3. Man14
4. Man6 Bs
5. Man7 Bs
6. Marcador Mw

Fig. 5

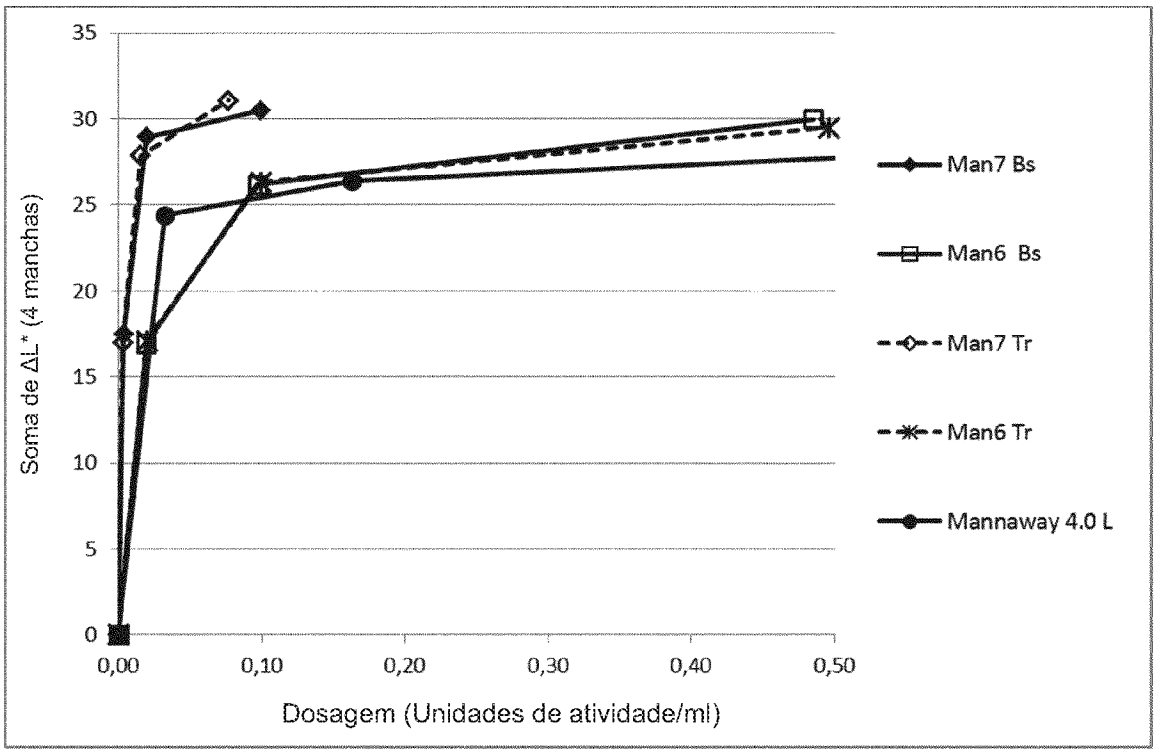


Fig 6.

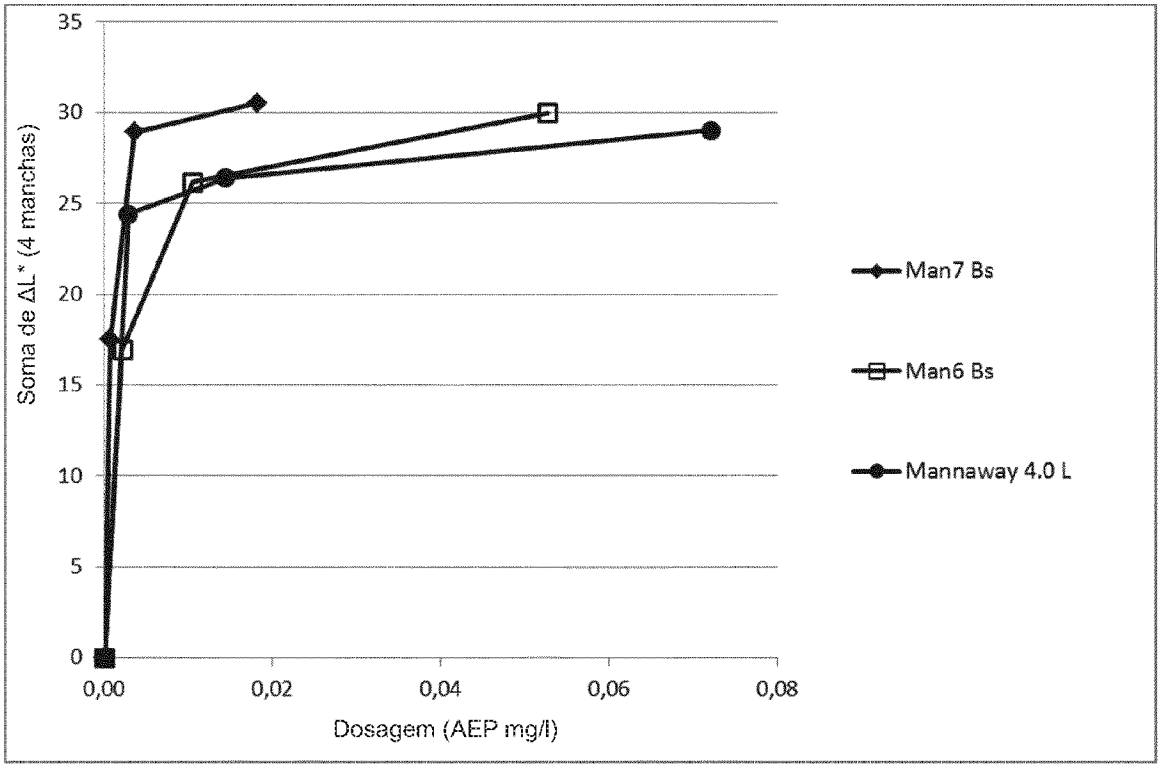

35
30
25
20
15
10
5
0
Soma de ΔL* (4 manchas)
0,00
0,02
0,04
0,06
0,08
Dosagem (AEP mg/l)
Man7 Bs
Man6 Bs
Mannaway 4.0 L

Fig 7.

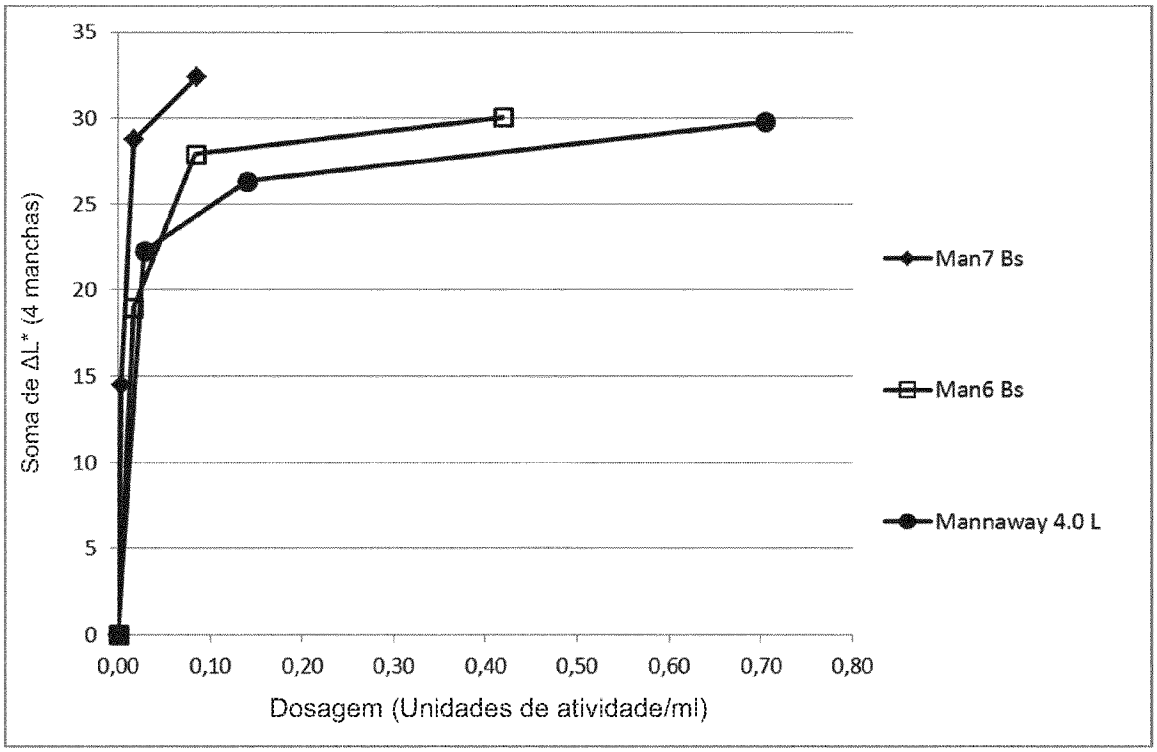

35
30
25
20
15
10
5
0
Soma de ΔL* (4 manchas)
0,00
0,10
0,20
0,30
0,40
0,50
0,60
0,70
0,80
Dosagem (Unidades de atividade/ml)
Man7 Bs
Man6 Bs
Mannaway 4.0 L

Fig 8.

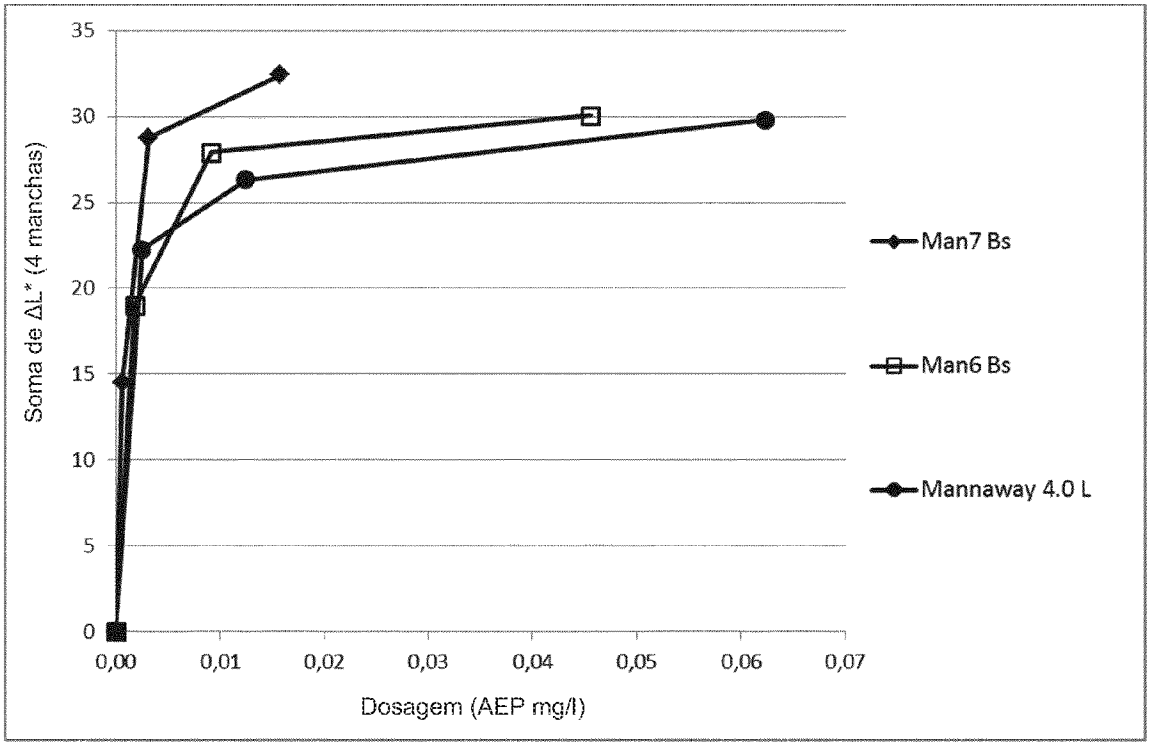

35
30
25
20
15
10
5
0
Soma de ΔL* (4 manchas)
0,00
0,01
0,02
0,03
0,04
0,05
0,06
0,07
Dosagem (AEP mg/l)
Man7 Bs
Man6 Bs
Mannaway 4.0 L

Fig 9.

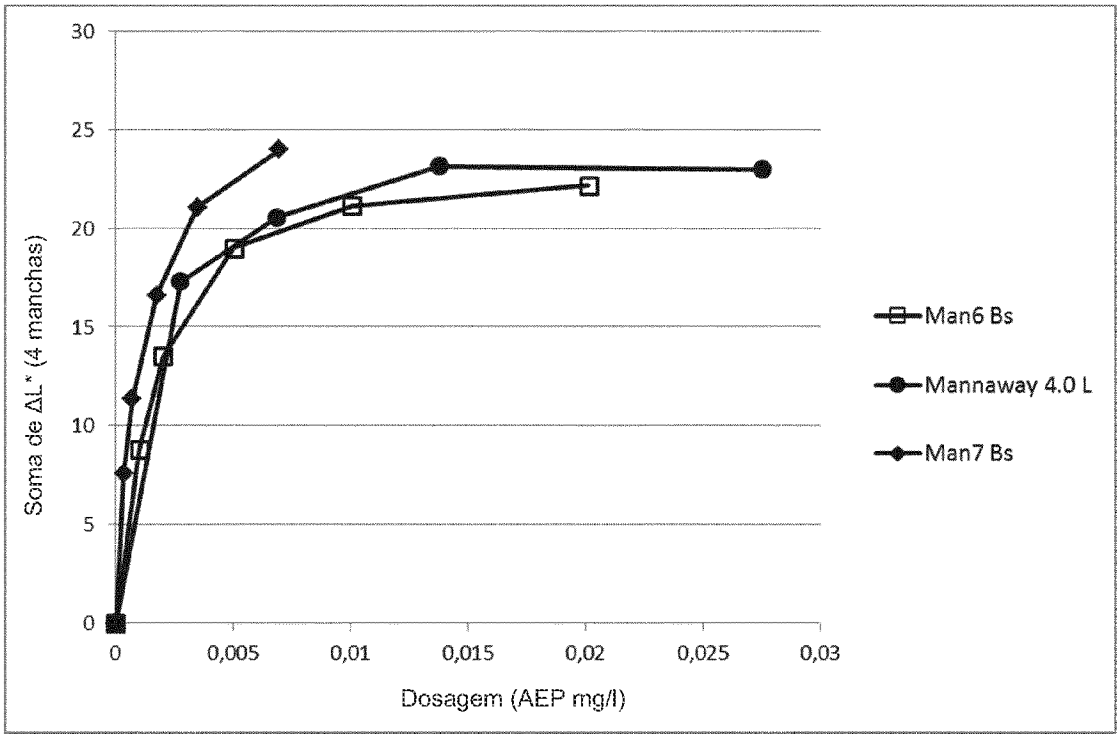

30
25
20
15
10
5
0
Soma de ΔL* (4 manchas)
0
0,005
0,01
0,015
0,02
0,025
0,03
Dosagem (AEP mg/l)
Man6 Bs
Mannaway 4.0 L
Man7 Bs

Fig 10 .

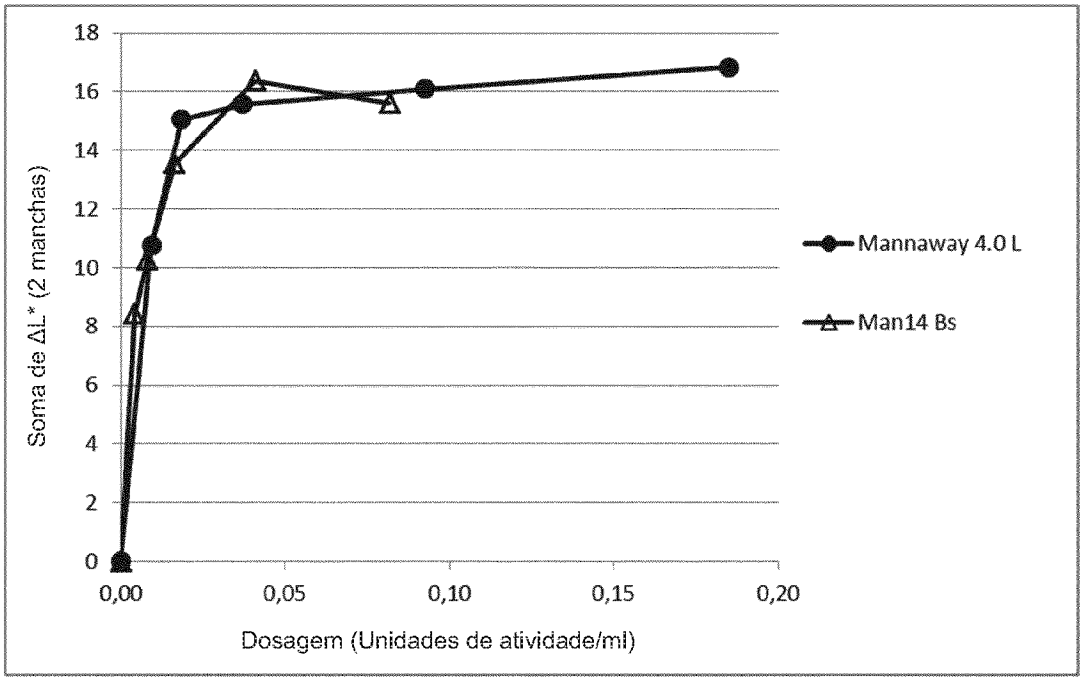

18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Soma de ΔL* (2 manchas)
0,00
0,05
0,10
0,15
0,20
Dosagem (Unidades de atividade/ml)
Mannaway 4.0 L
Man14 Bs

Fig. 11

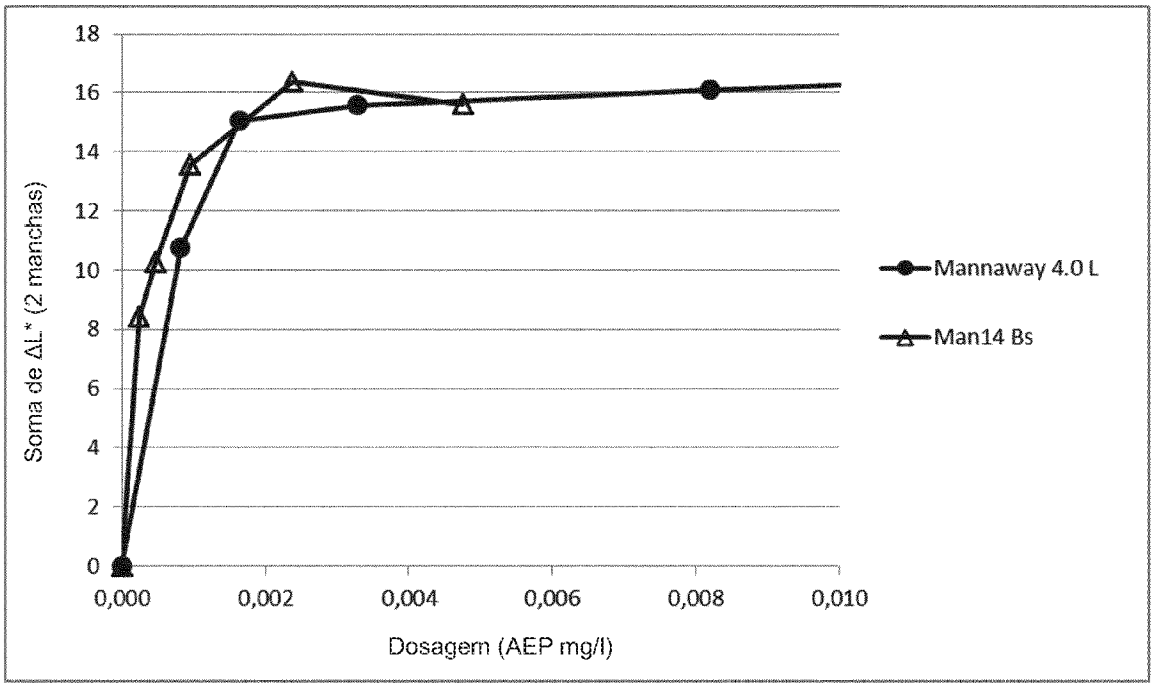

18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Soma de ΔL* (2 manchas)
0,000
0,002
0,004
0,006
0,008
0,010
Dosagem (AEP mg/l)
Mannaway 4.0 L
Man14 Bs

Fig. 12

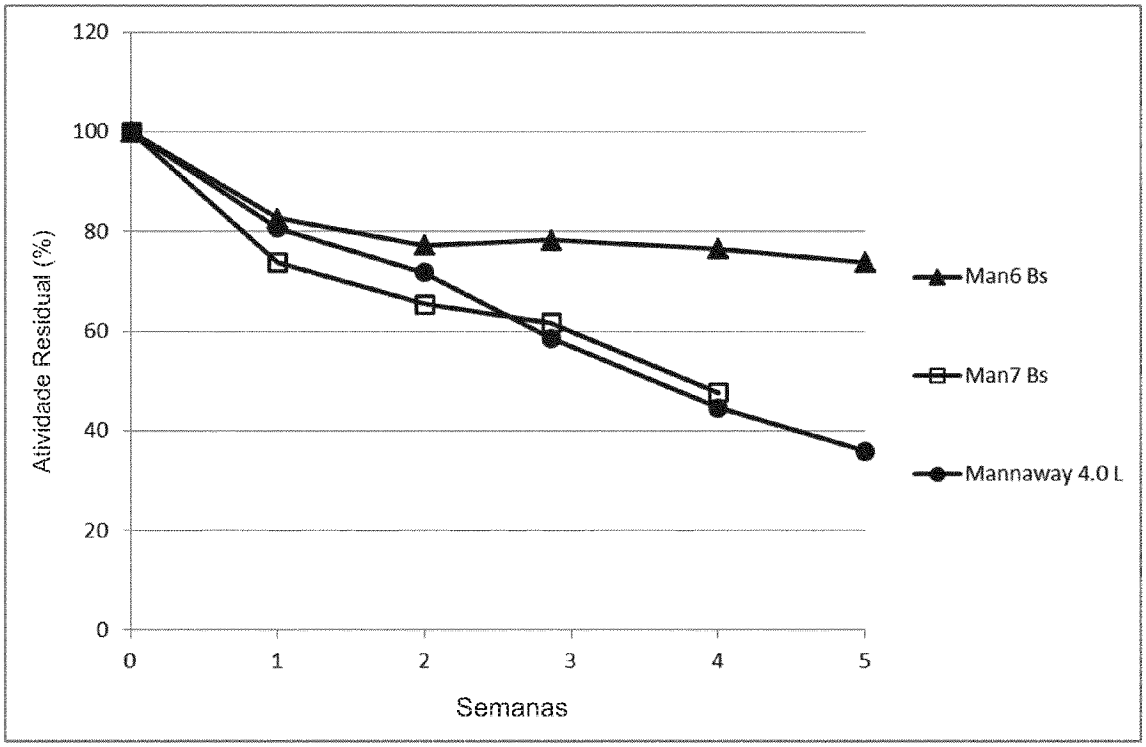

120
100
80
60
40
20
0
Atividade Residual (%)
0
1
2
3
4
5
Semanas
Man6 Bs
Man7 Bs
Mannaway 4.0 L

Fig. 13

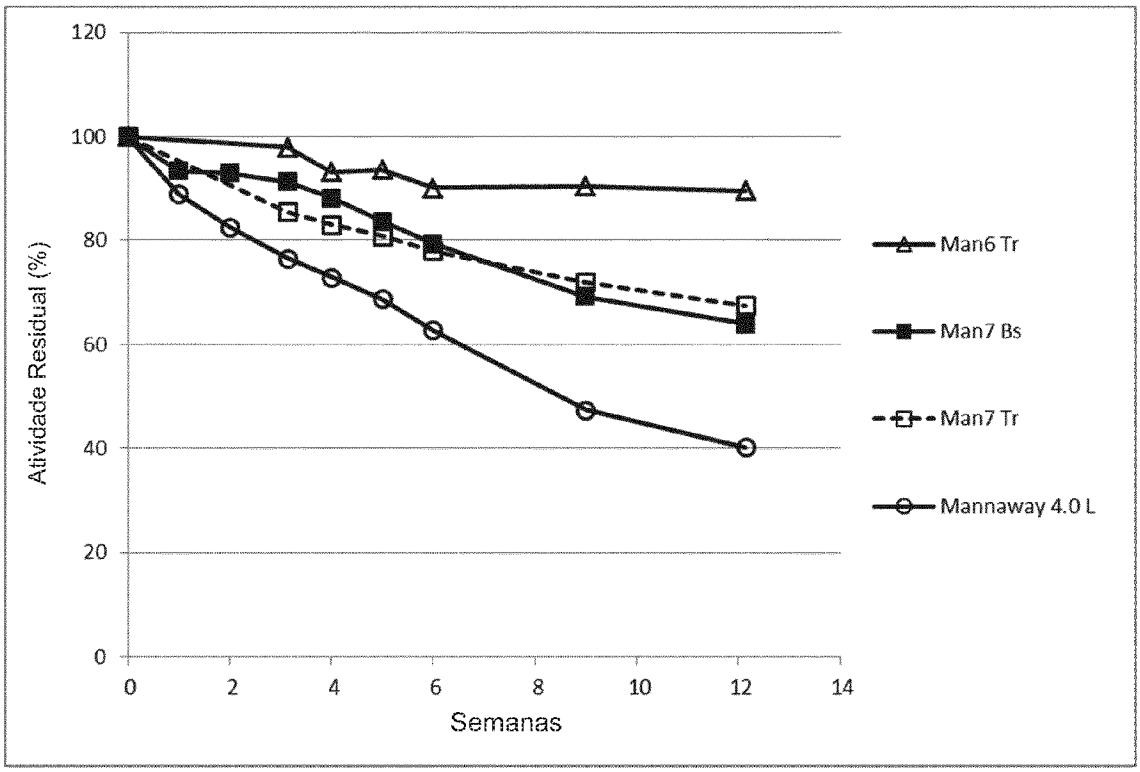

120
100
80
60
40
20
0
Atividade Residual (%)
0
2
4
6
8
10
12
14
Semanas
Man6 Tr
Man7 Bs
Man7 Tr
Mannaway 4.0 L

Fig. 14

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÕES DETERGENTES QUE COMPREENDEM MANANASES BACTERIANAS".**

Essa invenção refere-se a composições detergentes que compreendem enzimas mananases bacterianas. As composições detergentes que compreendem as mananases bacterianas são úteis em lavanderia e aplicações de limpeza em que a degradação ou modificação da manana é desejada. A invenção também se refere ao uso das ditas composições detergentes em lavanderia e aplicações de limpeza assim como um método para degradar a manana.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P241994.txt
- Data de Geração do Código: 30/08/2019
- Hora de Geração do Código: 15:12:22
- Código de Controle:
  - Campo 1: D42065E444A637CD
  - Campo 2: 225CAB0C6ACDA6C6