



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

(11) BR 112014024424-3 B1



(22) Data do Depósito: 13/03/2013

(45) Data de Concessão: 05/04/2022

(54) Título: PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UM ÁCIDO PEROXICARBOXÍLICO, COMPOSIÇÃO, SISTEMA DE GERAÇÃO E FORNECIMENTO DE PERÁCIDO E POLIPEPTÍDEO ISOLADO

(51) Int.Cl.: C12P 7/40; C12N 9/18; C11D 3/386.

(30) Prioridade Unionista: 30/03/2012 US 61/618,404.

(73) Titular(es): E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY.

(72) Inventor(es): MARK SCOTT PAYNE; ROBERT DICOSIMO.

(86) Pedido PCT: PCT US2013030778 de 13/03/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/148190 de 03/10/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/09/2014

(57) Resumo: PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UM ÁCIDO PEROXICARBOXÍLICO, COMPOSIÇÕES, SISTEMA DE GERAÇÃO E FORNECIMENTO DE PERÁCIDO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, POLIPEPTÍDEO E PRODUTO PARA CUIDADOS PESSOAIS. São fornecidas acetil xilano esterases e suas variantes possuindo atividade perhidrolítica para a produção de ácidos peroxicarboxílicos a partir de ésteres de ácidos carboxílicos e de uma fonte de peroxigênio. São também fornecidos sistemas de geração de perácidos multicomponentes compreendendo uma enzima catalisadora que possui atividade perhidrolítica, bem como métodos de uso do catalisador enzimático presente para produzir os ácidos peroxicarboxílicos. O polipeptídeo possuindo atividade perhidrolítica pode ser usado para produzir os ácidos peroxicarboxílicos adequados para a utilização em uma variedade de aplicações, tais como limpeza, desinfecção, higienização, branqueamento, processamento da polpa de madeira, processamento da polpa de papel, e aplicações de cuidados pessoais.

**“PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UM ÁCIDO PEROXICARBOXÍLICO,
COMPOSIÇÃO, SISTEMA DE GERAÇÃO E FORNECIMENTO DE
PERÁCIDO E POLIPEPTÍDEO ISOLADO”**

REFERÊNCIA CRUZADA PARA O PEDIDO RELACIONADO

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Provisório US 61/618.404, depositado em 30 de março de 2012, que é integralmente incorporado ao presente pela referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente divulgação diz respeito ao campo da biossíntese de ácido peroxicarboxílico e catálise enzimática. Mais especificamente, são fornecidos sistemas de geração de perácido multicomponentes, compreendendo um catalisador enzimático possuindo atividade perhidrolítica. Também são fornecidos os métodos de utilização do presente catalisador enzimático para produzir ácidos peroxicarboxílicos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0003] As composições de ácidos peroxicarboxílicos podem ser agentes antimicrobianos eficazes. Métodos de uso dos ácidos peroxicarboxílicos para limpar, desinfetar e/ou sanitizar/higienizar superfícies duras, têxteis, produtos de carne, tecidos vegetais vivos, e dispositivos médicos contra o crescimento microbiano indesejável já foram descritos (Patente US 6.545.047, Patente US 6.183.807, Patente US 6.518.307; Pedido de Patente US 2003-0026846, e Patente US 5.683.724). Os ácidos peroxicarboxílicos, também têm sido utilizados em diversas aplicações de branqueamento (*bleaching*) incluindo, mas não se limitado a, branqueamento de polpa de madeira/designificação e aplicações de tratamento de roupas (Patente Europeia 1040222B1; Patente US 5.552.018, Patente US 3.974.082, Patente US 5.296.161 e Patente US 5.364.554). A concentração eficaz desejada de ácido peroxicarboxílico pode variar de

acordo com a aplicação do produto (por exemplo, cerca de 500 ppm a 1000 ppm para desinfecção de instrumento médico, cerca de 30 ppm a 80 ppm para o branqueamento em lavanderia ou aplicações de desinfecção) em um tempo de reação de 1 min a 5 min em pH neutro.

[0004]As enzimas estruturalmente classificados como membros da família 7 de das carboidratos esterases (CE-7) foram utilizadas como perhidrolases para catalisar a reação de peróxido de hidrogênio (ou um reagente peróxido alternativo) com ésteres de alquila de ácidos carboxílicos em água em uma faixa de pH de básico para ácido (a partir do pH de aproximadamente 10 até aproximadamente o pH 5) para produzir uma concentração eficaz de um ácido peroxicarboxílico para aplicações como a desinfecção (tal como de instrumentos médicos, superfícies duras, têxteis), e branqueamento (tal como polpa de madeira ou processamento / deslignificação, aplicações de branqueamento têxtil e tratamento de roupas) e outros tratamentos de roupas, como descoloração, desodorização e sanitização, e aplicações de cuidados pessoais (patentes US 7.964.378; US 7.951.566 e US 7.723.083; Publicação do Pedido de Patente US 2008-0176299 para DiCosimo *et al.*, e Publicação do Pedido de Patente US 2012-0317733 e US 2012-0328534 para Chisholm *et al.*). As enzimas CE-7 foram encontrados por ter uma elevada atividade específica para a perhidrólise de ésteres, em particular acetil ésteres de alcoóis, dióis e gliceróis. Perhidrolases CE-7 variantes derivadas de várias espécies possuindo desempenho melhorado foram relatadas por DiCosimo *et al.* (Patentes US 7.927.854; US 7.923.233; US 7.932.072; US 7.910.347; US 7.960.528; US 8.062.875; US 8.206.964; US 8.389.254; e US 8.389.255; e Pedidos Publicados US 2011-0236336 e US 2011-0236338).

[0005]Carboidrato esterases CE-7 anteriormente relatadas possuindo atividade perhidrolítica (tanto tipo selvagem como variantes das

mesmas) compreendem um motivo de “assinatura” estrutural conservado tal como definido por Vincent *et al.* (*J. Mol. Biol.*, 330: 593-606 (2003)). Mais especificamente, o motivo de assinatura CE-7 utilizado para identificar e definir estruturalmente membros da família das carboidrato-esterases CE-7 compreende três submotivos conservados: 1) um submotivo “RGQ” de Arg118-Gli119-Gln120; 2) um submotivo “GXSQG” de Gli186-Xaa187-Ser188-Gli190-Gln189; e 3) um submotivo “HE” de His303-Glu304 (a numeração dos resíduos e a orientação são em relação à sequência de referência de *Thermotoga maritima* fornecida como SEQ ID NO: 2).

[0006] Embora a grande maioria das enzimas classificadas como carboidrato esterases CE-7 sejam compostas do motivo de assinatura definido por Vincent *et al.* diversas sequências de polipeptídeos foram adicionadas à família das carboidrato esterases CE-7 que não contêm o submotivo “HE” (Cantarel. *et al.*, “*The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics*”, *NAR*, 37:D233-D238 (2009)). Não foi relatada a presença de atividade perhidrolítica dentro deste subgrupo.

[0007] A incorporação da tecnologia enzimática perhidrolítica em algumas aplicações podem exigir a identificação de novas enzimas perhidrolítica. Dessa forma, continua a existir uma necessidade de identificar catalisadores enzimáticos adicionais compreendendo o polipeptídeo contendo a atividade perhidrolítica significativa.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[0008] Diversas enzimas foram identificadas possuindo atividade perhidrolítica adequada para a produção de perácidos em concentrações eficazes.

[0009] Em um exemplo de realização, um sistema enzimático de geração de perácido é fornecido compreendendo um conjunto de componentes de reação que compreende:

(1) pelo menos um substrato selecionado a partir do grupo consistindo em:

(i) um ou mais ésteres possuindo a estrutura



em que:

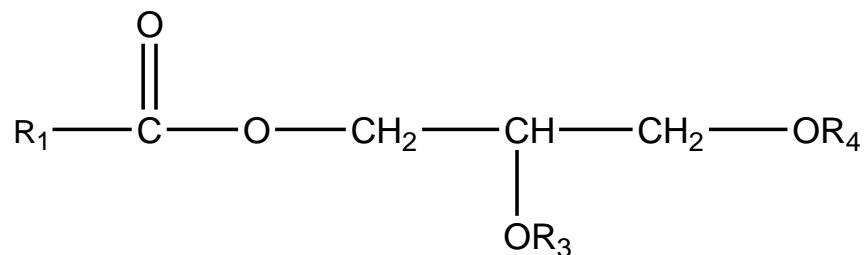
X = um grupo éster de fórmula $R_6-C(O)O$;

R_6 = um grupo hidrocarbila C1 a C7, linear, ramificado ou cíclico, opcionalmente substituído com grupos hidroxila ou grupos alcóxi C1 a C4, em que R_6 compreende, opcionalmente, uma ou mais ligações éter para $R_6 = C2$ a C7;

R_5 = um grupo hidrocarbila C1 a C6 linear, ramificado ou cíclico ou um grupo heteroaromático cíclico de cinco membros ou grupo aromático ou heteroaromático cíclico de seis membros, opcionalmente substituídos com grupos hidroxila; em que cada átomo de carbono em R_5 compreende individualmente não mais do que um grupo hidroxila, ou não mais do que um grupo éster ou de ácido carboxílico; em que R_5 compreende, opcionalmente, uma ou mais ligações éter;

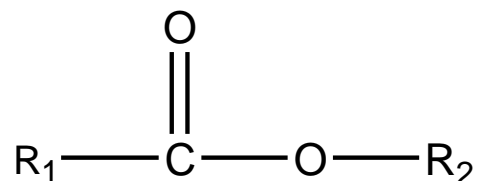
m = um número inteiro que varia de 1 ao número de átomos de carbono em R_5 ; e em que os referidos ésteres têm solubilidade em água de pelo menos 5 ppm a 25 °C;

(ii) um ou mais glicerídeos possuindo a estrutura



em que R_1 = alquila C1 a C21 de cadeia linear ou cadeia ramificada opcionalmente substituída com um grupo hidroxila ou um grupo alcóxi C1 a C4; e R_3 e R_4 são, individualmente, H ou $R_1C(O)$;

(iii) um ou mais ésteres da fórmula:



em que R_1 = uma alquila C1 a C7 de cadeia linear ou cadeia ramificada opcionalmente substituída com um grupo hidroxila ou um grupo alcóxi C1 a C4 e R_2 = $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, $(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-O})_n\text{H}$, arila, alquilarila, alquilheteroarila, heteroarila, alquinila, alquenila ou alquila C1 a C10 de cadeia linear ou cadeia ramificada, e n é de 1 a 10;

(iv) um ou mais monossacarídeos acetilados, dissacarídeos acetilados ou polissacarídeos acetilado; e

(v) qualquer combinação de (i) até (iv);

(2) uma fonte de peróxigênio; e

(3) um catalisador enzimático, compreendendo um polipeptídeo contendo a atividade perhidrolítica e uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, desde que o resíduo de aminoácido ligado ao lado C-terminal da histidina catalítica não seja ácido glutâmico;

em que um perácido é enzimaticamente produzido após a combinação dos componentes da reação sob condições de reação adequadas.

[0010] Em outro exemplo de realização, também é fornecido um processo para a produção de um ácido peroxicarboxílico, compreendendo:

(a) o fornecimento de um conjunto de componentes de reação que compreende:

(1) pelo menos um substrato selecionado a partir do grupo consistindo em:

(i) um ou mais ésteres possuindo a estrutura



em que:

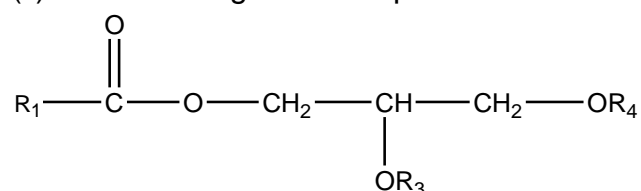
X = um grupo éster de fórmula $R_6-C(O)O$;

R_6 = um grupo hidrocarbila C1 a C7, linear, ramificado ou cíclico, opcionalmente substituído com grupos hidroxila ou grupos alcóxi C1 a C4, em que R_6 compreende, opcionalmente, uma ou mais ligações éter para $R_6 = C2$ a C7;

R_5 = um grupo hidrocarbila C1 a C6 linear, ramificado ou cíclico ou um grupo heteroaromático cíclico de cinco membros ou grupo aromático ou heteroaromático cíclico de seis membros, opcionalmente substituídos com grupos hidroxila; em que cada átomo de carbono em R_5 compreende individualmente não mais do que um grupo hidroxila, ou não mais do que um grupo éster ou de ácido carboxílico; em que R^5 compreende, opcionalmente, uma ou mais ligações éter;

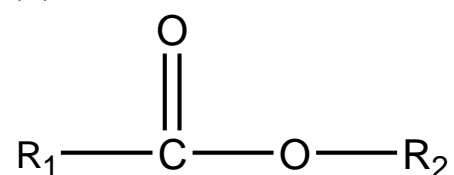
m = um número inteiro que varia de 1 ao número de átomos de carbono em R_5 ; e em que os referidos ésteres têm solubilidade em água de pelo menos 5 ppm a 25 °C;

(ii) um ou mais glicerídeos possuindo a estrutura



em que R_1 = alquila C1 a C21 de cadeia linear ou cadeia ramificada opcionalmente substituída com um grupo hidroxila ou um grupo alcóxi C1 a C4; e R_3 e R_4 são, individualmente, H ou $R_1C(O)$;

(iii) um ou mais ésteres da fórmula:



em que R_1 = uma alquila C1 a C7 de cadeia linear ou cadeia ramificada opcionalmente substituída com um grupo hidroxila ou um grupo alcóxi

C1 a C4 e $R_2 = (CH_2CH_2O)_n$, $(CH_2CH(CH_3)-O)_nH$, arila, alquilarila, alquil-heteroarila, heteroarila, alquinila, alquenila ou alquila C1 a C10 de cadeia linear ou cadeia ramificada, e n é de 1 a 10;

(iv) um ou mais monossacarídeos acilados, dissacarídeos acilados ou polissacarídeos acilados; e

(v) qualquer combinação de (i) até (iv);

(2) uma fonte de peróxigênio; e

(3) um catalisador enzimático, compreendendo um polipeptídeo contendo a atividade perhidrolítica e uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, desde que o resíduo de aminoácido ligado ao lado C-terminal da histidina catalítica não seja ácido glutâmico;

(b) combinação do conjunto de componentes de reação sob condições de reação adequadas em que o ácido peroxicarboxílico é produzido; e

(c) opcionalmente, a diluição do ácido peroxicarboxílico produzido na etapa (b).

[0011] Em outro exemplo de realização, é proporcionado um processo que compreende ainda uma etapa (d), em que o ácido peroxicarboxílico produzido na etapa (b) ou etapa (c) é colocado em contato com uma superfície dura, uma superfície do corpo, ou, pelo menos, um artigo de vestuário.

[0012] O presente processo produz o ácido peroxicarboxílico desejado após a combinação dos componentes da reação. Os componentes da reação podem permanecer separados até à utilização dos mesmos.

[0013] Em um aspecto adicional, é fornecido um sistema de geração de ácido peroxicarboxílico e de entrega, compreendendo:

(a) um primeiro compartimento compreendendo;

(1) um catalisador enzimático, compreendendo um polipeptídeo

contendo a atividade perhidrolítica e uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, desde que o resíduo de aminoácido ligado ao lado C-terminal da histidina catalítica não seja ácido glutâmico;

(2) pelo menos um substrato selecionado a partir do grupo consistindo em:

(i) um ou mais ésteres possuindo a estrutura



em que:

X = um grupo éster de fórmula $R_6-C(O)O$;

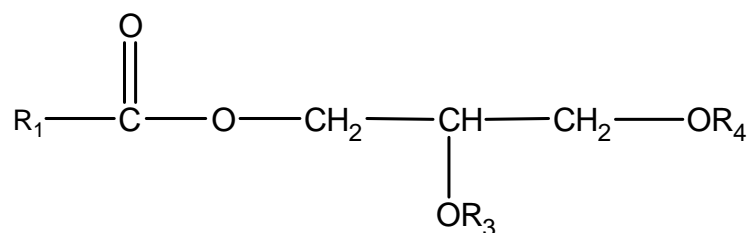
R_6 = um grupo hidrocarbila C1 a C7, linear, ramificado ou cíclico, opcionalmente substituído com grupos hidroxila ou grupos alcóxi C1 a C4, em que R_6 compreende, opcionalmente, uma ou mais ligações éter para $R_6 = C2$ a C7;

R_5 = um grupo hidrocarbila C1 a C6 linear, ramificado ou cíclico ou um grupo heteroaromático cíclico de cinco membros ou grupo aromático ou heteroaromático cíclico de seis membros, opcionalmente substituídos com grupos hidroxila; em que cada átomo de carbono em R_5 compreende individualmente não mais do que um grupo hidroxila, ou não mais do que um grupo éster ou grupo de ácido carboxílico; em que R_5 compreende, opcionalmente, uma ou mais ligações éter;

m = um número inteiro que varia de 1 ao número de átomos de carbono em R_5 ; e

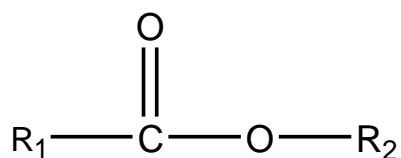
em que os referidos ésteres possuem solubilidade em água de pelo menos 5 ppm a 25 °C;

(ii) um ou mais glicerídeos possuindo a estrutura



em que R_1 = alquila C1 a C21 de cadeia linear ou cadeia ramificada opcionalmente substituída com um grupo hidroxila ou um grupo alcóxi C1 a C4; e R_3 e R_4 são, individualmente, H ou $\text{R}_1\text{C}(\text{O})$;

(iii) um ou mais ésteres da fórmula:



em que R_1 = uma alquila C1 a C7 de cadeia linear ou cadeia ramificada opcionalmente substituída com um grupo hidroxila ou um grupo alcóxi C1 a C4 e R_2 = $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, $(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O})_n\text{H}$, arila, alquilarila, alquil-heteroarila, heteroarila, alquinila, alquenila ou alquila C1 a C10 de cadeia linear ou cadeia ramificada, e n é de 1 a 10;

(iv) um ou mais monossacarídeos acilados, dissacarídeos acilados ou polissacarídeos acilados; e

(v) qualquer combinação de (i) até (iv); e

(3) um tampão opcional; e

(b) um segundo compartimento compreendendo;

(1) fonte de peróxigênio;

(2) um agente estabilizador de peróxido; e

(3) um tampão opcional.

[0014] Em um exemplo de realização adicional, é fornecida uma composição de tratamento de roupa compreendendo:

a) um polipeptídeo possuindo atividade perhidrolítica e uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 80% de identidade com a

sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4 desde que o resíduo de aminoácido ligado ao lado C-terminal da histidina catalítica não seja ácido glutâmico;

b) pelo menos um substrato selecionado a partir do grupo consistindo em:

(i) um ou mais ésteres possuindo a estrutura



em que:

X = um grupo éster de fórmula $R_6-C(O)O$;

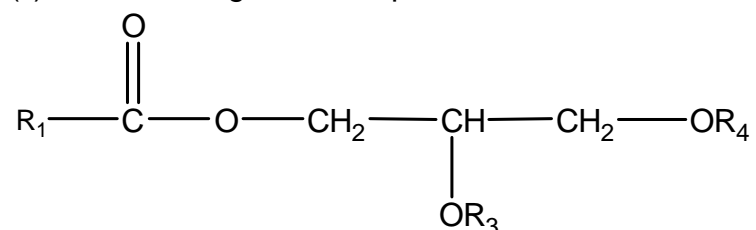
R_6 = um grupo hidrocarbila C1 a C7, linear, ramificado ou cíclico, opcionalmente substituído com grupos hidroxila ou grupos alcóxi C1 a C4, em que R_6 compreende, opcionalmente, uma ou mais ligações éter para $R_6 = C2$ a C7;

R_5 = um grupo hidrocarbila C1 a C6 linear, ramificado ou cíclico ou um grupo heteroaromático cíclico de cinco membros ou grupo aromático ou heteroaromático cíclico de seis membros, opcionalmente substituídos com grupos hidroxila; em que cada átomo de carbono em R_5 compreende individualmente não mais do que um grupo hidroxila, ou não mais do que um grupo éster ou grupo de ácido carboxílico; em que R^5 compreende, opcionalmente, uma ou mais ligações éter;

m = um número inteiro que varia de 1 ao número de átomos de carbono em R_5 ; e

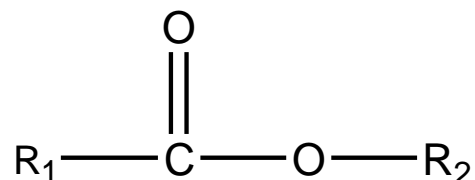
em que os referidos ésteres possuem solubilidade em água de pelo menos 5 ppm a 25 °C;

(ii) um ou mais glicerídeos possuindo a estrutura



em que R_1 = alquila C1 a C21 de cadeia linear ou cadeia ramificada opcionalmente substituída com um grupo hidroxila ou um grupo alcóxi C1 a C4; e R_3 e R_4 são, individualmente, H ou $R_1C(O)$;

(iii) um ou mais ésteres da fórmula:



em que R_1 = uma alquila C1 a C7 de cadeia linear ou cadeia ramificada opcionalmente substituída com um grupo hidroxila ou um grupo alcóxi C1 a C4 e R_2 = $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, $(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-O})_n\text{H}$, arila, alquilarila, alquilheteroarila, heteroarila, alquinila, alquenila ou alquila C1 a C10 de cadeia linear ou cadeia ramificada, e n é de 1 a 10;

(iv) um ou mais monossacarídeos acilados, dissacarídeos acilados ou polissacarídeos acilados; e

(v) qualquer combinação de (i) até (iv); e

c) uma fonte de peróxigênio; e

d) pelo menos um tensoativo.

[0015] Em um exemplo de realização adicional, é fornecido um produto para cuidados pessoais compreendendo um polipeptídeo possuindo atividade perhidrolítica, em que o referido polipeptídeo possui uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, desde que o resíduo de aminoácido ligado à extremidade C-terminal da histidina catalítica não seja ácido glutâmico;

[0016] Em um exemplo de realização adicional, o produto para cuidados pessoais é um xampu, loção corporal, gel de banho, hidratante tópico, creme dental, gel dental, antisséptico bucal, enxaguatório bucal, enxaguatório antiplaca ou produto de limpeza tópica.

[0017] Em outro exemplo de realização, é fornecida uma molécula

de ácido nucleico isolada selecionada a partir do grupo que consiste em:

(a) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo contendo a atividade perhidrolítica, e o referido polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 ou SEQ ID NO: 16;

(b) um polinucleotídeo compreendendo a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 13 ou SEQ ID NO: 15; e

(c) um polinucleotídeo totalmente complementar ao polinucleotídeo de (a) ou (b).

[0018] Em um exemplo de realização adicional, é fornecido um polipeptídeo isolado possuindo atividade perhidrolítica compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 ou SEQ ID NO: 16.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0019] A Figura 1 é um alinhamento CLUSTALW das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, e 12.

BREVE DESCRIÇÃO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[0020] As sequências a seguir cumprem com o Título 37 do CFR §1.821-1.825 (“Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures - the Sequence Rules”) e estão de acordo com as normas da Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI/WIPO), Standard ST.25 (2009) e os requisitos de listagem de sequências da Convenção sobre a Patente Europeia (CPE) e do Tratado de Cooperação em matéria de Patentes (PCT) (Regras 5.2 e 49,5 (a-bis), e na seção 208 e Anexo C das instruções administrativas. Os símbolos e formatos utilizados para os dados de sequências de nucleotídeos e aminoácidos obedecem as regras estabelecidas no Título 37 do CFR § 1,822.

SEQ ID NO: 1 é a sequência de ácido nucleico da região codificante códon- otimizada que codifica a acetil-xilano esterase de *Thermotoga maritima* possuindo atividade perhidrolítica.

SEQ ID NO: 2 é a sequência de aminoácidos da acetil-xilano esterase de *Thermotoga marítima* possuindo uma atividade perhidrolítica.

SEQ ID NO: 3 é a sequência de ácido nucleico da região codificante códon-otimizada que codifica uma acetil-xilano esterase de *Actinosynnema mirum* possuindo atividade perhidrolítica.

SEQ ID NO: 4 é a sequência de aminoácidos de uma acetil-xilano esterase de *Actinosynnema mirum* possuindo atividade perhidrolítica.

SEQ ID NO: 5 é a sequência de ácido nucleico da região codificante códon-otimizada que codifica uma acetil-xilano esterase de *Propionibacterium acnes* possuindo atividade perhidrolítica.

SEQ ID NO: 6 é a sequência de aminoácidos de uma acetil-xilano esterase de *Propionibacterium acnes* possuindo atividade perhidrolítica.

SEQ ID NO: 7 é a sequência de ácido nucleico da região codificante códon-otimizada que codifica uma acetil-xilano esterase de *Streptococcus equi* possuindo atividade perhidrolítica.

SEQ ID NO: 8 é a sequência de aminoácidos de uma acetil-xilano esterase de *Streptococcus equi* possuindo atividade perhidrolítica.

SEQ ID NO: 9 é a sequência de ácido nucleico da região codificante códon-otimizada que codifica uma acetil-xilano esterase de *Stackebrandtia nassauensis* possuindo atividade perhidrolítica.

SEQ ID NO: 10 é a sequência de aminoácidos de uma acetil-xilano esterase de *Stackebrandtia nassauensis* possuindo atividade perhidrolítica.

SEQ ID NO: 11 é a sequência de ácido nucleico da região codificante códon-otimizada que codifica uma acetil-xilano esterase de *Streptococcus agalactiae* possuindo atividade perhidrolítica.

SEQ ID NO: 12 é a sequência de aminoácidos de uma acetil-xilano esterase de *Streptococcus agalactiae* possuindo atividade perhidrolítica.

SEQ ID NO: 13 é a sequência de ácido nucleico da região

codificante códon-otimizada que codifica uma acetil-xilano esterase C277S variante de *Actinosynnema mirum* possuindo atividade perhidrolítica.

SEQ ID NO: 14 é a sequência de aminoácidos de uma acetil-xilano esterase C277S variante de *Actinosynnema mirum* possuindo atividade perhidrolítica.

SEQ ID NO: 15 é a sequência de ácido nucleico da região codificante códon-otimizada que codifica uma acetil-xilano esterase C277T variante de *Actinosynnema mirum* possuindo atividade perhidrolítica.

SEQ ID NO: 16 é a sequência de aminoácidos de uma acetil-xilano esterase C277T variante de *Actinosynnema mirum* possuindo atividade perhidrolítica.

SEQ ID NO: 17 é a sequência de aminoácidos da *Thermotoga maritima* C277S variante (Patente US 8.062.875).

SEQ ID NO: 18 é a sequência de aminoácidos da *Thermotoga maritima* C277T variante (Patente US 8.062.875).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0021] São fornecidos composições e métodos compreendendo um polipeptídeo possuindo atividade perhidrolítica, em que o referido polipeptídeo possui uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, desde que o resíduo de aminoácido ligado à extremidade C-terminal da histidina catalítica não seja ácido glutâmico; As composições e os métodos são apropriados para produzir enzimaticamente pelo menos um perácido adequado para uso em um produto para o tratamento de roupas, um produto desinfetante, um produto cosmético ou de um produto para cuidados pessoais.

[0022] Na presente divulgação, uma série de termos e abreviaturas é utilizada. As seguintes definições aplicam-se a menos que especificamente indicado de outra forma.

[0023] Conforme utilizado na presente invenção, os artigos “um/uma” e “o/a” que precedem um elemento ou componente da presente invenção destinam-se a ser não restritivos com relação ao número de casos (ou seja, ocorrências) do elemento ou componente. Portanto, “um/uma” e “o/a” devem ser interpretados por incluir um ou pelo menos um, e a forma singular da palavra do elemento ou componente também inclui o plural, a menos que seja o número que, obviamente, pretende-se que seja singular.

[0024] O termo “compreendendo”, significa a presença das características, números, etapas ou componentes indicados, tal como referido nas reivindicações, mas não exclui a presença ou adição de uma ou mais características, números, etapas ou componentes ou grupos dos mesmos. O termo “compreendendo” pretende incluir exemplos de realização abrangidos pelos termos “consistindo essencialmente em” e “consistindo em”. Da mesma forma, o termo “consistindo essencialmente em” pretende incluir exemplos de realização abrangidos pelo termo “consistindo em”.

[0025] Como usado no presente, o termo “cerca de” altera a quantidade de um ingrediente ou reagente empregado, referindo-se a variação na quantidade numérica que pode ocorrer, por exemplo, através da medição típica e procedimentos de manuseio de líquido usado para fazer concentrados ou soluções de uso no mundo real, através de erro involuntário nesses processos; através de diferenças na produção, origem ou grau de pureza dos ingredientes utilizados para fazer as composições ou realizar os métodos, e similares. O termo “cerca de” também engloba valores que diferem devido a diferentes condições de equilíbrio para uma composição resultante de uma mistura inicial específica. Seja ou não modificadas pelo termo “cerca de”, as reivindicações incluem equivalentes para as quantidades.

[0026] Quando presentes, todas as faixas ou intervalos são inclusivos e combináveis. Por exemplo, quando um intervalo de “1 a 5” é citado,

o intervalo citado deve ser interpretado como incluindo os intervalos “1 a 4”, “1 a 3”, “1 a 2”, “1a 2 e 4 a 5”, “1 a 3 & 5”, e similares.

[0027] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “sistema multicomponente” irá se referir a um sistema de geração de ácido peroxicarboxílico de maneira enzimática, em que os componentes permanecem separados até o uso. Como tal, o sistema multicomponente irá incluir pelo menos um primeiro componente que permanece separado de pelo menos um segundo componente. O primeiro e segundo componentes são separados em diferentes compartimentos até serem utilizados (ou seja, usando o primeiro e segundo compartimentos). O desenho dos sistemas multicomponentes, muitas vezes, dependerá da forma física dos componentes a serem combinados e são descritos em mais detalhe abaixo.

[0028] Tal como utilizado na presente invenção, o termo “ácido peroxicarboxílico” é sinônimo de perácido, peroxiácido, ácido peroxi, ácido percarboxílico e ácido peroxoico.

[0029] Tal como utilizado na presente invenção, o termo “ácido peracético” é abreviado como “PAA” e é sinônimo de ácido peroxiacético, ácido etanoperoxoico e todos os outros sinônimos de Registro CAS de Número 79-21-0.

[0030] Conforme utilizado no presente, o termo “monoacetina” é sinônimo de monoacetato de glicerol, monoacetato de glicerina, e monoacetato de glicerila.

[0031] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “diacetina” é sinônimo de diacetato de glicerol; diacetato de glicerina, diacetato de glicerila, e todos os outros sinônimos com registro CAS de número 25395-31-7.

[0032] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “triacetina” é sinônimo de triacetato de glicerina, triacetato de glicerol, triacetato

de glicerila, 1,2,3-triacetoxipropano; triacetato de 1,2,3-propanotriol e todos os outros sinônimos com registro CAS de número 102-76-1.

[0033] Conforme utilizado no presente, o termo “monobutirina” é sinônimo de monobutirato de glicerol, monobutirato de glicerina, e monobutirato de glicerila.

[0034] Conforme utilizado no presente, o termo “dibutirina” é sinônimo de dibutirato de glicerol e dibutirato de glicerila.

[0035] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “tributirina” é sinônimo de tributirato de glicerol; 1,2,3-tributirilglicerol; e todos os outros sinônimos com registro CAS de número 60-01-5.

[0036] Conforme utilizado no presente, o termo “monopropionina” é sinônimo de monopropionato de glicerol, monopropionato de glicerina, e monopropionato de glicerila.

[0037] Conforme utilizado no presente, o termo “dipropionina” é sinônimo de dipropionato de glicerol e dipropionato de glicerila.

[0038] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “tripropionina” é sinônimo de tripropionato de glicerila, tripropionato de glicerol; 1,2,3-tripropionilglicerol e todos os outros sinônimos com registro CAS de número 139-45-7.

[0039] Conforme utilizado na presente invenção, os termos “açúcar acilado” e “sacarídeo acilado” referem-se aos mono-, di- e polissacarídeos compreendendo, pelo menos, um grupo acila, em que o grupo acila é selecionado a partir do grupo que consiste em carboxilatos alifáticos de cadeia linear possuindo um comprimento de cadeia a partir de C2 até C8. Exemplos incluem, mas não se limitam a, penta-acetato de glicose, tetra-acetato de xilose, xilana acetilada, fragmentos de xilana acetilada, β -D-ribofuranose-1,2,3,5-tetra-acetato, tri-O-acetil-D-galactal, e tri-O-acetil-glucal.

[0040] Conforme utilizado na presente invenção, os termos

“hidrocarbila”, “grupo hidrocarbila”, e “radical hidrocarbila” significa um arranjo de átomos de carbono em cadeia linear, ramificada ou cíclica ligados por ligações carbono a carbono simples, duplas, triplas e/ou por ligações éter, e substituídos de acordo com os átomos de hidrogênio. Tais grupos hidrocarbila podem ser alifáticos e/ou aromáticos. Exemplos de grupos hidrocarbila incluem grupos metila, etila, propila, isopropila, butila, isobutila, t-butila, ciclopropila, ciclobutila, pentila, ciclopentila, metilciclopentila, hexila, ciclo-hexila, benzila e fenila. Em um exemplo de realização, o grupo hidrocarbila é um arranjo de átomos de carbono em cadeia linear, ramificada ou cíclica ligados por ligações carbono a carbono simples e/ou por ligações éter, e substituídos de acordo com átomos de hidrogênio.

[0041] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “aromático” refere-se a um composto orgânico ou grupo caracterizado por um aumento na estabilidade química resultante da deslocalização de elétrons em sistema de anel contendo geralmente múltiplas ligações duplas conjugadas. Anéis conjugados monocíclicos planares com elétrons deslocalizados devem ser aromáticos se tiverem elétrons $(4n+2) \pi$. Exemplos de compostos aromáticos podem incluir derivados de benzeno (por exemplo, ácido 2, 3 ou 4-acetoxibenzóico). Em um exemplo de realização, o substrato pode ser éster de ácido 4-acetoxibenzóico.

[0042] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “heterocíclico” refere-se a um composto ou grupo orgânico com uma estrutura em anel possuindo um ou mais átomos, que não seja carbono, em pelo menos um dos seus anéis.

[0043] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “heteroaromático” refere-se a um composto orgânico ou grupo com uma estrutura em anel que é aromática e heterocíclica, em que o anel compreende pelo menos um dos heteroátomos oxigênio, nitrogênio ou enxofre. Exemplos de

grupos heteroaromáticos podem incluir grupos piridina, pirrol, furano e tiofeno.

[0044] Conforme utilizado na presente invenção, os termos “monoésteres” e “diésteres” de 1,2-etanodiol, 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, 1,2-butanodiol, 1,3-butanodiol, 2,3-butanodiol, 1,4-butanodiol, 1,2-pentanodiol, 2,5-pentanodiol, 1,6-pentanodiol, 1,2-hexanodiol, 2,5-hexanodiol, 1,6-hexanodiol, referem-se os referidos compostos contendo pelo menos um grupo éster com a fórmula $RC(O)O$, em que R é um grupo hidrocarbila C1 a C7 linear.

[0045] Conforme utilizado na presente invenção, os termos “formulação de reação enzimática adequada”, “componentes adequados para a geração de um ácido peroxicarboxílico”, “componentes de reação adequados”, “componentes da reação”, “formulação de reação” e “formulação de reação aquosa adequada” referem-se aos materiais e água, em que os reagentes e o catalisador enzimático que compreende o presente polipeptídeo variante possuindo atividade perhidrolítica entram em contato de modo a formar o ácido peroxicarboxílico desejado. Os componentes da formulação da reação são fornecidos na presente invenção e os técnicos hábeis no assunto conhecerão o intervalo de variações dos componentes adequados para este processo. Em um exemplo de realização, a formulação da reação enzimática produz ácido peroxicarboxílico *in situ* mediante a combinação dos componentes de reação. Assim, os componentes da reação podem ser fornecidos como um sistema multicomponente em que um ou mais dos componentes da reação permanece separado até sua utilização. A concepção de sistemas e meios para separar e combinar múltiplos componentes ativos são conhecidos no estado da técnica e, geralmente, irão depender da forma física dos componentes da reação individuais. Por exemplo, sistemas com vários fluidos ativos (líquido-líquido) geralmente usam garrafas com dispensadores multicâmaras ou sistemas de duas fases (Publicação do Pedido de Patente US 2005-0139608, Patente US 5.398.846, Patente US 5.624.634; Patente US 6.391.840; Patente EP

0807156B1; Publicação do Pedido de Patente US 2005-0008526, e Publicação PCT WO 00/61713), tal como os encontrados em algumas aplicações de branqueamento, em que o agente de branqueamento desejado é produzido mediante a mistura dos fluidos reativos. As formulações multicomponentes e sistemas de geração multicomponentes para produzir enzimaticamente ácidos peroxicarboxílicos de ésteres de ácidos carboxílicos são descritos por DiCosimo *et al.* nas Publicações de Pedido de Patente US 2010-0086510 e US 2010-0086621, respectivamente. Outras formas de sistemas multicomponentes usadas para gerar o ácido peroxicarboxílico podem incluir, mas não estão limitadas, àquelas que são concebidas para um ou mais componentes sólidos ou combinações de componentes sólidos-líquidos, tal como pó utilizado em muitas composições de branqueamento disponíveis comercialmente (por exemplo, Patente US 5.116.575), comprimidos multicamadas (por exemplo., Patente US 6.210.639), pacotes que se dissolvem em água com múltiplos compartimentos (por exemplo, Patente US 6.995.125) e aglomerados sólidos que reagem com a adição de água (por exemplo, Patente US 6.319.888).

[0046] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “substrato” ou “substrato de éster de ácido carboxílico” irá se referir aos componentes da reação enzimática perhidrolizados utilizando o presente catalisador enzimático na presença de uma fonte adequada de peróxigênio, como o peróxido de hidrogênio. Em um exemplo de realização, o substrato compreende pelo menos um grupo éster capaz de ser enzimaticamente perhidrolizado usando o catalisador enzimático, em que um ácido peroxicarboxílico é produzido.

[0047] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “perhidrólise” é definido como a reação de um substrato selecionado com uma fonte de peróxido de hidrogênio para formar um ácido peroxicarboxílico. Normalmente, o peróxido inorgânico reage com o substrato selecionado na

presença de um catalisador para produzir o ácido peroxicarboxílico. Conforme utilizado na presente invenção, o termo “perhidrólise química” inclui as reações de perhidrólise em que um substrato (tal como um ácido peroxicarboxílico precursor) é combinado com uma fonte de peróxido de hidrogênio, em que o ácido peroxicarboxílico é formado na ausência de um catalisador enzimático. Conforme utilizado na presente invenção, o termo “perhidrólise enzimática” refere-se a uma reação de um substrato selecionado, com uma fonte de peróxido de hidrogênio para formar um ácido peroxicarboxílico, em que a reação é catalisada por um catalisador enzimático possuindo atividade de perhidrólise.

[0048] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “atividade de perhidrolase” refere-se à atividade catalisadora enzimática por unidade de massa de (por exemplo, mg) de proteína, peso seco de células, ou peso de catalisador imobilizado.

[0049] Conforme utilizado na presente invenção, “uma unidade de atividade de enzima” ou “uma unidade de atividade” ou “L” é definida como a quantidade de atividade de perhidrolase necessária para a produção de 1 μmol de produto ácido peroxicarboxílico (tal como o ácido peracético) por minuto, a uma temperatura especificada. “Uma unidade de atividade de enzima” também pode ser utilizada para na presente invenção à quantidade de atividade de hidrólise de ácido peroxicarboxílico necessária para a hidrólise de 1 mol de ácido peroxicarboxílico (por exemplo, ácido peracético) por minuto, a uma temperatura especificada.

[0050] Conforme utilizado na presente invenção, os termos “catalisador enzimático” e “perhidrolase catalisadora” referem-se a um catalisador compreendendo uma enzima (ou seja, um polipeptídeo) possuindo atividade de perhidrólise e pode estar na forma de um conjunto de células microbianas, células microbianas permeabilizadas, um ou mais componentes celulares de um extrato de células microbianas, uma enzima parcialmente

purificada, ou uma enzima purificada. O catalisador enzimático também pode ser quimicamente modificado (por exemplo, por PEGilação ou por reação com reagentes reticulantes (*cross-linking*)). A perhidrolase catalisadora pode também ser imobilizada sobre um suporte utilizando métodos solúveis ou insolúveis bem conhecidos pelos técnicos hábeis no assunto; vide, por exemplo, *Immobilization of Enzymes and Cells*; 2ª Edição, José M. Guisan, Editor; Humana Press, Totowa, NJ, EUA; 2006.

[0051] Conforme utilizado na presente invenção, os termos “estruturalmente classificado como enzima EC-7”, “estruturalmente classificado como uma enzima da família das carboidratos esterases 7”, “estruturalmente classificado como uma carboidrato esterase CE-7”, e “perhidrolase EC-7” serão usados a se referir às enzimas com atividade de perhidrólise que são estruturalmente classificadas como carboidratos esterases CE-7 (vide, Cantarel *et al*, “*The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics*”, NAR, 37: D233-D238 (2009)).

[0052] Conforme utilizado na presente invenção, os termos “cefalosporina C deacetilase” e “cefalosporina C acetil-hidrolase” referem-se a uma enzima (EC 3.1.1.41), que catalisa a desacetilação das cefalosporinas, tal como a cefalosporina C e ácido 7-aminocefalosporânico (Mitsushima *et al. Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (6): 2224-2229 (1995); Patente US 5.528.152; e Patente US 5.338.676).

[0053] Conforme utilizado na presente invenção, “acetil xilano esterase” se refere a uma enzima (EC 3.1.1.72; AXEs) que catalisa a desacetilação de xilanas acetiladas e outros sacarídeos acetilados.

[0054] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “*Thermotoga maritima*” refere-se a uma célula bacteriana relatada por ter atividade acetil xilano esterase (GENBANK® NP_227893.1). Neste aspecto, a cepa *Thermotoga maritima* é *Thermotoga maritima* MSB8. A sequência de

aminoácidos da enzima do tipo selvagem possuindo atividade perhidrolase de *Thermotoga marítima* é fornecida como SEQ ID NO: 2.

[0055] O termo “aminoácido” refere-se à unidade básica estrutural química de uma proteína ou polipeptídeo. As seguintes abreviaturas são usadas na presente invenção para identificar aminoácidos específicos:

Aminoácido	Abreviatura de Três letras	Abreviatura de uma letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Aspargina	Asn	N
Ácido Aspártico	Asp	D
Cisteína	Cis	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido Glutâmico	Glu	E
Glicina	Gli	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lis	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Fen	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Tre	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tir	Y
Valina	Val	V

Aminoácido	Abreviatura de Três letras	Abreviatura de uma letra
Qualquer aminoácido (ou conforme definido na presente invenção)	Xaa	X

[0056] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “contaminantes biológicos” refere-se a uma ou mais entidades biológicas patogênicas e/ou indesejadas, incluindo, mas não se limitados a, micro-organismos, esporos, vírus, príons, e misturas dos mesmos. A presente enzima pode ser utilizada para produzir uma concentração eficaz de pelo menos um ácido perocarboxílico útil para reduzir e u eliminar a presença de contaminantes biológicos viáveis. Em um exemplo de realização preferido, o contaminante biológico é um micro-organismo patogênico viável.

[0057] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “desinfecção” refere-se ao processo de destruição ou prevenção do crescimento de contaminantes biológicos. Conforme utilizado na presente invenção, o termo “desinfetante” refere-se a um agente que desinfeta pela destruição, neutralização ou inibição do crescimento de contaminantes biológicos. Normalmente, os desinfetantes são utilizados para tratar objetos inanimados ou superfícies. Conforme utilizado na presente invenção, o termo “antisséptico” refere-se a um agente químico que inibe o crescimento de micro-organismos patogênicos. Em um aspecto do exemplo de realização, os contaminantes biológicos são micro-organismos patogênicos.

[0058] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “sanitário” significa ou está relacionado com a restauração ou preservação da saúde, em geral, pela remoção, prevenção ou controle de um agente que pode ser prejudicial à saúde. Conforme utilizado na presente invenção, o termo “sanear / sanitizar” significa tornar sanitário. Conforme utilizado na presente invenção, o termo “sanitizador” refere-se ao agente sanitizante. Conforme utilizado na

presente invenção, o termo “sanitização/higienização” refere-se ao ato ou processo de sanitizar/higienizar.

[0059] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “virucida” refere-se a um agente que inibe ou destrói os vírus, e é sinônimo de “viricida”. Um agente que exhibe a capacidade para inibir ou destruir vírus é descrito como aquele que possui atividade “virucida”. Ácidos peroxicarboxílicos podem ter atividade viricida. Viricidas alternativos típicos conhecidos no estado da técnica que podem ser adequados para o uso na presente invenção incluem, por exemplo, alcoóis, de éteres, clorofórmio, formaldeído, fenol, beta propiolactona, iodo, cloro, sais de mercúrio, hidroxilamina, óxido de etileno, etileno glicol, compostos quaternários de amônio, enzimas e detergentes.

[0060] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “biocida” refere-se a um agente químico, tipicamente de amplo espectro, que inativa ou destrói micro-organismos. Um agente químico que exhibe a capacidade para inativar ou destruir micro-organismos é descrito como aquele que possui atividade “biocida”. Ácidos peroxicarboxílicos podem ter atividade biocida. Biocidas alternativos tipicamente conhecidos no estado da técnica que podem ser adequados para o uso na presente invenção incluem, por exemplo, cloro, dióxido de cloro, cloroisocianuratos, hipocloritos, ozônio, acroleína, aminas, fenóis clorados, sais de cobre, compostos de organo-enxofre, e sais de amônio quaternário.

[0061] Conforme utilizado na presente invenção, a frase “concentração biocida mínima” refere-se à concentração mínima de um agente biocida que, para um determinado tempo de contato, produzirá uma redução letal irreversível desejada, na população de micro-organismos viáveis visada. A eficácia pode ser mensurada pela redução em \log_{10} de micro-organismos viáveis após o tratamento. Em um aspecto, a redução específica em micro-organismos viáveis após o tratamento é uma redução de pelo menos 3- \log_{10} , mais

preferencialmente uma redução de pelo menos 4-log_{10} , e mais preferencialmente um redução de pelo menos 5 log_{10} . Em outro aspecto, a concentração mínima de biocida é de pelo menos um redução de 6 log_{10} de células microbianas viáveis.

[0062] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “fonte de peroxigênio” refere-se aos compostos capazes de fornecer peróxido de hidrogênio a uma concentração de cerca de 1 mM ou mais, quando em uma solução aquosa, incluindo, mas não se limitando a, peróxido de hidrogênio, aduto de peróxido de hidrogênio (por exemplo, aduto de peróxido de hidrogênio- ureia (peróxido de carbamida)), perboratos, percarbonatos, bem como percarbonato de sódio. Conforme descrito na presente invenção, a concentração do peróxido de hidrogênio fornecida pelo composto de peroxigênio na formulação de reação aquosa é inicialmente de pelo menos 1 mM ou mais após a combinação dos componentes da reação. Em um exemplo de realização, a concentração de peróxido de hidrogênio na formulação de reação aquosa é de pelo menos 0,5 mM. Em outro exemplo de realização, a concentração de peróxido de hidrogênio na formulação de reação aquosa é de pelo menos 10 mM. Em outro exemplo de realização, a concentração de peróxido de hidrogênio na formulação de reação aquosa é de pelo menos 100 mM. Em outro exemplo de realização, a concentração de peróxido de hidrogênio na formulação de reação aquosa é de pelo menos 200 mM. Em outro exemplo de realização, a concentração de peróxido de hidrogênio na formulação de reação aquosa é de 500 mM ou mais. Ainda em outro exemplo de realização, a concentração de peróxido de hidrogênio na formulação de reação aquosa é de 1000 mM ou mais. A razão molar de peróxido de hidrogênio para o substrato da enzima, tal como triglicerídeo, (H_2O_2 :substrato) na formulação de reação aquosa pode ser de cerca de 0,002 a 20, de preferência de aproximadamente 0,1 a 10, e mais preferivelmente de aproximadamente 0,5 a 5.

[0063] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “agente de benefício” refere-se a um material que promove ou intensifica uma vantagem útil, um efeito desejável/favorável ou benefício. Em um exemplo de realização, é fornecido um processo no qual um agente de benefício, tal como uma composição compreendendo um ácido peroxicarboxílico, é aplicado a um têxtil ou artigo de vestuário para se conseguir o benefício desejado, tais como a desinfecção, branqueamento, descoloração, desodorização, e qualquer combinação dos mesmos. Em outro exemplo de realização, o presente polipeptídeo variante possuindo atividade perhidrolítica pode ser usado para produzir um agente de benefício à base de perácido para a utilização em produtos para cuidados pessoais (tais como produtos para o cabelo, produtos para a pele, produtos de tratamento das unhas ou produtos de cuidados orais). Em um exemplo de realização, um produto para cuidados pessoais é fornecido compreendendo um polipeptídeo contendo a atividade perhidrolítica, possuindo o referido polipeptídeo uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 80% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos apresentada nas SEQ ID NOs: 4, 14 ou 16, desde que o resíduo de aminoácido ligado à extremidade C-terminal da histidina catalítica não seja ácido glutâmico. Os produtos para cuidados pessoais são formulados para proporcionar uma concentração segura e eficaz do agente de benefício de perácido desejado.

[0064] Conforme utilizado na presente invenção, “produtos de higiene pessoal” significa produtos utilizados na limpeza, branqueamento e/ou desinfecção do cabelo, pele, couro cabeludo, e dentes, incluindo, mas não se limitando a, xampus, loções corporais, géis de banho, hidratantes tópicos, pasta de dentes, géis dentais, antissépticos bucais, enxaguatórios bucais, enxáguas antiplaca, e/ou outros produtos de limpeza tópicos. Em alguns exemplos de realização particularmente preferidos, estes produtos são utilizados em seres

humanos, enquanto que em outros exemplos de realização, estes produtos encontram uso em animais não humanos (por exemplo, em aplicações veterinárias).

[0065] Conforme utilizado na presente invenção, os termos “clareamento” e “branqueamento de dentes” são utilizados indiferentemente para se referir a melhorar o brilho (por exemplo, branqueamento) de um dente ou dos dentes. Pretende-se que o termo abranja qualquer método adequado para o branqueamento de dentes, incluindo a presente invenção, bem como o tratamento químico, tratamento com ácido suave, clareamento abrasivo, e clareamento à laser. Em exemplos de realização particularmente preferidos, a presente invenção provê uma perhidrolase e composições contendo perhidrolase adequadas para o branqueamento dos dentes.

POLYPEPTÍDEOS POSSUINDO ATIVIDADE PERHIDROLÍTICA

[0066] O “motivo de assinatura” para as esterases CE-7 anteriormente divulgadas possuindo atividade perhidrolítica compreende três submotivos conservados (numeração da posição dos resíduos em relação à sequência de referência SEQ ID NO : 2, a acetil xilano esterase de tipo selvagem de *Thermotoga maritima*):

- a) Arg118-Gli119-Gln120; (“motivo RGQ”);
- b) Gli186-Xaa187-**Ser188**-Gln189-Gli190; e (“motivo GXSQG”); e
- c) **His303**-Glu304. (“motivo HE”).

[0067] Tipicamente, o resíduo Xaa na posição de aminoácido 187 é glicina, alanina, prolina, triptofano ou treonina. Dois dos três resíduos de aminoácidos que pertencem à tríade catalítica estão em negrito.

[0068] Embora as presentes enzimas perhidrolíticas tenham o motivo RGQ e o motivo GXSQG, nenhuma das presentes enzimas perhidrolíticas tem o ácido glutâmico no “motivo HE” anteriormente relatado como um motivo estrutural conservado, tal como mostrado na Tabela A e Figura 1.

TABELA A**MOTIVOS ENCONTRADOS DENTRO DAS PRESENTES ENZIMAS COM ATIVIDADE****PERHIDROLASE**

Sequência da Perhidrolase	Motivo RGQ (nº de Resíduos)	Motivo GXSQG (nº de Resíduos)	Motivo HX (nº de Resíduos)	Resíduo de aminoácido ligado à histidina catalítica no motivo HX
SEQ ID NO: 2 ^a	118-120	186-190	303-304	E ^b
SEQ ID NO: 4	118-120	184-188	302-303	A
SEQ ID NO: 6	117-119	184-188	309-310	A
SEQ ID NO: 8	114-116	177-181	299-300	D
SEQ ID NO: 10	117-119	186-190	303-304	S
SEQ ID NO: 12	115-117	178-182	299-300	D
SEQ ID NO: 14	118-120	184-188	302-303	A
SEQ ID NO: 16	118-120	184-188	302-303	A

^a = sequência de referência da *Thermotoga maritima*.

^b = Anteriormente divulgado como sendo um ácido glutâmico conservado, formando um motivo "HE".

[0069] Parece que os presentes polipeptídeos possuindo atividade perhidrolítica podem representar um novo subgrupo dentro da principal classe genérica das carboidratos esterases CE-7 listadas como membros dentro do banco de dados CAZy (Cantarel *et al*, "The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics", *NAR*, 37: D233-D238 (2009)). Assim, os polipeptídeos possuindo atividade perhidrolítica utilizados no presente pedido de patente serão referidos como "carboidrato esterases CE-7" ou "perhidrolases CE-7", embora elas possam não ter a porção do "motivo de assinatura" previamente definida.

[0070] Em outro exemplo de realização, os presentes polipeptídeos possuindo atividade perhidrolítica são também definidos como possuindo a seguinte combinação de motivos quando alinhados contra uma sequência de referência de SEQ ID NO: 2 (numeração da posição de resíduos em relação à sequência de referência SEQ ID NO: 2, acetil-xilano esterase tipo selvagem de *Thermotoga marítima*):

- a) Arg118-Gli119-Gln120; (“motivo RGQ”);
- b) Gli186-Xaa187-Ser188-Gln189-Gli190; e (“motivo GXSQG”); e
- c) His303-Xaa304. (“motivo HX”); em que “Xaa” não é ácido glutâmico.

[0071] Em um aspecto preferido, o resíduo de aminoácido “X” no “motivo HX” é alanina, ácido aspártico ou serina.

[0072] Em outro aspecto, o presente polipeptídeo com atividade perhidrolítica compreende uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 80% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 12, 14, e 16 , desde que o resíduo de aminoácido ligado à extremidade C-terminal da histidina catalítica não seja o ácido glutâmico.

[0073] Em um exemplo de realização, os presentes polipeptídeos possuindo atividade perhidrolítica possuem pelo menos 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 84, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% de identidade de sequência de aminoácidos com as sequências fornecidas na presente invenção, desde que o resíduo de aminoácido ligado à extremidade C-terminal da histidina catalítica não seja o ácido glutâmico.

[0074] Em outro aspecto, o presente polipeptídeo com atividade perhidrolítica compreende uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 80% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 4, desde que o resíduo de aminoácido ligado à extremidade C-terminal da histidina catalítica não seja o ácido glutâmico. Em outro aspecto, o presente polipeptídeo com atividade perhidrolítica compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

[0075] Conforme utilizado na presente invenção, o termo

“perhidrolase variante” ou “variante” refere-se às enzimas perhidrolíticas que possuem uma modificação que resulta em pelo menos uma adição, deleção e/ou substituição de aminoácidos, quando comparada com a enzima correspondente (tipicamente a enzima tipo selvagem) a partir do qual a variante foi originada; contanto que os motivos necessários aqui descritos e a atividade perhidrolítica associada a elas sejam mantidos. As perhidrolases CE-7 variantes também podem ser utilizadas nas presentes composições e métodos. Exemplos de variantes são fornecidas como SEQ ID NOs: 14 e 16.

[0076] Os técnicos hábeis no assunto sabem que sequências substancialmente similares de perhidrolases também podem ser utilizadas nas presentes composições e métodos. Em um exemplo de realização, as sequências substancialmente similares são definidas pela sua capacidade de hibridizar, sob condições altamente estridentes, com as moléculas de ácidos nucleicos associadas com as sequências aqui exemplificadas. Em outro exemplo de realização, os algoritmos de alinhamento de sequências podem ser utilizados para definir as enzimas que são substancialmente similares com base na percentagem de identidade com as sequências de DNA ou de aminoácidos aqui disponibilizadas.

[0077] Conforme utilizado na presente invenção, uma molécula de ácido nucleico é “hibridizável” a outra molécula de ácido nucleico, tal como um cDNA, DNA genômico RNA, quando uma fita-simples da primeira molécula pode se anelar a outra sob condições adequadas de temperatura e força iônica da solução. As condições de hibridização e lavagem são bem conhecidas e exemplificadas em Sambrook, J. e Russel, D. T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Terceira Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (2001). As condições de temperatura e força iônica determinam a “estringência” da hibridização. Condições de estringência podem ser ajustadas para selecionar moléculas moderadamente similares, tais como sequências

homólogas a partir de organismos distantemente relacionados, a moléculas muito similares, tais como genes que duplicam enzimas funcionais a partir de organismos estreitamente relacionados. A lavagem pós-hibridização normalmente determina as condições de estringência. Um conjunto de condições preferenciais usa uma série de lavagens iniciais com 6X SSC, 0,5% de SDS em temperatura ambiente por 15 min, em seguida, repetido com 2X SSC, 0,5% de SDS a 45 °C por 30 min, e depois repetido duas vezes com 0,2 X SSC, 0,5% de SDS a 50 °C por 30 min. Um conjunto mais preferido de condições utiliza altas temperaturas em que as lavagens são idênticas às mencionadas anteriormente, exceto que a temperatura das duas últimas lavagens de 30 min em 0,2 X SSC, 0,5% de SDS foi aumentada para 60 °C. Outro conjunto preferido de condições de hibridização altamente estringentes é 0,1 X, SSC, 0,1% de SDS, a 65 °C e lavagem com SSC 2X, 0,1% de SDS, seguido por uma lavagem final com SSC 0,1X; 0,1% de SDS a 65 °C.

[0078] A hibridização exige que os dois ácidos nucleicos contenham sequências complementares, contudo, dependendo da estringência da hibridização, pareamentos inadequados entre as bases são possíveis. A estringência adequada para hibridização de ácidos nucleicos depende do comprimento dos ácidos nucleicos e do grau de complementação, variáveis bem conhecidas no estado da técnica. Quanto maior o grau de similaridade ou homologia entre as duas sequências de nucleotídeos, maior o valor de T_m para os híbridos de ácidos nucleicos com essas sequências. A estabilidade relativa (correspondendo a um T_m maior) de hibridizações de ácidos nucleicos diminui na seguinte ordem: RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA. Para híbridos com mais de 100 nucleotídeos de comprimento, as equações para o cálculo de T_m foram derivados (Sambrook e Russell. *Supra*). Para hibridizações com ácidos nucleicos mais curtos, ou seja, oligonucleotídeos, a posição de pareamentos inadequados se torna mais importante, e o comprimento do oligonucleotídeo determina a sua

especificidade (vide Sambrook e Russell, *Supra*). Em um aspecto, o comprimento de um ácido nucleico hibridizável é de pelo menos cerca de 10 nucleotídeos. De um modo preferido, um comprimento mínimo para um ácido nucleico hibridizável é de cerca de pelo menos 15 nucleotídeos de comprimento, mais preferivelmente pelo menos cerca de 20 nucleotídeos de comprimento, ainda mais preferivelmente pelo menos 30 nucleotídeos de comprimento, ainda mais preferivelmente pelo menos 300 nucleotídeos de comprimento, e mais preferivelmente pelo menos 800 nucleotídeos de comprimento. Além disso, o técnico hábil no assunto irá reconhecer que a temperatura e a concentração de sal na solução de lavagem podem ser ajustadas conforme o necessário de acordo com fatores como o comprimento da sonda.

[0079] Conforme utilizado na presente invenção, a expressão “porcentagem de identidade” é uma relação entre duas ou mais sequências polipeptídicas, ou duas ou mais sequências de polinucleotídeos, conforme determinado pela comparação de sequências. No estado da técnica, “identidade” significa também o grau de relação de sequência entre as sequências de polipeptídeos ou polinucleotídeos, conforme o caso, como determinado pelo pareamento entre as cadeias de tais sequências. A “identidade” e “similaridade” podem ser facilmente calculadas por meio de métodos conhecidos, incluindo, mas não se limitando aos descritos em: *Computational Molecular Biology* (Lesk, A. M., Ed.) Oxford University: NY (1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (Smith, D. W., Ed.) Academic Press: NY (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I* (Griffin, A. M., e Griffin, H. G., Eds.) Humana Press: NJ (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology* (von Heinje, G., Ed.) Academic Press (1987); e *Sequence Analysis Primer* (Gribskov, M. e Devereux, J., Eds.) Stockton: NY (1991). Métodos para determinar a identidade e similaridade estão codificados em programas de computador disponíveis publicamente. Os alinhamentos de sequência e cálculos de porcentagem da identidade podem ser

calculados utilizando o programa Megalign® da *LASERGENE bioinformatics computing suite* (DNASTAR® Inc., Madison, WI), o programa *AlignX* da *Vector NTI v. 7.0*, (Informax, Inc., Bethesda, MD), o a suíte de programas '*EMBOSS Open Software Suite*' (EMBL-EBI; Rice *et al.*, *Trends in Genetics* 16, (6):276-277 (2000)). O alinhamento múltiplo das sequências pode ser realizado usando o método de alinhamento CLUSTAL (tal como CLUSTALW, por exemplo, versão 1.83) (Higgins e Sharp, *CABIOS* 5: 151-153 (1989); Higgins *et al.*, *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680 (1994), e Chenna *et al.*, *Nucleic Acids Res* 31 (13):3497-500 (2003)), disponível a partir do Laboratório de Biologia Molecular Europeu pelo Instituto Europeu de Bioinformática) utilizando os parâmetros predefinidos. Os parâmetros adequados para alinhamentos ClustalW de proteínas incluem *GAP Existence PENALTY* = 15, *GAP Extension* = 0,2, = matriz *Gonnet* (por exemplo, *Gonnet250*), *ENDGAP* = -1, *GAPDIST* proteína = 4, e *KTUPLE* = 1. Em um exemplo de realização, um alinhamento rápido ou lento é utilizado com as configurações padrão (predefinidas), de modo que um alinhamento lento é preferido. Alternativamente, os parâmetros utilizando no método CLUSTALW (por exemplo, Versão 1.83) podem ser modificados para utilizar também *KTUPLE* = 1, *GAP PENALTY* = 10, *GAP Extension* = 1, *BLOSUM* = (por exemplo, *BLOSUM64*), *WINDOW* = 5 e *TOP DIAGONALS SAVED* = 5.

[0080]Por "histidina catalítica" entende-se o resíduo de histidina nas perhidrolases presentemente divulgadas, que formam uma tríade catalítica com serina e ácido aspártico. Por exemplo, na SEQ ID NO: 4, a histidina catalítica é o resíduo de aminoácido de número 302. Uma variante da SEQ ID NO: 4, que possui uma atividade perhidrolase terá sua histidina catalítica alinhada com a histidina catalítica da SEQ ID NO: 4, quando as sequências são comparadas utilizando o *CLUSTALW*, o que significa que a histidina catalítica da variante pode, mas não necessariamente deve estar, na posição de aminoácido 302 da variante.

[0081] Em um aspecto, as moléculas de ácido nucleico isoladas adequadas codificam um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 84, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% idêntica às sequências de aminoácidos divulgadas na presente invenção. As moléculas de ácido nucleico adequadas não apenas têm as homologias acima, mas também codificam tipicamente um polipeptídeo que possui cerca de 210-340 aminoácidos de comprimento, cerca de 300 a cerca de 340 aminoácidos, preferivelmente cerca de 310 a cerca de 330 aminoácidos, e mais preferivelmente cerca de 318 a cerca de 325 aminoácidos de comprimento, em que cada polipeptídeo é caracterizado como tendo atividade perhidrolítica.

**CONDIÇÕES DE REAÇÃO ADEQUADAS PARA A PREPARAÇÃO CATALISADA PELA
ENZIMA DE ÁCIDOS PEROXICARBOXÍLICOS A PARTIR DE ÉSTERES DE ÁCIDOS
CARBOXÍLICOS E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**

[0082] É fornecido um processo para produzir uma formulação aquosa compreendendo pelo menos um ácido peroxicarboxílico pela reação de ésteres de ácidos carboxílicos e um peróxido inorgânico (tal como peróxido de hidrogênio, perborato de sódio ou percarbonato de sódio), na presença de um catalisador enzimático possuindo atividade de perhidrólise, em que o catalisador enzimático compreende, em um exemplo de realização, um polipeptídeo possuindo pelo menos 80% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 12, 14, e 16, desde que o resíduo de aminoácido ligado à extremidade C-terminal da histidina catalítica não seja o ácido glutâmico. Em um exemplo de realização adicional, o polipeptídeo possuindo atividade perhidrolítica compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre as SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16. Em um exemplo de realização adicional, o polipeptídeo possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

[0083] Em um exemplo de realização, os substratos adequados incluem um ou mais ésteres fornecidos pela seguinte fórmula:



em que X = um grupo éster de fórmula $R_6C(O)O$;

R_6 = um grupo hidrocarbila C1 a C7, linear, ramificado ou cíclico, opcionalmente substituído com grupos hidroxila ou grupos alcóxi C1 a C4, em que R_6 compreende, opcionalmente, uma ou mais ligações éter para $R_6 = C2$ a C7;

R_5 = um grupo hidrocarbila C1 a C6 linear, ramificado ou cíclico ou um grupo heteroaromático cíclico de cinco membros ou grupo aromático ou heteroaromático cíclico de seis membros, opcionalmente substituídos com grupos hidroxila; em que cada átomo de carbono em R_5 compreende individualmente não mais do que um grupo hidroxila, ou não mais do que um grupo éster ou grupo de ácido carboxílico; em que R_5 compreende, opcionalmente, uma ou mais ligações éter;

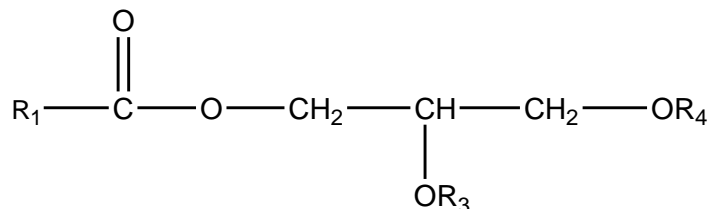
m = um número inteiro que varia de 1 ao número de átomos de carbono em R_5 ; e

em que os referidos ésteres possuem solubilidade em água de pelo menos 5 ppm a 25 °C.

[0084] Em outro exemplo de realização, R_6 = um grupo hidrocarbila C1 a C7 linear, opcionalmente substituído com grupos hidroxila ou grupos alcóxi C1 a C4, compreendendo opcionalmente uma ou mais ligações éter. Em um exemplo de realização adicional, R_6 = um grupo hidrocarbila C2 a C7 linear, opcionalmente substituído com grupos hidroxila, e/ou compreendendo opcionalmente uma ou mais ligações éter.

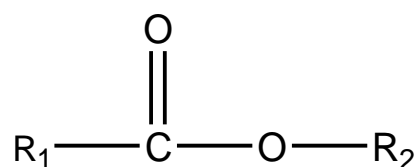
[0085] Em um exemplo de realização, o substrato adequado pode incluir o ácido 2-acetoxibenzóico, ácido 3-acetoxibenzóico, ácido 4-acetoxibenzóico, ou misturas dos mesmos.

[0086] Em outro exemplo de realização, os substratos adequados incluem um ou mais glicerídeos de fórmula:



em que R_1 = alquila C1 a C21 de cadeia linear ou cadeia ramificada opcionalmente substituída com um grupo hidroxila ou um grupo alcóxi C1 a C4; e R_3 e R_4 são, individualmente, H ou $\text{R}_1\text{C}(\text{O})$. Em um exemplo de realização, o substrato adequado é um glicerídeo da fórmula acima em que R_1 = alquila C1 a C7 de cadeia linear ou cadeia ramificada opcionalmente substituída com um grupo hidroxila ou um grupo alcóxi C1 a C4; e R_3 e R_4 são, individualmente, H ou $\text{R}_1\text{C}(\text{O})$.

Em outro aspecto, os substratos adequados também incluem um ou mais ésteres da fórmula:



em que R_1 = uma alquila C1 a C7 de cadeia linear ou cadeia ramificada opcionalmente substituída com um grupo hidroxila ou um grupo alcóxi C1 a C4 e R_2 = $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, $(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-O})_n\text{H}$, arila, alquilarila, alquil-heteroarila, heteroarila, alquinila, alquenila ou alquila C1 a C10 de cadeia linear ou cadeia ramificada, e n é de 1 a 10.

[0087] Os substratos adequados podem também incluir um ou mais sacarídeos acilados selecionados a partir do grupo que consiste em monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos acilados. Em outro exemplo de realização, os sacarídeos acilados são selecionados a partir do grupo consistindo em xilana acetilada, fragmentos de xilana acetilada, xilose acetilada (como tetra-acetato de xilose), glicose acetilada (como α -D penta-acetato de

glicose; penta-acetato de β -D-glicose), penta-acetato de β -D-galactose, hexa-acetato de sorbitol, octa-acetato de sacarose, β -D-ribofuranose-1,2,3,5-tetra-acetato, tri-O-acetil-D-galactal, tri-O-acetil-D-glucal, penta-acetato tetra-acetilxilofuranose, penta-acetato de α -D-glucopiranosose, α -D-manopiranosose, e celulose acetilada. Em um exemplo de realização preferido, o sacarídeo acetilado é selecionado do grupo consistindo em β -D-ribofuranose-1,2,3,5-tetra-acetato, tri-O-acetil-D-galactal, tri-O-acetil-D-glucal, octa-acetato de sacarose e celulose acetilada.

[0088] Em outro exemplo de realização, os substratos adequados são selecionados a partir do grupo que consiste em: monoacetina; diacetina; triacetina; monopropionina; dipropionina; tripropionina; monobutirina; dibutirina; tributirina; penta-acetato de glicose; tetra-acetato de xilose; xilana acetilada; fragmentos de xilana acetilada; β -D-ribofuranose-1,2,3,5-tetra-acetato; tri-O-acetil-D-galactal; tri-O-acetil-D-glucal; monoésteres ou diésteres de 1,2-etanodiol, 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, 1,2-butanodiol, 1,3-butanodiol, 2,3-butanodiol, 1,4-butanodiol, 1,2-pentanodiol, 2,5-pentanodiol, 1,6-pentanodiol, 1,2-hexanodiol, 2,5-hexanodiol, 1,6-hexanodiol; e misturas dos mesmos.

[0089] Em outro exemplo de realização, o éster de ácido carboxílico é selecionado a partir do grupo consistindo em monoacetina, diacetina, triacetina, e combinações das mesmas. Em outro exemplo de realização, o substrato é um polioliol C1 a C6 compreendendo um ou mais grupos éster. Em um exemplo de realização preferido, um ou mais dos grupos hidroxila existentes no polioliol C1 a C6 são substituídos com um ou mais grupos acetoxi (como diacetato de 1,3-propanodiol, diacetato de 1,4-butanodiol, etc). Em outro exemplo de realização, o substrato é o diacetato de propileno glicol (PGDA), diacetato de etileno glicol (EGDA), ou uma mistura dos mesmos.

[0090] Em outro exemplo de realização, os substratos adequados são selecionados a partir do grupo que consiste em acetato de etila; lactato de

metila; lactato de etila; glicolato de metila; glicolato de etila; metoxiacetato de metila; metoxiacetato de etila; metil-3-hidroxi-butirato; etil-3-hidroxi-butirato; citrato de 2-acetil trietila; penta-acetato de glicose; gliconolactona; glicérides (mono, di e triglicérides), como monoacetina, diacetina, triacetina, monopropionina, dipropionina (dipropionato de glicerina), tripropionina (1,2,3-tripropionilglicerol), monobutirina, dibutirina (dibutirato de glicerina), tributirina (1, 2,3-tributirilglicerol); sacarídeos acetilados; e misturas dos mesmos.

[0091] Em um exemplo de realização adicional, os substratos adequados são selecionados a partir do grupo que consiste em monoacetina, diacetina, triacetina, monopropionina, dipropionina, tripropionina, monobutirina, dibutirina, tributirina, acetato de etila, e lactato de etila. Em outro aspecto, o substrato é selecionado a partir do grupo que consiste em diacetina, triacetina, acetato de etila, e lactato de etila. Em um exemplo de realização mais preferido, o substrato adequado compreende triacetina.

[0092] O éster de ácido carboxílico está presente na formulação aquosa de reação, a uma concentração suficiente para produzir a concentração desejada de ácido peroxicarboxílico após a peridrólise catalisada por enzima. O éster de ácido carboxílico não precisa ser completamente solúvel na formulação de reação aquosa, mas deve possuir uma solubilidade suficiente para permitir a conversão do éster pelo catalisador perhidrolase no ácido peroxicarboxílico correspondente. O éster de ácido carboxílico está presente na formulação de reação aquosa a uma concentração de 0,0005% em peso a 40% em peso da formulação de reação aquosa, de preferência a uma concentração de 0,01% em peso a 20% em peso da formulação de reação aquosa, e mais preferencialmente em uma concentração de 0,05% em peso a 10% em peso da formulação de reação aquosa. A % em peso de éster de ácido carboxílico pode, opcionalmente, ser maior do que o limite de solubilidade do éster de ácido carboxílico, de modo a que a concentração do éster de ácido carboxílico seja de pelo menos 0,0005%

em peso da formulação de reação aquosa que é constituída por água, catalisador enzimático, e uma fonte de peróxido, em que a parte restante do éster de ácido carboxílico permaneça como uma segunda fase separada de uma formulação de reação de duas fases, aquosa/orgânica. Nem todo o éster de ácido carboxílico adicionado deve dissolver-se imediatamente na formulação de reação aquosa, e depois de uma mistura inicial de todos os componentes da reação, a mistura contínua ou descontínua adicional é opcional.

[0093] Os ácidos peroxicarboxílicos produzidos pelos presentes componentes da reação podem variar, dependendo dos substratos selecionados, desde que o catalisador enzimático presente seja utilizado. Em um exemplo de realização, o ácido peroxicarboxílico produzido é ácido peracético, ácido perpropiónico, ácido perbutírico, ácido perlático, ácido perglicólico, ácido permetoxiacético, ácido per- β -hidroxibutírico, ou misturas dos mesmos.

[0094] A fonte de peroxigênio pode incluir, mas não está limitada a, peróxido de hidrogênio, aduto de peróxido de hidrogênio (por exemplo, aduto de peróxido de hidrogênio-ureia (peróxido de carbamida)), sais de perborato e sais de percarbonato. Alternativamente, o peróxido de hidrogênio pode ser gerado *in situ* pela reação de um substrato e oxigênio catalisada por uma enzima possuindo atividade de oxidase (incluindo, mas não se limitando a, glicose oxidase, galactose oxidase, sorbitol oxidase, hexose oxidase, álcool oxidase, glicerol oxidase, monoamina oxidase, glicolato oxidase, lactato oxidase, piruvato oxidase, oxalato oxidase, colina oxidase, colesterol oxidase, piranose oxidase, carboxiálcool oxidase, ácido L-aminoácido-oxidase, glicina oxidase, glutamato oxidase, lisina oxidase, e uricase. A concentração do composto peroxigênio na formulação de reação aquosa pode variar de 0,0033% em peso a cerca de 50% em peso, de preferência de 0,033% em peso a cerca de 40% em peso, mais preferencialmente de 0,33% em peso a cerca de 30% em peso.

[0095] Muitos catalisadores perhidrolase (como células inteiras,

células inteiras permeabilizadas e extratos de células inteiras parcialmente purificadas) têm sido relatados por possuírem atividade catalase (EC 1.11.1.6). As catalases catalisam a conversão de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Em um aspecto, o catalisador enzimático possuindo atividade perhidrolase não tem atividade de catalase. Em outro aspecto, o catalisador enzimático possuindo atividade perhidrolase tem uma atividade de catalase suficientemente menor para que a presença da referida atividade catalase não interfira significativamente com a produção de ácido peroxicarboxílico catalisada pela perhidrolase. Em outro aspecto, um inibidor da catalase é adicionado à formulação de reação aquosa. Exemplos de inibidores da catalase incluem, mas não estão limitados a, azida sódica e sulfato de hidroxilamina. Um técnico hábil no assunto poderá ajustar a concentração de inibidor da catalase, conforme necessário. A concentração do inibidor da catalase geralmente varia de 0,1 mM a cerca de 1 M; de preferência cerca de 1 mM a cerca de 50 mM; mais preferivelmente de cerca de 1 mM a cerca de 20 mM. Em um aspecto, a concentração de azida sódica varia tipicamente de cerca de 20 mM a cerca de 60 mM, enquanto a concentração de sulfato de hidroxilamina é tipicamente de cerca de 0,5 mM a cerca de 30 mM, e preferencialmente cerca de 10 mM.

[0096] A atividade de catalase em uma célula hospedeira pode ser regulada negativamente ou eliminada perturbando a expressão do(s) gene(s) responsável(eis) pela atividade de catalase usando técnicas bem conhecidas, incluindo, mas não se limitando a, mutagênese de *transposon*, expressão de RNA *antisense*, mutagênese direcionada, mutagênese aleatória. Em um exemplo de realização preferido, o(s) gene(s) que codifica(m) a atividade de catalase endógena é(são) regulado(s) negativamente ou interrompido(s) (ou seja, nocauteados (*knocked-out*)). Conforme utilizado na presente invenção, um gene "interrompido" é um gene onde a atividade e/ou função da proteína codificada pelo gene não estão mais presentes. Meios para interromper um gene

são bem conhecidos no estado da técnica e podem incluir, mas não estão limitados a, inserções, deleções ou mutações do gene, desde que a atividade e/ou função da proteína correspondente não esteja mais presente. Em outro exemplo de realização preferido, o hospedeiro de produção é um hospedeiro de produção *E. coli* que compreende um gene catalase interrompido selecionado a partir do grupo que consiste em *katG* e *katE* (vide a Patente US 7.951.566 para DiCosimo *et al.*). Em outro exemplo de realização, o hospedeiro de produção é uma cepa de *E. coli* compreendendo uma regulação negativa e/ou interrompimento em ambos os genes da catalase, *katG* e *katE*. Uma cepa de *E. coli* compreendendo um nocaute duplo dos genes *katG* e *katE* foi preparada e é descrita como *E. coli* KLP18 (Patente US 7.951.566 para DiCosimo *et al.*).

[0097] A concentração do catalisador na formulação aquosa de reação depende da atividade catalítica específica do catalisador, e é escolhida para se obter a taxa de reação desejada. O peso de catalisador em reações de perhidrólise varia tipicamente de 0,0001 mg a 50 mg por mL de volume total de reação, de preferência de 0,0005 mg a 10 mg por mL, mais preferivelmente de 0,0010 mg a 2,0 mg por mL. O catalisador pode também ser imobilizado sobre um suporte utilizando métodos solúveis ou insolúveis bem conhecidos pelos técnicos hábeis no assunto; vide, por exemplo, *Immobilization of Enzymes and Cells*; (2ª Edição) José M. Guisan, Editor; Humana Press, Totowa, NJ, EUA; 2006. O uso de catalisadores imobilizados permite a recuperação e reutilização do catalisador nas reações subsequentes. O catalisador enzimático pode estar na forma de células microbianas inteiras, células microbianas permeabilizadas, extratos de células microbianas, enzimas parcialmente purificadas ou purificadas e misturas dos mesmos.

[0098] Em um aspecto, a concentração de ácido peroxicarboxílico gerado pela combinação de perhidrólise química e perhidrólise enzimática do éster de ácido carboxílico é suficiente para proporcionar uma concentração

eficaz de ácido peroxicarboxílico para desinfecção, branqueamento, sanitização, desodorização ou descoloração em um pH desejado. Em outro aspecto, o ácido peroxicarboxílico é gerado a uma concentração segura e eficaz, adequada para utilização em um produto para cuidados pessoais a ser aplicado nos cabelos, pele, unhas ou tecidos da cavidade oral, como o esmalte dos dentes, película do dente ou gengivas. Em outro aspecto, os métodos da presente invenção proporcionam combinações de enzimas e substratos de enzimas para produzir a concentração eficaz desejada de ácido peroxicarboxílico, em que, na ausência da enzima adicionada, há uma concentração significativamente inferior de ácido peroxicarboxílico produzido. Embora possa existir alguma perhidrólise química do substrato da enzima por meio de reação química direta de peróxido inorgânico com o substrato enzimático, pode não haver uma concentração suficiente de ácido peroxicarboxílico gerado para proporcionar uma concentração eficaz de ácido peroxicarboxílico nas aplicações desejadas, e um significativo aumento na concentração de ácido peroxicarboxílico total é obtida pela adição de uma perhidrolase catalisadora apropriada para a formulação de reação aquosa.

[0099] Em um aspecto da invenção, a concentração de ácido peroxicarboxílico gerado (por exemplo, ácido peracético) pela perhidrólise enzimática é, pelo menos, cerca de 2 ppm, de preferência pelo menos 20 ppm, preferencialmente pelo menos 100 ppm, mais preferencialmente pelo menos cerca de 200 ppm de ácido peroxicarboxílico, mais preferencialmente pelo menos 300 ppm, mais preferencialmente pelo menos 500 ppm, mais preferencialmente pelo menos 700 ppm, mais preferencialmente pelo menos cerca de 1000 ppm de ácido peroxicarboxílico, mais preferivelmente pelo menos cerca de 2000 ppm de ácido peroxicarboxílico, mais preferencialmente pelo menos 10.000 ppm de ácido peroxicarboxílico dentro de 5 minutos, mais preferencialmente dentro de 1 minuto após o início da reação enzimática da perhidrólise. Em um segundo aspecto da invenção, a concentração de ácido

peroxicarboxílico gerado (por exemplo, ácido peracético) pela perhidrólise enzimática é, pelo menos, cerca de 2 ppm, de preferência pelo menos 20 ppm, preferencialmente pelo menos 30 ppm, preferencialmente pelo menos 40ppm, mais preferencialmente pelo menos 50 ppm, preferencialmente pelo menos 60 ppm, mais preferencialmente pelo menos 70 ppm, mais preferencialmente pelo menos 80 ppm, mais preferencialmente pelo menos 100 ppm de ácido peroxicarboxílico dentro de 5 minutos, mais preferencialmente dentro de 1 minuto após o início da reação enzimática da perhidrólise (ou seja, o tempo medido a partir da combinação dos componentes de reação para formar a formulação).

[00100] A formulação aquosa compreendendo o ácido peroxicarboxílico pode ser opcionalmente diluída com diluente compreendendo água, ou uma solução essencialmente constituída por água, para produzir uma formulação com a baixa concentração-alvo de ácido peroxicarboxílico desejada. Em um aspecto, o tempo de reação necessário para produzir a concentração desejada (ou intervalo de concentração) de ácido peroxicarboxílico é de aproximadamente 20 minutos ou menos, de preferência cerca de 5 minutos ou menos, mais preferivelmente cerca de 1 minuto, ou menos.

[0100] Em outros aspectos, a superfície ou objeto inanimado contaminado com uma concentração de contaminante(s) biológico(s) é colocada em contato com o ácido peroxicarboxílico formado de acordo com os processos descritos na presente invenção dentro de cerca de 1 minuto até cerca de 168 horas a partir da combinação dos referidos componentes de reação, ou no prazo cerca de 1 minuto a cerca de 48 horas, ou no prazo de cerca de 1 minuto a 2 horas da combinação dos referidos componentes de reação, ou qualquer momento dentro desses intervalos de tempo.

[0101] Em outro aspecto, o ácido peroxicarboxílico formado de acordo com os processos descritos na presente invenção é usado em uma

aplicação de tratamento de roupas na qual o ácido peroxicarboxílico é colocado em contato com a roupa ou tecido para proporcionar um benefício, tal como desinfecção, branqueamento, descoloração, desodorização e/ou uma combinação dos mesmos. O ácido peroxicarboxílico pode ser utilizado em uma variedade de produtos de tratamento de roupas, incluindo, mas não se limitando a, tratamentos de pré-lavagem utilizados em lavanderias ou têxteis, detergentes ou aditivos, removedores de manchas, composições de branqueamento, composições desodorizantes e agentes de lavagem. Em um exemplo de realização, o presente processo para produzir um ácido peroxicarboxílico para uma superfície alvo é realizada *in situ*.

[0102] No contexto de aplicações de tratamento de roupas, o termo “contato de um artigo de vestuário ou têxtil” significa que o artigo de vestuário ou têxtil é exposto a uma formulação aqui divulgada. Para este fim, há uma série de formatos em que a formulação pode ser usada para tratar artigos de vestuário e têxteis, incluindo, mas não se limitando a, líquidos, sólidos, gel, pasta, barras, comprimidos, aerossóis, espuma, pó ou granulado e pode ser entregue pela dosagem manual, dosagem em unidade, dosagem a partir de um substrato, pulverização e dosagem automática a partir da máquina de lavar roupas ou secadora de roupas. As composições granulares também podem estar na forma compacta; composições líquidas também podem estar em uma forma concentrada.

[0103] Quando as formulações divulgadas na presente invenção são utilizadas em uma máquina de lavar roupa, a formulação pode ainda conter componentes típicos de detergentes para roupa. Por exemplo, os componentes típicos incluem, mas não estão limitados a, agentes tensoativos, agentes de branqueamento, ativadores de branqueamento, enzimas adicionais, supressores de espuma, dispersantes, dispersante de sabão de cálcio, agentes de suspensão de solo e agentes de anti-redeposição, agentes de amaciamento,

inibidores de corrosão, inibidores de manchas, germicidas, agentes de ajuste do pH, fontes de alcalinidade não estruturantes, agentes quelantes, agentes de enchimento orgânicos e/ou inorgânicos, solventes, hidrótropos, brilhantadores óticos, corantes e perfumes. As formulações aqui descritas podem também ser usadas como produtos aditivos de detergentes na forma sólida ou líquida. Estes produtos aditivos são destinados a complementar ou aumentar o desempenho de composições detergentes convencionais e podem ser adicionados em qualquer fase do processo de limpeza.

[0104] No âmbito dos atuais sistemas e métodos para o tratamento de roupa, onde o perácido é gerado para uma ou mais finalidades dentre descoloração, remoção de manchas e redução do odor, a concentração de perácido gerado (por exemplo, ácido peracético) pela perhidrólise a partir de pelo menos um éster de ácido carboxílico pode ser de pelo menos cerca de 2 ppm, de preferência pelo menos 20 ppm, preferencialmente pelo menos 100 ppm, e mais preferencialmente pelo menos cerca de 200 ppm de perácido. No âmbito dos atuais sistemas e métodos para o tratamento de roupa, onde o perácido é gerado para os propósitos de desinfecção ou sanitização, a concentração de perácido gerado (por exemplo, ácido peracético) pela perhidrólise de pelo menos um éster de ácido carboxílico pode ser pelo menos de cerca de 2 ppm, mais preferencialmente pelo menos 20 ppm, mais preferencialmente pelo menos 200 ppm, mais preferencialmente pelo menos 500 ppm, mais preferencialmente pelo menos 700 ppm, mais preferencialmente pelo menos 1000 ppm de perácido, mais preferencialmente pelo menos 2000 ppm de perácido em 10 minutos, de preferência dentro de 5 minutos, e mais preferencialmente dentro de 1 minuto após o início da reação de perhidrólise. A formulação do produto compreendendo o perácido pode ser opcionalmente diluída com diluente compreendendo água, ou uma solução essencialmente constituída de água, para produzir uma formulação com a concentração de perácido mais baixa desejada. Em um

aspecto dos presentes métodos e sistemas, o tempo de reação necessário para produzir a concentração desejada de perácido não é superior a cerca de duas horas, de preferência não superior a cerca de 30 minutos, mais preferivelmente não superior a cerca de 10 minutos, ainda mais preferencialmente não superior a cerca de 5 minutos, e mais preferivelmente cerca de 1 minuto ou menos.

[0105] A temperatura da reação é escolhida para controlar tanto a velocidade da reação quanto a estabilidade da atividade do catalisador enzimático. A temperatura da reação pode variar entre um pouco acima do ponto de congelamento da formulação de reação aquosa (cerca de 0 °C) a cerca de 85 °C, com uma faixa de temperatura de reação preferida de cerca de 5 °C até cerca de 75 °C.

[0106] O pH da formulação de reação aquosa enquanto produz enzimaticamente o ácido peroxicarboxílico é mantida a um pH variando entre cerca de 5,0 a cerca de 10,0, de preferência cerca de 6,5 a cerca de 8,5, e ainda mais preferencialmente cerca de 6,5 a cerca de 7,5. Em um exemplo de realização, o pH da formulação de reação aquosa varia de cerca de 6,5 a cerca de 8,5 por pelo menos 30 minutos após a combinação dos componentes de reação. O pH da formulação de reação aquosa pode ser modificado ou controlado pela adição ou incorporação de um tampão adequado, incluindo, mas não se limitando a, fosfato, pirofosfato, bicarbonato, acetato ou citrato. Em um exemplo de realização, o tampão é selecionado a partir de um tampão fosfato, um tampão de bicarbonato, ou um tampão formado pela combinação de água 'dura' (água da torneira para simular as aplicações de tratamento de roupa) e percarbonato (a partir de percarbonato de sódio utilizado para gerar peróxido de hidrogênio). A concentração de tampão, quando empregado, é, tipicamente, de 0,1 mM a 1,0 M, de preferência a partir de 1 mM a 300 mM, mais preferencialmente entre 10 mM a 100 mM. Em outro aspecto da presente invenção, nenhum tampão é adicionado à mistura de reação enquanto há

produção de ácido peroxicarboxílico de maneira enzimática.

[0107] Em ainda outro aspecto, a formulação de reação aquosa de perhidrólise enzimática poderá conter um solvente orgânico que atua como um agente de dispersão para melhorar a velocidade de dissolução do éster de ácido carboxílico na reação de formulação aquosa. Tais solventes incluem, mas não estão limitados a, éter metílico de propileno glicol, acetona, ciclo-hexanona, éter butílico de dietileno glicol, éter metílico de tripropileno glicol, éter metílico de dietileno glicol, éter butílico de propileno glicol, éter metílico de dipropileno glicol, ciclo-hexanol, álcool benzílico, isopropanol, etanol, propileno glicol, e misturas dos mesmos.

[0108] Em outro aspecto, o produto da perhidrólise enzimática pode conter componentes adicionais que proporcionam a funcionalidade desejável. Estes componentes adicionais incluem, mas não estão limitados a, tampões, adjuvantes da detergência, agentes espessantes, emulsionantes, tensoativos, agentes umectantes, inibidores da corrosão (por exemplo, benzotriazol), estabilizantes de enzimas e estabilizantes de peróxidos (por exemplo, agentes quelantes de íons metálicos). Muitos dos componentes adicionais são bem conhecidos na indústria de detergentes (vide, por exemplo, a Patente US 5.932.532; incorporada ao presente pela referência). Exemplos de emulsionantes incluem, mas não estão limitados a, álcool polivinílico ou polivinilpirrolidona. Exemplos de agentes espessantes incluem, mas não estão limitados a, LAPONITE[®] RD (silicato sintético em camadas), amido de milho, PVP, CARBOWAX[®] (polietileno glicol e/ou metoxipolietilenoglicol), CARBOPOL[®] (polímero do ácido poliacrílico), CABOSIL[®] (dióxido de silício fumado amorfo sintético), polissorbato 20, PVA, e lecitina. Exemplos de sistemas de tamponamento incluem, mas não estão limitados a, fosfato de sódio monobásico/fosfato de sódio dibásico; ácido sulfâmico/trietanolamina; ácido cítrico/trietanolamina; ácido tartárico/trietanolamina; ácido

succínico/trietanolamina; e ácido acético/trietanolamina. Exemplos de tensoativos incluem, mas não estão limitados a, a) tensoativos não iônicos, tais como copolímeros em bloco de óxido de etileno ou óxido de propileno etoxilado ou alcoóis primários e secundários lineares e ramificados propoxilados, e os óxidos de fosfina alifáticos; b) agentes tensoativos catiônicos tais como compostos de amônio quaternário, compostos de amônio quaternário em particular que possuem um grupo alquila C₈–C₂₀ ligado a um átomo de nitrogênio, adicionalmente ligado a três grupos alquila C₁–C₂; c) tensoativos aniônicos tais como ácidos carboxílicos de alcanos (por exemplo, ácidos graxos C₈–C₂₀), fosfonatos de alquila, sulfonatos de alcano (por exemplo, dodecil sulfato de sódio “SDS”), ou sulfonatos de alquil benzeno de cadeia linear ou ramificada, sulfonatos de alceno; e d) anfotéricos e zwitteriônicos como os ácidos aminocarboxílicos, ácidos aminodicarboxílico alquilbetaínas, e misturas dos mesmos. Os componentes adicionais podem incluir fragrâncias, corantes, estabilizantes de peróxido de hidrogênio (por exemplo, quelantes de metais, tais como ácido 1-hidroxietilideno-1,1-difosfônico (Dequest[®] 2010, Solutia Inc., St. Louis, MO) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)), TURPINAL[®] SL (ácido etidrônico), Dequest[®] 0520 (fosfonato), Dequest[®] 0531 (fosfonato), estabilizantes da atividade enzimática (por exemplo, polietileno glicol (PEG)) e detergentes.

[0109] Em outro aspecto, o produto da perhidrólise enzimática pode ser pré-misturado para gerar a concentração desejada de ácido peroxicarboxílico antes do contato com a superfície ou objeto inanimado a ser desinfetado.

[0110] Em outro aspecto, o produto da perhidrólise enzimática não é pré-misturado para gerar a concentração desejada de ácido peroxicarboxílico, antes do contato da superfície ou objeto inanimado a ser desinfetado, mas em vez disso, os componentes da formulação de reação aquosa que geram a concentração desejada de ácido peroxicarboxílico são colocados em contato

com a superfície ou objeto inanimado a ser desinfetado e/ou branqueado ou descorado, gerando a concentração desejada de ácido peroxicarboxílico. Em alguns exemplos de realização, os componentes da formulação de reação aquosa são combinados ou misturados no local. Em alguns exemplos de realização, os componentes de reação são entregues ou aplicados ao locus e subsequentemente misturados ou combinados para gerar a concentração desejada de ácido peroxicarboxílico.

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS PEROXICARBOXÍLICOS USANDO UM PERHIDROLASE

CATALISADORA

[0111] Os ácidos peroxicarboxílicos, uma vez produzidos, são muito reativos e podem diminuir em concentração ao longo de períodos de tempo maiores, dependendo de variáveis, que incluem, mas não se limitam a temperatura e pH. Dessa forma, pode ser desejável manter os vários componentes da reação separados, especialmente para formulações líquidas. Em um aspecto, a fonte de peróxido de hidrogênio é separada de qualquer substrato ou perhidrolase catalisadora, de preferência é separada a partir de ambos. Isto pode ser conseguido utilizando uma variedade de técnicas incluindo, mas não se limitando ao uso de dispensadores com câmaras de múltiplos compartimentos (Patente US 4.585.150) e, no momento da utilização, ocorre a combinação física da perhidrolase catalisadora com uma fonte de peróxigênio (tal como peróxido de hidrogênio) e os presentes substratos para iniciar a reação enzimática aquosa de perhidrólise. O catalisador perhidrolase pode opcionalmente ser imobilizado dentro do corpo da câmara de reação ou separado (por exemplo, filtrado, etc) a partir do produto de reação que compreende o ácido peroxicarboxílico antes do contato com a superfície e/ou objeto alvo de tratamento. O catalisador perhidrolase pode ser em uma matriz líquida ou estar na forma sólida (por exemplo, pó ou comprimido) ou pode estar incorporado dentro de uma matriz sólida que é, subsequentemente, misturada

com o substrato para iniciar a reação enzimática da perhidrólise. Em um aspecto adicional, a perhidrolase catalisadora pode estar contida dentro de um saco solúvel ou poroso que pode ser adicionada à matriz de substrato aquoso para iniciar a perhidrólise enzimática. Ainda em outro aspecto adicional, o catalisador pode compreender a perhidrolase contida dentro de um compartimento separado de uma bolsa solúvel ou porosa que tem pelo menos um compartimento adicional para o conteúdo de contenção compreendendo o substrato éster e/ou a fonte de peróxido. Em um aspecto adicional, um pó que compreende o catalisador enzimático é suspenso no substrato (por exemplo, triacetina), e no momento da utilização é misturado com uma fonte de peroxigênio em água.

MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO

PEROXICARBOXÍLICO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

[0112] Uma variedade de métodos de análise pode ser utilizada no presente método para analisar os reagentes e produtos, incluindo, mas não se limitando a, titulação, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (GC), espectroscopia de massa (MS), eletroforese capilar (CE), procedimento analítico de HPLC descrito por U. Karst *et al.* (*Anal. Chem.*, 69 (17): 3623-3627 (1997)), e o ensaio de 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotazolina)-6-sulfonato (ABTS) (vide U. Pinkernell *et al.*, *The Analyst*. 122: 567-571 (1997); Minning S., *et al.*, *Analytica Chimica Acta* 378:293-298 (1999) e WO 2004/058961 A1), tal como descrito na patente US 7.951.566.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BIOCIDA MÍNIMA DE ÁCIDOS

PEROXICARBOXÍLICOS

[0113] O método descrito por J. Gabrielson *et al.* (*J. Microbiol. Methods* 50: 63-73 (2002)) pode ser utilizado para determinação da concentração biocida mínima (MBC) de ácidos peroxicarboxílicos, ou peróxido de hidrogênio e substratos de enzimas. O método de ensaio é baseado na inibição da redução de XTT, onde XTT (2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-5-

[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio, sal interno, sal monossódico) é um corante redox que indica a atividade respiratória microbiana por uma alteração na densidade óptica (OD) mensurada a 490 nm ou 450 nm. No entanto, há uma grande variedade de outros métodos disponíveis para testar a atividade de desinfetantes e antissépticos incluindo, mas não se limitando a, contagens de placas viáveis, contagens microscópicas diretas, peso seco, medições da turbidimetria, absorvância e bioluminescência (vide, por exemplo, Brock, Semour S., *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 5ª edição, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, EUA, 2001).

USOS DE COMPOSIÇÕES DE ÁCIDO PEROXICARBOXÍLICO ENZIMATICAMENTE

PREPARADO

[0114] O ácido peroxicarboxílico gerado pelo catalisador enzimático produzido de acordo com o presente método pode ser utilizado em uma variedade de aplicações em superfície dura/objeto inanimado para a redução das concentrações de contaminantes biológicos, tal como a descontaminação de instrumentos médicos (por exemplo, endoscópios), têxteis (tais como vestimentas e tapetes), superfícies de preparação de alimentos, equipamentos de armazenamento de alimentos e embalagens de alimentos, materiais utilizados para a embalagem de produtos alimentares, incubadoras de frangos e instalações como criadouros, clausuras animais, e águas utilizadas em processos que têm atividade microbiana e/ou virídica. Os ácidos peroxicarboxílicos gerados por enzimas podem ser usados em formulações destinadas para inativar os príons (por exemplo, certas proteases) para fornecer adicionalmente a atividade biocida (vide a Patente US 7.550.420 para DiCosimo *et al.*).

[0115] Em um aspecto, a composição de ácido peroxicarboxílico é útil como um agente de desinfecção de instrumentos médicos não autoclaváveis e equipamento de embalagem de alimentos. Como a formulação contendo ácido

peroxicarboxílico pode ser preparada utilizando GRAS (geralmente reconhecido como seguro) ou componentes de qualidade alimentar (enzima, substrato enzimático, peróxido de hidrogênio, e tampão), o ácido peroxicarboxílico gerada por enzima também pode ser usado para a descontaminação de carcaças de animais, carne, frutas e legumes, ou para a descontaminação de alimentos preparados. O ácido peroxicarboxílico gerado por enzima pode ser incorporado em um produto cuja forma final é um líquido, pó, gel, filme, sólido ou aerossol. O ácido peroxicarboxílico gerado pela enzima pode ser diluído para uma concentração que ainda provê uma descontaminação eficaz.

[0116] As composições que compreendem uma concentração eficaz de ácido peroxicarboxílico podem ser usadas para desinfetar as superfícies e/ou objetos contaminados (ou suspeitos de estarem contaminados) com contaminantes biológicos, tais como contaminantes microbianos patogênicos, pelo contato da superfície ou objeto com os produtos produzidos pelos presentes processos. Conforme utilizado na presente invenção, “contatar” refere-se à colocação de uma composição de desinfecção que compreende uma concentração eficaz do ácido peroxicarboxílico em contato com a superfície ou objeto inanimado suspeito de contaminação com um contaminante biológico durante um período de tempo suficiente para limpar e desinfetar. Contatar inclui a pulverização, tratamento, imersão, lavagem, verter sobre ou dentro, misturar, combinar, pintar, revestir, aplicar, fixar e de outro modo colocar em contato a solução de ácido peroxicarboxílico ou composição que compreende uma concentração eficaz de ácido peroxicarboxílico, ou uma solução ou composição que forma uma concentração eficaz de ácido peroxicarboxílico, com a superfície ou objeto inanimado suspeito de estar contaminado com uma concentração de um contaminante biológico. As composições desinfetantes podem ser combinadas com uma composição de limpeza, para proporcionar tanto a limpeza quanto a desinfecção. Alternativamente, um agente de limpeza (por exemplo, um

tensoativo ou detergente), pode ser incorporado na formulação para proporcionar a limpeza e desinfecção em uma única composição.

[0117] As composições que compreendem uma concentração eficaz de ácido peroxicarboxílico também podem conter pelo menos um agente antimicrobiano adicional, combinações de proteases que degradam a príons, um virucida, um esporicida, ou um biocida. Combinações desses agentes com o ácido peroxicarboxílico produzido pelos processos reivindicados podem fornecer efeitos aumentados e/ou sinérgicos quando usados para limpar e desinfetar superfícies e/ou objetos contaminados (ou suspeitos de estarem contaminados) com contaminantes biológicos. Os agentes antimicrobianos adequados incluem ésteres carboxílicos (por exemplo, *p*-hidroxi-alqui-benzoatos e cinamatos de alquila); ácidos sulfônicos (por exemplo, ácido dodecilbenzeno sulfônico.); compostos de iodo ou compostos halogenados ativos (por exemplo, halogênios elementares, óxidos de halogênio (por exemplo, NaOCl, HOCl, HOBr, ClO₂), iodo, interhaletos (por exemplo, monocloreto de iodo, dicloreto de iodo, tricloreto de iodo, tetracloreto de iodo, cloreto de bromo, monobrometo de iodo, dibrometo de iodo), poli-halogenados, sais de hipoclorito, ácido hipocloroso, sais de hipobromito, ácido hipobromoso, hidantoínas de cloro e bromo, dióxido de cloro e clorito de sódio); peróxidos orgânicos, incluindo peróxido de benzoíla, peróxido de alquilbenzoíla, ozônio, geradores de oxigênio singlete, e misturas dos mesmos; derivados fenólicos (por exemplo, *o*-fenil fenol, *o*-benzil-*p*-clorofenol, *terc*-amil-fenol e benzoatos hidroxí alquila C₁-C₆); compostos quaternários de amônio (por exemplo, cloreto de amônio, cloreto de alquildimetilbenzilamônio, cloreto de dialquildimetilamônio e misturas dos mesmos); e misturas de tais agentes antimicrobianos, em uma quantidade suficiente para proporcionar o grau desejado de proteção microbiana. As quantidades eficazes de agentes antimicrobianos incluem cerca de 0,001% em peso a cerca de 60% em peso de agente antimicrobiano, cerca de 0,01% em peso a cerca de 15% em peso de

agente antimicrobiano, ou cerca de 0,08% em peso a cerca de 2,5% em peso de agente antimicrobiano.

[0118] Em um aspecto, os ácidos peroxicarboxílicos formadas pelo processo pode ser usado para reduzir a concentração de contaminantes biológicos viáveis (como uma população microbiana), quando aplicados sobre e/ou em um determinado local. Conforme utilizado na presente invenção, um “local” compreende parte ou a totalidade de uma superfície alvo adequada para a desinfecção ou branqueamento. As superfícies-alvo incluem todas as superfícies que podem estar contaminadas com contaminantes biológicos. Exemplos não limitantes incluem superfícies de equipamentos encontrados na indústria alimentícia ou de bebidas (tais como tanques, transportadores, pisos, ralos, refrigeradores, congeladores, superfícies de equipamentos, paredes, válvulas, correias, tubos, ralos, juntas, fendas, e combinações dos mesmos, e similares); superfícies do edifício (tais como paredes, pisos e janelas); não indústria não alimentícia relacionadas com tubos e drenos, incluindo instalações de tratamento de água, piscinas e spas, e tanques de fermentação; superfícies hospitalares e veterinárias (tais como paredes, pisos, camas, equipamentos (tais como endoscópios), roupas usadas em ambientes de saúde/veterinários ou outros hospitais, incluindo roupas, esfregões, sapatos, e outras superfícies em hospital ou local veterinário); superfícies em restaurantes; superfícies em banheiros; sanitários; roupas e sapatos; superfícies em celeiros ou estábulos para animais, como aves, gado, vacas leiteiras, cabras, cavalos e porcos; incubadoras para aves ou camarão; e superfícies encontradas na área farmacêutica ou biofarmacêutica (por exemplo, equipamentos farmacêuticos ou de fabricação de produtos biofarmacêuticos, ingredientes farmacêuticos ou biofarmacêuticos, excipientes farmacêuticos ou biofarmacêuticos). Superfícies duras adicionais incluem produtos alimentícios, tais como carne, frango, carne de porco, legumes, frutas, frutos do mar e combinações dos mesmos, e

similares. O local também pode incluir materiais absorventes de água, tais como lençóis infectados ou outros produtos têxteis. O local também inclui plantas colhidas ou produtos vegetais, sementes, rizomas, tubérculos, frutas e legumes, plantas cultivadas e especialmente cultivares em crescimento, incluindo cereais, vegetais folhosos e cultivares para salada, vegetais de raiz, legumes, frutas de coleta, frutas cítricas e frutas duras.

[0119] Os exemplos não limitantes de materiais de superfície dura são os metais (por exemplo, aço, aço inoxidável, cromo, titânio, ferro, cobre, latão, alumínio e suas ligas), minerais (por exemplo, concreto), polímeros e plásticos (por exemplo, poliolefinas, tais como polietileno, polipropileno, poliestireno, poli(met)acrilato, poliacrilonitrila, polibutadieno, poli(acrilonitrila, butadieno, estireno), poli (acrilonitrilo, butadieno), acrilonitrila butadieno; poliésteres como tereftalato de polietileno, e poliamidas como o *nylon*). As superfícies adicionais incluem tijolo, azulejo, cerâmica, porcelana, madeira, pasta de madeira, papel, vinil, linóleo, e carpetes.

[0120] Os ácidos peroxicarboxílicos formados pelo presente processo podem ser usados para fornecer um benefício para um artigo de vestuário ou um tecido, incluindo, mas não se limitando a, desinfecção, sanitização, branqueamento, descoloração e desodorização. O ácido peroxicarboxílico formado pelo presente processo pode ser utilizado em qualquer número de produtos de tratamento de roupas, incluindo, mas não se limitando a, tratamentos de pré-lavagem têxtil, detergentes para roupas, aditivos ou detergentes para roupas, removedores de manchas, composições de branqueamento, composições desodorizantes e agentes de lavagem, para citar apenas alguns.

[0121] Os ácidos peroxicarboxílicos formados pelo presente processo podem ser utilizados em uma ou mais etapas do processo de branqueamento/deslignificação da polpa de madeira ou polpa de papel

(celulose), particularmente quando o ácido peracético é utilizado (por exemplo, vide a Patente EP 1040222 B1 e Patente US 5.552.018 para Devenyns, J.).

APLICAÇÕES DE CUIDADOS PESSOAIS

[0122] As enzimas perhidrolítica descritas na presente invenção podem ser utilizadas para produzir um agente de benefício de perácido para aplicações pessoais, tais como cuidados com os cabelos (branqueamento, depilatório), cuidados com a pele (clareamento da pele, antimicrobianos), e aplicações de higiene bucal (branqueamento/clareamento de dentes ou antissépticos), para citar alguns. As composições e métodos descritos na presente invenção podem ainda compreender um ou mais componentes cosmeticamente ou dermatologicamente aceitáveis conhecidos ou de outro modo eficazes para a utilização em cuidados de cabelo, cuidados da pele, unhas ou outros produtos de higiene pessoal, desde que os componentes opcionais sejam fisicamente e quimicamente compatíveis com os componentes essenciais descritos na presente invenção, ou de outra forma não prejudiquem indevidamente a estabilidade do produto, estética ou desempenho. Exemplos não limitantes de tais componentes opcionais são descritos no *International Cosmetic Ingredient Dictionary*, Nona Edição, 2002, e *CTFA Cosmetic Ingredient Handbook*, Décima Edição, 2004.

[0123] Em um exemplo de realização, o veículo dermatologicamente/cosmeticamente aceitável pode compreender desde cerca de 10% em peso a cerca de 99,9% em peso, alternativamente a partir de cerca de 50% em peso a cerca de 95% em peso, e alternativamente a partir de cerca de 75% em peso a cerca de 95% em peso de um veículo dermatologicamente aceitável. Os veículos adequados para utilização com a(s) composição(s) podem incluir, por exemplo, aqueles usados na formulação de aerossóis, *mousses*, tônicos, géis, loções, hidratantes da pele, e condicionadores *leave-on* (sem enxague). O veículo pode compreender água; óleos orgânicos; silicones, tais como os silicones voláteis,

gomas de silicone ou óleos amino ou não amino, e misturas dos mesmos; óleos minerais; óleos vegetais tais como óleo de oliva, óleo de rícino, óleo de colza, óleo de coco, óleo de gérmen de trigo, óleo de amêndoas, óleo de abacate, óleo de macadamia, óleo de damasco, óleo de cártamo, óleo de noqueira, óleo de linho falso, óleo tamanu, óleo de limão e misturas dos mesmos; ceras; compostos orgânicos, tais como alcanos C₂-C₁₀, acetona, metiletil cetona, alcoóis voláteis orgânicos C₁-C₁₂, ésteres de alcoóis (sabendo-se que a escolha do(s) éster(es) pode ser dependente se ele(s) pode(m) ou não agir como um substrato de éster de ácido carboxílico para as perhidrolases) C₁-C₂₀, e alcoóis C₁-C₈, tais como acetato de metila, acetato de butila, acetato de etila, e miristato isopropílico, dimetoxietano, dietoxietano, alcoóis graxos C₁₀-C₃₀, tais como álcool laurílico, álcool cetílico, álcool estearílico, e álcool beenílico; ácidos graxos C₁₀-₃₀ tais como ácido láurico e ácido esteárico; amidas graxas C₁₀-₃₀ como dietanolamida de ácido láurico; ésteres alquílicos graxos C₁₀-C₃₀, tais como benzoatos de alquila graxos C₁₀-C₃₀; hidroxipropilcelulose, e as misturas dos mesmos. Em um exemplo de realização, o veículo compreende água, alcoóis graxos, alcoóis orgânicos voláteis, e misturas dos mesmos.

[0124]A(s) composição(ões) da presente invenção pode(m) ainda compreender desde cerca de 0,1% a cerca de 10%, e alternativamente a partir de cerca de 0,2% a cerca de 5,0% de um agente de gelificação para auxiliar a proporcionar a viscosidade desejada para a(s) composição(ões). Exemplos não limitantes de agentes gelificantes opcionais adequados incluem os polímeros de ácido carboxílico reticulados; polímeros de ácido carboxílico reticulados não neutralizados; polímeros de ácido carboxílico reticulados modificados não neutralizados; copolímeros de etileno/anidrido maleico reticulados; copolímeros de etileno/anidrido maleico reticulados não neutralizados (por exemplo, EMA 81 comercialmente disponível pela Monsanto); copolímeros de éter de alquila/acrilato reticulados não neutralizados (por exemplo, SALCARE SC90™ comercialmente disponível

pela Allied Colloids); copolímeros de poliacrilato de sódio reticulados não neutralizados, óleo mineral, e PEG-1 trideceth-6 (por exemplo, SALCARE SC91™ comercialmente disponível pela Allied Colloids); copolímeros de éter metilvinílico e anidrido maleico reticulados não neutralizados (por exemplo, copolímero STABILEZE™ QM-PVM comercialmente disponível pela International Specialty Products/MA); polímeros de celulose hidrofobicamente modificados não iônicos; polímeros de uretano etoxilados hidrofobicamente modificados (por exemplo, “UCARE™ Polyphobe Series” polímeros dilatáveis alcalinos comercialmente disponíveis pela *Union Carbide*); e combinações dos mesmos. Neste contexto, o termo “não neutralizado” significa que os materiais do agente gelificante polímero e copolímero opcionais contêm monômeros de ácido não neutralizados. Os agentes gelificantes preferidos incluem copolímeros de etileno/anidrido maleico reticulados não neutralizados e solúveis em água, polímeros de ácido carboxílico reticulados não neutralizados e solúveis em água, polímeros de celulose hidrofobicamente modificados não iônicos e solúveis em água e tensoativo/redes de gel de álcool graxo, tais como aqueles que são adequados para utilização em produtos de condicionamento do cabelo.

EXPRESSÃO MICROBIANA RECOMBINANTE

[0125] Os genes e produtos gênicos das sequências da presente invenção podem ser produzidos em células hospedeiras heterólogas, particularmente em células hospedeiras microbianas. As células hospedeiras preferidas para a expressão heteróloga de genes e moléculas de ácido nucleico da presente invenção são hospedeiros microbianos que podem ser encontrados dentro da família de fungos ou bacteriana e que crescem sobre uma ampla faixa de temperatura, valores de pH, e tolerâncias de solventes. Por exemplo, está contemplado que qualquer bactérias, levedura e fungo filamentoso pode ser adequadamente o hospedeiro de expressão das moléculas de ácido nucleico da

presente invenção. A perhidrolase pode ser expressa de maneira intracelular, extracelular, ou uma combinação de ambas, intracelular e extracelular, onde a expressão extracelular torna a recuperação da proteína desejada a partir de um produto da fermentação mais fácil do que os métodos para a recuperação da proteína produzida por expressão intracelular. A transcrição, tradução e o aparato biossintético de proteína mantém-se invariável em relação à matéria-prima celular utilizada para gerar a biomassa celular; genes funcionais serão expressos independentemente. Exemplos de cepas hospedeiras incluem, mas não se limitam a, fungos ou leveduras, espécies bacterianas, tais como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Phaffia*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Yarrowia*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Zymomonas*, *Agrobacterium*, *Erythrobacter*, *Chlorobium*, *Chromatium*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Rhodobacter*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Corynebacteria*, *Mycobacterium*, *Deinococcus*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylosinus*, *Methylomicrobium*, *Methylocystis*, *Alcaligenes*, *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Anabaena*, *Thiobacillus*, *Methanobacterium*, *Klebsiella* e *Myxococcus*. Em um exemplo de realização, as cepas bacterianas hospedeiras incluem *Escherichia*, *Bacillus* e *Pseudomonas*. Em um exemplo de realização preferido, a célula hospedeira bacteriana é *Bacillus subtilis* ou *Escherichia coli*.

PRODUÇÃO INDUSTRIAL

[0126] Uma grande variedade de metodologias de cultivo pode ser aplicada para produzir a perhidrolase catalisadora. A produção em grande escala de um produto gênico específico superexpresso a partir de um hospedeiro microbiano recombinante pode ser produzida pelas metodologias de cultivo em fermentação descontínua (*batch*), fermentação descontínua alimentada (*fed-batch*) ou contínua. Os métodos de cultivo utilizando fermentações descontínuas

(*Batch*) e descontínuas alimentadas (*Fed-Batch*) são comuns e bem conhecidos no estado da técnica e exemplos podem ser encontrados em Thomas D. Brock em *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Segunda Edição, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1989), ou em Deshpande, Mukund V., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 36:227 (1992).

[0127] Em um exemplo de realização, a produção comercial do catalisador perhidrolase desejado é conseguida com uma cultura contínua. A cultura contínua é um sistema aberto onde um meio de cultura definido é acrescentado continuamente a um reator e uma quantidade igual de meio condicionado é removido ao mesmo tempo para o processamento. A cultura contínua geralmente mantém as células em uma densidade em fase líquida constantemente elevada, em que as células estão essencialmente na fase de crescimento logarítmico. Alternativamente, a cultura contínua pode ser praticada com células imobilizadas em que o carbono e nutrientes são continuamente adicionados e os produtos valiosos, subprodutos ou produtos residuais são continuamente removidos da massa celular. A imobilização de células pode ser realizada utilizando uma vasta gama de suportes sólidos compostos de fibras naturais e/ou materiais sintéticos.

[0128] A recuperação dos catalisadores da perhidrolase desejados a partir de uma cultura descontínua ou descontínua-alimentada ou contínua pode ser realizada por qualquer um dos métodos conhecidos pelos técnicos hábeis no assunto. Por exemplo, quando o catalisador enzimático é produzido intracelularmente, a pasta celular é separada do meio de cultura por centrifugação ou filtração por membrana, opcionalmente, lavada com água ou um tampão aquoso em um pH desejado, em seguida, uma suspensão da pasta de células em tampão aquoso a um pH desejado é homogeneizada para produzir um extrato celular que contém o catalisador enzimático desejado. O extrato de células pode ser opcionalmente filtrado com o auxílio de filtro apropriado, tal

como Celite, ou sílica para remover os restos celulares antes de uma fase de tratamento térmico para precipitar a proteína não desejada a partir da solução de catalisador enzimático. A solução que contém o catalisador enzimático desejado pode então ser separada a partir dos detritos celulares precipitados e a proteína produzida durante a fase de tratamento térmico por meio de filtração em membrana ou por centrifugação, e a solução resultante de catalisador enzimático parcialmente purificado concentrada por filtração em membrana adicional, em seguida, opcionalmente misturada com um excipiente adequado (por exemplo, maltodextrina, trealose, sacarose, lactose, sorbitol, manitol, tampão fosfato, tampão citrato, ou misturas dos mesmos) e seca por pulverização para produzir um sólido em pó que compreende o catalisador enzimático desejado. Alternativamente, a solução de catalisador enzimático parcialmente purificado resultante preparada conforme descrito acima pode ser, opcionalmente, concentrada por filtração em membrana adicional, e a solução de catalisador enzimático parcialmente purificado ou concentrada resultante é então opcionalmente misturada com um ou mais agentes estabilizantes (por exemplo, glicerol, sorbitol, propileno glicol, 1,3-propanodiol, polióis, polióis poliméricos, álcool polivinílico ou misturas dos mesmos), um ou mais sais (por exemplo, cloreto de sódio, sulfato de sódio, cloreto de potássio, sulfato de potássio, ou misturas dos mesmos), e um ou mais biocidas, e mantida como uma solução aquosa até a utilização.

[0129] Quando uma quantidade, concentração, ou outro valor ou parâmetro é realizado tanto como um intervalo, faixa preferida, ou lista de valores superiores e valores inferiores preferidos, deve ser entendido como divulgando especificamente todos os intervalos formados por qualquer par de limites superior ou valor preferido e inferior ou valor preferido, independentemente se as escalas são divulgadas separadamente. Se um intervalo de valores numéricos é descrito, a menos que indicado de outra forma, o intervalo tem a

intenção de incluir os pontos finais destes, e todos os inteiros e frações dentro do intervalo. Não é pretendido que o escopo seja limitado aos valores específicos citados na definição de um intervalo.

MÉTODOS GERAIS

[0130] Os exemplos a seguir são fornecidos para demonstrar diversas formas de realização. Será reconhecido pelos especialistas na técnica que as técnicas divulgadas nos exemplos que a seguir representam técnicas descobertas pelo inventor para funcionar bem na prática dos métodos aqui descritos, e assim podem ser consideradas como constituindo modos preferidos para a sua prática. No entanto, os especialistas na técnica devem, à luz da presente descrição, apreciar que muitas alterações podem ser feitas nas formas de realização específicas que são divulgadas e ainda assim obter um resultado semelhante ou parecido sem nos afastarmos do espírito e escopo dos métodos presentemente divulgados.

[0131] Todos os reagentes e materiais foram obtidos a partir da DISCO Laboratories (Detroit, MI), GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD), TCI America (Portland, OR), Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN) ou Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO), salvo quando indicado de outra forma.

[0132] As seguintes abreviaturas no relatório descritivo correspondem às unidades de medida, técnicas, propriedades ou compostos da seguinte forma: “seg” ou “s” significa segundo(s), “min” significa minuto(s), “h” ou “hr” significa hora(s), “ μ L” significa microlitro(s), “mL” significa mililitro(s), “L” significa litro(s), “mM” significa milimolar, “M” significa molar, “mmol” significa milimol(es), “ppm” significa parte(s) por milhão, “P” significa peso, “%P” significa percentagem em peso, “g” significa grama(s), “ μ g” significa micrograma(s), “ng” significa nanograma(s), “g” significa gravidade, “HPLC” significa cromatografia líquida de alto desempenho, “dd H₂O” significa água destilada e deionizada, “dcw” significa peso celular seco, “ATCC” ou “ATCC®” significa *American Type*

Culture Collection (Manassas, VA), “U” significa unidade(s) da atividade de perhidrolase, “rpm” significa revoluções por minuto, “EDTA” significa ácido etilenodiaminotetracético, “IPTG” significa isopropil- β -D-tio-galactoside, “BCA” significa ácido bicinconínico, e “ABTS” significa 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato).

EXEMPLO 1

CLONAGEM E PRODUÇÃO DA ACETIL XILANA ESTERASE CE-7 DE ACTINOSYNNEMA

MIRUM EM E. COLI

[0133] O gene que codifica a enzima acetil xilano esterase a partir da *Actinosynnema mirum* conforme divulgado no GenBank® (Nº de Acesso ACU35776.1; GI: 255920265) foi sintetizado utilizando códons otimizados para a expressão em *E. coli* (DNA 2.0, Menlo Park, CA). O ácido nucleico produto (SEQ ID NO: 3) foi subclonado em PJEXPRESS404® (DNA 2.0, Menlo Park, CA) para gerar o plasmídeo identificado como pMP91. O plasmídeo pMP91 foi usado para transformar *E. coli* KLP18 (descrito na Patente US 7.723.083), para gerar a cepa identificada como KLP18/pMP91. A KLP18/pMP91 foi cultivada em meio LB a 37 °C com agitação até atingir a $OD_{600nm} = 0,4-0,5$, momento em que foi adicionado IPTG para uma concentração final de 1 mM e a incubação continuou durante 2-3 h. As células foram coletadas por centrifugação a 5000 x g durante 15 minutos, em seguida, novamente suspensas (20% p/v) em 50 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0, suplementado com 1,0 mM de ditioneitol. As células resuspensas foram passadas duas vezes através de uma célula de pressão Francesa. As células lisadas foram centrifugadas durante 30 minutos a 12,000 x g e a concentração de proteína no sobrenadante do extrato foi determinada utilizando um kit de ensaio BCA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). SDS-PAGE foi utilizada para confirmar a expressão da enzima CE-7 (SEQ ID NO: 4), e análise dos géis utilizando o *ImageJ*, um programa de processamento de imagem em Java de domínio público, indicou que a perhidrolase constituiu 11% da proteína total solúvel.

EXEMPLO 2**CLONAGEM E PRODUÇÃO DA ACETIL XILANA ESTERASE CE-7 DE****PROPIONIBACTERIUM ACNES EM E. COLI**

[0134] O gene que codifica a enzima acetil xilano esterase a partir da *Propionibacterium acnes* conforme divulgado no GenBank® (Nº de Acesso AEE71478.1; GI: 332674662) foi sintetizado utilizando códons otimizados para a expressão em *E. coli* (DNA 2.0, Menlo Park, CA). O ácido nucleico produto (SEQ ID NO: 5) foi subclonado em PJEXPRESS404® (DNA 2.0, Menlo Park, CA) para gerar o plasmídeo identificado como pMP92. O plasmídeo pMP92 foi usado para transformar *E. coli* KLP18 (descrito na Patente US 7.723.083), para gerar a cepa identificada como KLP18/pMP92. A KLP18/pMP92 foi cultivada em meio LB a 37 °C com agitação até atingir a OD_{600nm} = 0,4-0,5, momento em que foi adicionado IPTG para uma concentração final de 1 mM e a incubação continuou durante 2-3 h. As células foram coletadas por centrifugação a 5000 x g durante 15 minutos, em seguida, novamente suspensas (20% p/v) em 50 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0, suplementado com 1,0 mM de ditioneitol. As células resuspensas foram passadas duas vezes através de uma célula de pressão Francesa. As células lisadas foram centrifugadas durante 30 minutos a 12,000 x g e a concentração de proteína total solúvel foi determinada utilizando um kit de ensaio BCA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). SDS-PAGE foi utilizada para confirmar a expressão da enzima CE-7 (SEQ ID NO: 6), e análise dos géis utilizando o *ImageJ*, um programa de processamento de imagem em Java de domínio público, indicou que a perhidrolase constituiu 13% da proteína total solúvel.

EXEMPLO 3**CLONAGEM E PRODUÇÃO DA ACETIL XILANA ESTERASE CE-7 DE STREPTOCOCCUS****EQUI EM E. COLI**

[0135] O gene que codifica a enzima acetil xilano esterase a partir da *Streptococcus equi* conforme divulgado no GenBank® (Nº de Acesso CAX00506.1;

GI: 225702544) foi sintetizado utilizando códons otimizados para a expressão em *E. coli* (DNA 2.0, Menlo Park, CA). O ácido nucleico produto (SEQ ID NO: 7) foi subclonado em PJEXPRESS404[®] (DNA 2.0, Menlo Park, CA) para gerar o plasmídeo identificado como pMP93. O plasmídeo pMP93 foi usado para transformar *E. coli* KLP18 (descrito na Patente US 7.723.083), para gerar a cepa identificada como KLP18/pMP93. A KLP18/pMP93 foi cultivada em meio LB a 37 °C com agitação até atingir a OD_{600nm} = 0,4-0,5, momento em que foi adicionado IPTG para uma concentração final de 1 mM e a incubação continuou durante 2-3 h. As células foram coletadas por centrifugação a 5000 x g durante 15 minutos, em seguida, novamente suspensas (20% p/v) em 50 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0, suplementado com 1,0 mM de ditioneitol. As células resuspensas foram passadas duas vezes através de uma célula de pressão Francesa. As células lisadas foram centrifugadas durante 30 minutos a 12,000 x g e a concentração de proteína total solúvel foi determinada utilizando um kit de ensaio BCA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). SDS-PAGE foi utilizada para confirmar a expressão da enzima CE-7 (SEQ ID NO: 8), e análise dos géis utilizando o *ImageJ*, um programa de processamento de imagem em Java de domínio público, indicou que a perhidrolase constituiu 26% da proteína total solúvel.

EXEMPLO 4

CLONAGEM E PRODUÇÃO DA ACETIL XILANA ESTERASE CE-7 DE STACKEBRANDTIA

NASSAUENSIS EM E. COLI

[0136] O gene que codifica a enzima acetil xilano esterase a partir da *Stackebrandtia nassauensis* conforme divulgado no GenBank[®] (Nº de Acesso ADD42786.1; GI: 290569821) foi sintetizado utilizando códons otimizados para a expressão em *E. coli* (DNA 2.0, Menlo Park, CA). O ácido nucleico produto (SEQ ID NO: 9) foi subclonado em PJEXPRESS404[®] (DNA 2.0, Menlo Park, CA) para gerar o plasmídeo identificado como pMP94. O plasmídeo pMP94 foi usado para transformar *E. coli* KLP18 (descrito na Patente US 7.723.083), para gerar a

cepa identificada como KLP18/pMP94. A KLP18/pMP94 foi cultivada em meio LB a 37 °C com agitação até atingir a $OD_{600nm} = 0,4 - 0,5$, momento em que foi adicionado IPTG para uma concentração final de 1 mM e a incubação continuou durante 2-3 h. As células foram coletadas por centrifugação a $5000 \times g$ durante 15 minutos, em seguida, novamente suspensas (20% p/v) em 50 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0, suplementado com 1,0 mM de ditioneitol. As células resuspensas foram passadas duas vezes através de uma célula de pressão Francesa. As células lisadas foram centrifugadas durante 30 minutos a $12,000 \times g$ e a concentração de proteína total solúvel foi determinada utilizando um kit de ensaio BCA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). SDS-PAGE foi utilizada para confirmar a expressão da enzima CE-7 (SEQ ID NO: 10), e análise dos géis utilizando o *ImageJ*, um programa de processamento de imagem em Java de domínio público, indicou que a perhidrolase constituiu 33% da proteína total solúvel.

EXEMPLO 5

CLONAGEM E PRODUÇÃO DA ACETIL XILANA ESTERASE CE-7 DE *STREPTOCOCCUS*

AGALACTIAE EM *E. COLI*

[0137] O gene que codifica a enzima acetil xilano esterase a partir da *Streptococcus agalactiae* conforme divulgado no GenBank® (Nº de Acesso AAM98949.1; GI: 22533045) foi sintetizado utilizando códons otimizados para a expressão em *E. coli* (DNA 2.0, Menlo Park, CA). O ácido nucleico produto (SEQ ID NO: 11) foi subclonado em PJEXPRESS404® (DNA 2.0, Menlo Park, CA) para gerar o plasmídeo identificado como pMP95. O plasmídeo pMP95 foi usado para transformar *E. coli* KLP18 (descrito na Patente US 7.723.083), para gerar a cepa identificada como KLP18/pMP95. A KLP18/pMP95 foi cultivada em meio LB a 37 °C com agitação até atingir a $OD_{600nm} = 0,4-0,5$, momento em que foi adicionado IPTG para uma concentração final de 1 mM e a incubação continuou durante 2-

3 h. As células foram coletadas por centrifugação a 5000 x g durante 15 minutos, em seguida, novamente suspensas (20% p/v) em 50 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0, suplementado com 1,0 mM de ditioneitol. As células resuspensas foram passadas duas vezes através de uma célula de pressão Francesa. As células lisadas foram centrifugadas durante 30 minutos a 12,000 x g e a concentração de proteína total solúvel foi determinada utilizando um kit de ensaio BCA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). SDS-PAGE foi utilizada para confirmar a expressão da enzima CE-7 (SEQ ID NO: 12), e análise dos géis utilizando o *ImageJ*, um programa de processamento de imagem em Java de domínio público, indicou que a perhidrolase constituiu 7,3% da proteína total solúvel.

EXEMPLO 6

ENSAIO DE ATIVIDADE DA PERHIDROLASE

[0138]A atividade perhidrolase no sobrenadante do extrato foi determinada por reações contendo 22,5 mM de triacetina, 22,5 mM de peróxido de hidrogênio e 6,25 µg de proteína solúvel total no sobrenadante do extrato/mL. A incubação foi realizada durante 10 minutos em temperatura ambiente (22-24 °C). As reações foram interrompidas pela adição de um volume igual de ácido fosfórico 1,25 M, contendo 100 mM de orto-fenilenodiamina. Após 30 minutos, a absorbância a 458 nm foi mensurada (Tabela 1). Medições adicionais da atividade perhidrolase foram feitas em reações que continham 10 mM de triacetina e 10 mM de peróxido de hidrogênio ou 50 mM de triacetina e 50 mM de peróxido de hidrogênio (Tabela 1). A acetil xilano esterase CE 7 de *T. maritima* também foi produzida em *E. coli* KLP18 (descrita na Publicação do Pedido de Patente US 2008-0176299) e utilizada como um controle positivo para o ensaio da perhidrolase. O extrato da *E. coli* KLP18 não contendo uma enzima CE-7 foi

utilizado como controle negativo.

TABELA 1

Fonte de esterase CE-7	ref	SEQ ID NO:	OD _{458 nm}			
			triacetina	10 mM	22.5 mM	50 mM
			H ₂ O ₂	10 mM	22.5 mM	50 mM
<i>A. mirum</i>	Ami	4		0,6	2,3	2,9
<i>P. acnes</i>	Pac	6		0,4	1,2	2,5
<i>S. equi</i>	Seq	8		0,3	1,9	2,0
<i>S. nassauensis</i>	Sna	10		0,1	0,2	0,8
<i>S. agalactiae</i>	Sag	12		0,0	0,1	0,3
<i>T. maritima</i>	Tma	2		0,2	1,0	2,5
Nenhum (controle)				0,0	0,0	0,0

EXEMPLO 7

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO A PARTIR DE TRIACETINA E PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO POR ESTERASES CE-7**

[0139] As reações (10 mL de volume total) foram executadas a 25 °C em tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) contendo triacetina (10 mM), peróxido de hidrogênio (20 mM) e 5,0 µg/ml de proteína solúvel total do sobrenadante do extrato contendo a esterase CE-7 a partir de *Actinosynnema mirum* (SEQ ID NO: 4), *Propionibacterium acnes* (SEQ ID NO: 6), *Streptococcus equi* (SEQ ID NO: 8), *Stackebrandtia nassauensis* (SEQ ID NO: 10) ou *Streptococcus agalactiae* (SEQ ID NO: 12), preparadas conforme descrito nos Exemplos 1-5. As reações foram agitadas durante apenas os primeiros 45 segundos de reação para misturar inicialmente os reagentes e a enzima. Uma reação de controle comparativo foi realizada sob condições idênticas ao descrito imediatamente acima utilizando 0,5 µg/ml de proteína total solúvel isolada a partir de extrato de *E. coli* KLP18 (usada para expressar as esterases CE-7), em que o sobrenadante do extrato foi preparado de acordo com o procedimento do Exemplo 1. Uma segunda reação de controle comparativo também foi executada sob condições idênticas a descrita acima utilizando qualquer proteína total solúvel a partir do sobrenadante de extrato adicionado, onde o ácido peracético

produzido na ausência da esterase adicionada foi resultante da perhidrólise química de triacetina pelo peróxido de hidrogênio sob as condições de reação especificadas. A acetil xilana esterase CE-7 de *T. maritima* (SEQ ID NO: 2) também foi produzida em *E. coli* KLP18 (descrita na Publicação do Pedido de Patente US 2008-0176299) e utilizada como um controle positivo na reação comparativa (11% de proteína solúvel total do sobrenadante do extrato de células).

[0140] Análise de amostras de reação para a produção de ácido peracético seguiu o método descrito em Pinkernell *et. al.* (*Analyst*, 122: 567 (1997)) utilizando a detecção colorimétrica de oxidação de ABTS pelo ácido peracético. Uma amostra de reação de 50 µL foi adicionada a 950 µL de H₃PO₄ 5 mM para parar a reação enzimática (pH final entre pH 2-3), e 50 µL da solução resultante foi adicionada a uma placa de microtitulação de 96 poços contendo 200 µL de uma solução aquosa contendo 0,25 M de ácido acético, 0,125 g/L e ABTS e 5,0 mg/L de KI. A solução foi deixada desenvolver durante 5 min, em seguida, a absorbância da solução foi mensurada a 405 nm utilizando um leitor de microplacas. A concentração de ácido peracético em cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão, utilizando-se simultaneamente uma solução de reagente de ácido peracético (Tabela 2).

TABELA 2

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO (PAA) CATALISADA PELA PERHIDROLASE CE-7-
A PARTIR DE TRIACETINA E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM TAMPÃO FOSFATO DE
POTÁSSIO (50 mM, PH 7,0) A 25 °C.**

Fonte de esterase CE-7	SEQ ID NO	Triacetina (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	Proteína Solúvel total (µg/mL)	PAA em 2 min (ppm)	PAA em 5 min (ppm)	PAA em 10 min (ppm)	PAA em 20 min (ppm)	PAA em 30 min (ppm)
controle - sem enzima		10	20	0	4,1	4,3	3,1	4,0	4,6
controle - <i>E. coli</i> KLP18		10	20	5,0	3,9	4,0	4,1	4,0	4,8
<i>A. mirum</i>	4	10	20	5,0	8,8	17	30	50	68

Fonte de esterase CE-7	SEQ ID NO	Triacetina (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	Proteína Solúvel total (µg/mL)	PAA em 2 min (ppm)	PAA em 5 min (ppm)	PAA em 10 min (ppm)	PAA em 20 min (ppm)	PAA em 30 min (ppm)
<i>P. acnes</i>	6	10	20	5,0	6,4	12	18	28	36
<i>S. equi</i>	8	10	20	5,0	18	33	47	53	52
<i>S. nassauensis</i>	10	10	20	5,0	4,3	6,0	7,8	11	15
<i>S. agalactiae</i>	12	10	20	5,0	4,3	4,5	5,1	6,6	7,4
<i>T. maritima</i>	2	10	20	5,0	5,6	11	16	28	43

EXEMPLO 8

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO A PARTIR DE DIACETATO DE PROPILENO GLICOL E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR ESTERASES CE-7

[0141] As reações (10 mL de volume total) foram executadas a 25 °C em tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) contendo diacetato de propileno glicol (10 mM), peróxido de hidrogênio (20 mM) e 5,0 µg/ml de proteína solúvel total do sobrenadante do extrato contendo a esterase CE-7 a partir de *Actinosynnema mirum* (SEQ ID NO: 4), *Propionibacterium acnes* (SEQ ID NO: 6), *Streptococcus equi* (SEQ ID NO: 8), *Stackebrandtia nassauensis* (SEQ ID NO: 10), preparadas conforme descrito nos Exemplos 1-4. As reações foram agitadas durante apenas os primeiros 45 segundos de reação para misturar inicialmente os reagentes e a enzima. Uma reação de controle comparativo foi realizada sob condições idênticas ao descrito imediatamente acima utilizando 0,5 µg/ml de proteína total solúvel isolada a partir de extrato de *E. coli* KLP18 (usada para expressar as esterases CE-7), em que o sobrenadante do extrato foi preparado de acordo com o procedimento do Exemplo 1. Uma segunda reação de controle comparativo também foi executada sob condições idênticas a descrita acima utilizando qualquer proteína total solúvel a partir do sobrenadante de extrato adicionado, onde o ácido peracético produzido na ausência de esterase adicionada foi o resultado da perhidrólise química de diacetato de propileno glicol pelo peróxido de hidrogênio sob as condições de reação especificadas. A acetil xilana esterase CE-7 de *T. maritima* (SEQ ID NO:

2) também foi produzida em *E. coli* KLP18 (descrita na Publicação do Pedido de Patente US 2008-0176299) e utilizada como um controle positivo na reação comparativa (11% de proteína solúvel total do sobrenadante do extrato de células). Análise das amostras de reação para a produção de ácido peracético seguiu o método descrito no Exemplo 7 (Tabela 3).

TABELA 3

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO (PAA) CATALISADA PELA PERHIDROLASE CE-7-
A PARTIR DE DIACETATO DE PROPILENO GLICOL E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM
TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO (50 mM, pH 7,0) A 25 °C.**

Fonte de esterase CE-7	SEQ ID NO	Diacetato de propileno glicol(mM)	H ₂ O ₂ (mM)	Proteína Solúvel total (µg/mL)	PAA em 2 min (ppm)	PAA em 5 min (ppm)	PAA em 10 min (ppm)	PAA em 20 min (ppm)	PAA em 30 min (ppm)
controle - sem enzima		10	20	0	5,4	5,0	5,0	5,2	5,1
controle - <i>E. coli</i> KLP18		10	20	5,0	5,4	5,1	5,2	5,1	5,2
<i>A. mirum</i>	4	10	20	5,0	8,0	13	22	35	47
<i>P. acnes</i>	6	10	20	5,0	6,1	6,9	8,6	13	12
<i>S. equi</i>	8	10	20	5,0	6,6	11	11	12	12
<i>S. nassauensis</i>	10	10	20	5,0	4,6	4,8	8,2	6,4	7,6
<i>T. maritima</i>	2	10	20	5,0	5,7	6,8	8,3	12	15

EXEMPLO 9

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO A PARTIR DE PENTA-ACETATO DE A-D-GLICOSE E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR ESTERASES CE-7

[0142]As reações (10 mL de volume total) foram executadas a 25 °C em tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) contendo penta-acetato de α -D-glicose (10 mM), peróxido de hidrogênio (20 mM) e 5,0 µg/ml de proteína solúvel total do sobrenadante do extrato contendo a esterase CE-7 a partir de *Actinosynnema mirum* (SEQ ID NO: 4), *Streptococcus equi* (SEQ ID NO: 8), ou *Streptococcus agalactiae* (SEQ ID NO: 12) preparadas conforme descrito nos Exemplos 1, 3 e 5. As reações foram agitadas durante

apenas os primeiros 45 segundos de reação para misturar inicialmente os reagentes e a enzima. Uma reação de controle comparativo foi realizada sob condições idênticas ao descrito imediatamente acima utilizando 0,5 µg/ml de proteína total solúvel isolada a partir de extrato de *E. coli* KLP18 (usada para expressar as esterases CE-7), em que o sobrenadante do extrato foi preparado de acordo com o procedimento do Exemplo 1. Uma segunda reação de controle comparativo também foi executada sob condições idênticas a descrita acima utilizando qualquer proteína total solúvel a partir do sobrenadante de extrato adicionado, onde o ácido peracético produzido na ausência de esterase adicionada foi o resultado da perhidrólise química de penta-acetato de α -D-glicose pelo peróxido de hidrogênio sob as condições de reação especificadas. A acetil xilana esterase CE-7 de *T. maritima* (SEQ ID NO: 2) também foi produzida em *E. coli* KLP18 (descrita na Publicação do Pedido de Patente US 2008-0176299) e utilizada como um controle positivo na reação comparativa (11% de proteína solúvel total do sobrenadante do extrato de células). Análise das amostras de reação para a produção de ácido peracético seguiu o método descrito no Exemplo 7 (Tabela 4).

TABELA 4

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO (PAA) CATALISADA PELA PERHIDROLASE CE-7-
A PARTIR DE PENTA-ACETATO DE α -D-GLICOSE E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM
TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO (50 mM, pH 7,0) A 25 °C.**

Fonte de esterase CE-7	SEQ ID NO	Penta-acetato de α -D-glicose (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	Proteína Solúvel total (µg/mL)	PAA em 2 min (ppm)	PAA em 5 min (ppm)	PAA em 10 min (ppm)	PAA em 20 min (ppm)	PAA em 30 min (ppm)
controle - sem enzima		10	20	0	6,7	18	41	93	136
controle - <i>E. coli</i> KLP18		10	20	5,0	8,7	20	46	94	137

Fonte de esterase CE-7	SEQ ID NO	Penta-acetato de α -D-glicose (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	Proteína Solúvel total (μ g/mL)	PAA em 2 min (ppm)	PAA em 5 min (ppm)	PAA em 10 min (ppm)	PAA em 20 min (ppm)	PAA em 30 min (ppm)
<i>A. mirum</i>	4	10	20	5,0	20	34	68	130	179
<i>S. equi</i>	8	10	20	5,0	11	23	46	93	141
<i>S. agalactiae</i>	12	10	20	5,0	16	29	51	99	148
<i>T. maritima</i>	2	10	20	5,0	11	24	47	99	144

EXEMPLO 10

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO A PARTIR DE HEXA-ACETATO DE D-SORBITOL E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR ESTERASES CE-7

[0143]As reações (10 mL de volume total) foram executadas a 25 °C em tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) contendo hexa-acetato de D-sorbitol (10 mM), peróxido de hidrogênio (20 mM) e 5,0 μ g/ml de proteína solúvel total do sobrenadante do extrato contendo a esterase CE-7 a partir de *Actinosynnema mirum* (SEQ ID NO: 4) ou *Streptococcus equi* (SEQ ID NO: 8), preparadas conforme descrito nos Exemplos 1 e 3. As reações foram agitadas durante apenas os primeiros 45 segundos de reação para misturar inicialmente os reagentes e a enzima. Uma reação de controle comparativo foi realizada sob condições idênticas ao descrito imediatamente acima utilizando 0,5 μ g/ml de proteína total solúvel isolada a partir de extrato de *E. coli* KLP18 (usada para expressar as esterases CE-7), em que o sobrenadante do extrato foi preparado de acordo com o procedimento do Exemplo 1. Uma segunda reação de controle comparativo também foi executada sob condições idênticas a descrita acima utilizando qualquer proteína total solúvel a partir do sobrenadante de extrato adicionado, onde o ácido peracético produzido na ausência de esterase adicionada foi o resultado da perhidrólise química de hexa-acetato de D-sorbitol pelo peróxido de hidrogênio sob as condições de reação especificadas. A acetil xilana esterase

CE-7 de *T. maritima* (SEQ ID NO: 2) também foi produzida em *E. coli* KLP18 (descrita na Publicação do Pedido de Patente US 2008-0176299) e utilizada como um controle positivo na reação comparativa (11% de proteína solúvel total do sobrenadante do extrato de células). Análise das amostras de reação para a produção de ácido peracético seguiu o método descrito no Exemplo 7 (Tabela 5).

TABELA 5

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO (PAA) CATALISADA PELA PERHIDROLASE CE-7-A PARTIR DE HEXA-ACETATO DE D-SORBITOL E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO (50 mM, pH 7,0) A 25 °C.

Fonte de esterase CE-7	SEQ ID NO	hexa-acetato de D-sorbitol (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	Proteína Solúvel total (µg/mL)	PAA em 2 min (ppm)	PAA em 5 min (ppm)	PAA em 10 min (ppm)	PAA em 20 min (ppm)	PAA em 30 min (ppm)
controle - sem enzima		10	20	0	3,6	3,9	4,4	4,2	4,5
controle - <i>E. coli</i> KLP18		10	20	5,0	3,8	4,2	4,1	4,1	4,7
<i>A. mirum</i>	4	10	20	5,0	5,6	9,0	15	25	34
<i>S. equi</i>	8	10	20	5,0	4,8	5,9	7,7	9,1	9,8
<i>T. maritima</i>	2	10	20	5,0	5,0	6,0	11	15	21

EXEMPLO 11

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO A PARTIR DE TRI-O-ACETIL-D-GLUCAL E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR ESTERASES CE-7

[0144]As reações (50 mL de volume total) foram executadas a 25 °C em tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) contendo Tri-O-Acetil-D-Glucal (2 mM), peróxido de hidrogênio (10 mM) e 5,0 µg/ml de proteína solúvel total do sobrenadante do extrato contendo a esterase CE-7 a partir de *Actinosynnema mirum* (SEQ ID NO: 4) ou *Streptococcus equi* (SEQ ID NO: 8), preparadas conforme descrito nos Exemplos 1 e 3. As reações foram agitadas durante apenas os primeiros 45 segundos de reação

para misturar inicialmente os reagentes e a enzima. Uma reação de controle comparativo foi realizada sob condições idênticas ao descrito imediatamente acima utilizando 0,5 µg/ml de proteína total solúvel isolada a partir de extrato de *E. coli* KLP18 (usada para expressar as esterases CE-7), em que o sobrenadante do extrato foi preparado de acordo com o procedimento do Exemplo 1. Uma segunda reação de controle comparativo também foi executada sob condições idênticas a descrita acima utilizando qualquer proteína total solúvel a partir do sobrenadante de extrato adicionado, onde o ácido peracético produzido na ausência de esterase adicionada foi o resultado da perhidrólise química de Tri-O-Acetil-D-Glucal pelo peróxido de hidrogênio sob as condições de reação especificadas. A acetil xilana esterase CE-7 de *T. maritima* (SEQ ID NO: 2) também foi produzida em *E. coli* KLP18 (descrita na Publicação do Pedido de Patente US 2008-0176299) e utilizada como um controle positivo na reação comparativa (11% de proteína solúvel total do sobrenadante do extrato de células). Análise das amostras de reação para a produção de ácido peracético seguiu o método descrito no Exemplo 7 (Tabela 6).

TABELA 6**PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO (PAA) CATALISADA PELA PERHIDROLASE CE-7-****A PARTIR DE TRI-O-ACETIL-D-GLUCAL E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM TAMPÃO****FOSFATO DE POTÁSSIO (10 MM, PH 7,0) A 25 °C.**

Fonte de esterase CE-7	SEQ ID NO	Tri-O-Acetil-D-Glucal (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	Proteína Solúvel total (µg/mL)	PAA em 5 min (ppm)	PAA em 20 min (ppm)
controle - sem enzima		2	10	0	2,6	2,2
controle - <i>E. coli</i> KLP18		2	10	5,0	2,5	1,5
<i>A. mirum</i>	4	2	10	5,0	6,7	18
<i>S. equi</i>	8	2	10	5,0	5,8	6,4
<i>T. maritima</i>	2	2	10	5,0	4,9	13

EXEMPLO 12**PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO A PARTIR DE ÁCIDO 4-(ACETILOXI)-BENZÓICO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR ESTERASES CE-7**

[0145]As reações (10 mL de volume total) foram executadas a 25 °C em tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) contendo ácido 4-(acetiloxi)-benzóico (CAS 2345-34-8; 25 mM), peróxido de hidrogênio (20 mM) e 5,0 µg/ml de proteína solúvel total do sobrenadante do extrato contendo a esterase CE-7 a partir de *Actinosynnema mirum* (SEQ ID NO: 4), *Propionibacterium acnes* (SEQ ID NO: 6), *Streptococcus equi* (SEQ ID NO: 8) ou *Stackebrandtia nassauensis* (SEQ ID NO: 10), preparadas conforme descrito nos Exemplos 1-4. As reações foram agitadas durante apenas os primeiros 45 segundos de reação para misturar inicialmente os reagentes e a enzima. Uma reação de controle comparativo foi realizada sob condições idênticas ao descrito imediatamente acima utilizando 0,5 µg/ml de proteína total solúvel tratada com calor isolada a partir de extrato de *E. coli* KLP18 (usada para expressar as esterases CE-7), em que o sobrenadante do extrato foi preparado de acordo com o procedimento do Exemplo 1. Uma segunda reação de controle comparativo também foi executada sob condições idênticas a descrita acima utilizando qualquer proteína total solúvel a partir do sobrenadante de extrato adicionado, onde o ácido peracético produzido na ausência de esterase adicionada foi o resultado da perhidrólise química de ácido 4-(acetiloxi)-benzóico pelo peróxido de hidrogênio sob as condições de reação especificadas. A acetil xilana esterase CE-7 de *T. maritima* (SEQ ID NO: 2) também foi produzida em *E. coli* KLP18 (descrita na Publicação do Pedido de Patente US 2008-0176299) e utilizada como um controle positivo na reação comparativa (11% de proteína solúvel total do sobrenadante do extrato de células). Análise das amostras de reação para a produção de ácido peracético seguiu o método descrito no Exemplo 7 (Tabela 7).

TABELA 7

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO (PAA) CATALISADA PELA PERHIDROLASE CE-7-
A PARTIR DE ÁCIDO 4-(ACETILOXI)-BENZÓICO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM
TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO (50 mM, PH 7,0) A 20 °C.**

Fonte de esterase CE-7	SEQ ID NO	ácido 4-(acetiloxi)-benzóico (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	Proteína Solúvel total (µg/mL)	PAA em 5 min (ppm)	PAA em 20 min (ppm)
controle - sem enzima		25	20	0	28	74
controle - <i>E. coli</i> KLP18		25	20	5,0	21	73
<i>A. mirum</i>	4	25	20	5,0	36	85
<i>P. acnes</i>	6	25	20	5,0	31	90
<i>S. equi</i>	8	25	20	5,0	31	98
<i>S. nassauensis</i>	10	25	20	5,0	29	80
<i>T. maritima</i>	2	25	20	5,0	21	71

EXEMPLO 13**CLONAGEM E PRODUÇÃO DE UMA ACETIL XILANA ESTERASE DE ACTINOSYNNEMA****MIRUM VARIANTE**

[0146] Um gene codificante de uma forma variante da enzima acetil xilano esterase de *A. mirum* conforme divulgado no GenBank® (Nº de Acesso ACU35776.1; GI: 255920265) foi sintetizado utilizando códons otimizados para a expressão em *E. coli* (DNA 2.0, Menlo Park, CA). O ácido nucleico produto (SEQ ID NO: 13) foi subclonado em PJEXPRESS404® (DNA 2.0, Menlo Park, CA) para gerar o plasmídeo identificado como pMP91a. A proteína variante codificada é denominada de Ami_C276S (SEQ ID NO: 14). O plasmídeo pMP91a foi usado para transformar *E. coli* KLP18 (descrito na Patente US 7.723.083), para gerar a cepa identificada como KLP18/pMP91a. A KLP18/pMP91a foi cultivada em meio LB a 37 °C com agitação até atingir a OD_{600nm} = 0,4 - 0,5, momento em que foi adicionado IPTG para uma concentração final de 1 mM e a incubação continuou durante 2-3 h. As células foram coletadas por centrifugação

a 5000 x *g* durante 15 minutos, em seguida, novamente suspensas (20% p/v) em 50 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0, suplementado com 1,0 mM de ditioneitol. As células resuspensas foram passadas duas vezes através de uma célula de pressão Francesa. As células lisadas foram centrifugadas durante 30 minutos a 12,000 x *g* e a concentração de proteína no sobrenadante foi determinada utilizando um kit de ensaio BCA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). SDS-PAGE foi utilizado para confirmar a expressão da enzima e a densitometria (*software ImageJ*, National Institutes of Health, Bethesda, MD) foi usada para calcular a proteína enzima como aproximadamente 16-18% da proteína total.

EXEMPLO 14

CLONAGEM E PRODUÇÃO DE UMA ACETIL XILANA ESTERASE DE *ACTINOSYNNEMA*

MIRUM VARIANTE

[0147] Um gene codificante de uma forma variante da enzima acetil xilano esterase de *A. mirum* conforme divulgado no GenBank® (Nº de Acesso ACU35776.1; GI: 255920265) foi sintetizado utilizando códons otimizados para a expressão em *E. coli* (DNA 2.0, Menlo Park, CA). O ácido nucleico produto (SEQ ID NO: 15) foi subclonado em PJEXPRESS404® (DNA 2.0, Menlo Park, CA) para gerar o plasmídeo identificado como pMP91b. A proteína variante codificada é denominada de Ami_C276T (SEQ ID NO: 16). O plasmídeo pMP91b foi usado para transformar *E. coli* KLP18 (descrito na Patente US 7.723.083), para gerar a cepa identificada como KLP18/pMP91b. A KLP18/pMP91b foi cultivada em meio LB a 37 °C com agitação até atingir a OD_{600nm} = 0,4 - 0,5, momento em que foi adicionado IPTG para uma concentração final de 1 mM e a incubação continuou durante 2-3 h. As células foram coletadas por centrifugação a 5000 x *g* durante 15 minutos, em seguida, novamente suspensas (20% p/v) em 50 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0, suplementado com 1,0 mM de ditioneitol. As células resuspensas foram passadas duas vezes através de uma célula de pressão Francesa. As células lisadas foram centrifugadas durante

30 minutos a 12,000 x *g* e a concentração de proteína no sobrenadante foi determinada utilizando um kit de ensaio BCA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). SDS-PAGE foi utilizado para confirmar a expressão da enzima e a densitometria (*software ImageJ*, National Institutes of Health, Bethesda, MD) foi usada para calcular a proteína enzima como aproximadamente 16-18% da proteína total.

EXEMPLO 15

ENSAIO DE ATIVIDADE DA PERHIDROLASE

[0148] A atividade perhidrolase nos extratos foi determinada por reações contendo 22,5 mM de triacetina, 22,5 mM de peróxido de hidrogênio e 1,5 µg de proteína total/mL. A incubação foi realizada durante 10 minutos em temperatura ambiente (22-24 °C). As reações foram interrompidas pela adição de um volume igual de ácido fosfórico 1,25 M, contendo 100 mM de orto-fenilenodiamina. Após 30 minutos, a absorbância a 458 nm foi mensurada (Tabela 8). O extrato da *E. coli* KLP18 não contendo uma enzima acetil xilano esterase foi utilizado como controle negativo.

TABELA 8

Enzima ID.	SEQ ID NO:	OD 458 nm
Ami_wt	4	0,21
Ami_C276S	14	2,3
Ami_C276T	16	1,5
Controle – sem enzima		0

EXEMPLO 16

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO A PARTIR DE TRIACETINA E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR ESTERASES CE-7 VARIANTES

[0149] As reações (10 mL de volume total) foram executadas a 25 °C em tampão de fosfato de potássio (20 mM, pH 7,0) contendo triacetina (0,75 mM), peróxido de hidrogênio (1,4 mM) e 1,0 µg/mL ou 2,0 µg/ml de esterase CE-7 a partir de *Actinosynnema mirum* tipo selvagem (SEQ ID NO:

4, preparada conforme descrito no Exemplo 1), variante C276S de *Actinosynnema Mirum* (SEQ ID NO: 14, preparada conforme descrito no Exemplo 13), variante C276T de *Actinosynnema mirum* (SEQ ID NO: 16, preparada conforme descrito no Exemplo 14), C277S de *T. maritima* (SEQ ID NO: 17, produzida em *E. coli* KLP18 conforme descrito na Patente US 8.062.875), e C277T de *T. maritima* (SEQ ID NO: 18, produzida em *E. coli* KLP18 conforme descrito na Patente US 8.062.875). Análise de extratos celulares contendo a esterase CE-7 em géis de SDS-PAGE, em combinação com a análise dos géis utilizando o ImageJ, um programa de processamento de imagem em Java de domínio público, foi utilizada para calcular a concentração de esterase CE-7 nos extratos celulares como uma percentagem de proteína solúvel total. As reações foram agitadas durante apenas os primeiros 45 segundos de reação para misturar inicialmente os reagentes e a enzima. Uma reação de controle comparativo foi executada sob condições idênticas a descrita acima sem adicionar esterase CE-7, onde o ácido peracético produzido na ausência da esterase adicionada foi o resultado da perhidrólise química de triacetina pelo peróxido de hidrogênio sob as condições de reação especificadas. Análise das amostras de reação para a produção de ácido peracético seguiu o método descrito no Exemplo 7 (Tabela 9).

TABELA 9

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO (PAA) CATALISADA PELA PERHIDROLASE CE-7

VARIANTE A PARTIR DE TRIACETINA E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM TAMPÃO

FOSFATO DE POTÁSSIO (20 MM, PH 7,0) A 25 °C.

Fonte de esterase CE-7	SEQ ID NO	Triacetina (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	Esterase CE-7 variante (µg/mL)	PAA em 2 min (ppm)	PAA em 5 min (ppm)	PAA em 10 min (ppm)	PAA em 20 min (ppm)	PAA em 30 min (ppm)
controle - sem enzima		0,75	1,4	0	0,5	0,4	0,4	0,4	0,3

Fonte de esterase CE-7	SEQ ID NO	Triacetina (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	Esterase CE-7 variante (µg/mL)	PAA em 2 min (ppm)	PAA em 5 min (ppm)	PAA em 10 min (ppm)	PAA em 20 min (ppm)	PAA em 30 min (ppm)
<i>A. mirum</i> tipo selvagem	4	0,75	1,4	1,0	0,6	1,4	2,1	1,2	0,6
<i>A. mirum</i> C276S	14	0,75	1,4	1,0	3,1	5,4	6,8	4,9	3,0
<i>A. mirum</i> C276T	16	0,75	1,4	1,0	3,0	6,0	8,8	8,1	5,1
<i>T. maritima</i> C277S	17	0,75	1,4	1,0	1,3	2,6	4,2	4,8	4,2
<i>T. maritima</i> C277T	18	0,75	1,4	1,0	2,4	4,8	6,1	5,6	3,7
<i>A. mirum</i> tipo selvagem	4	0,75	1,4	2,0	1,0	1,8	1,2	0,4	0,4
<i>A. mirum</i> C276S	14	0,75	1,4	2,0	5,3	6,7	4,8	1,8	1,2
<i>A. mirum</i> C276T	16	0,75	1,4	2,0	5,5	8,6	7,7	2,4	1,4
<i>T. maritima</i> C277S	17	0,75	1,4	2,0	2,9	4,2	5,0	3,4	2,0
<i>T. maritima</i> C277T	18	0,75	1,4	2,0	4,1	6,2	5,5	2,1	1,1

EXEMPLO 17

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO A PARTIR DE TRIACETINA E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR ESTERASES CE-7 VARIANTES

[0150]As reações (10 mL de volume total) foram executadas a 25 °C em tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) contendo triacetina (10 mM), peróxido de hidrogênio (20 mM) e 0,5 µg/mL de esterase CE-7 a partir de *Actinosynnema mirum* tipo selvagem (SEQ ID NO: 4, preparada conforme descrito no Exemplo 1), variante C276S de *Actinosynnema Mirum* (SEQ ID NO: 14, preparada conforme descrito no Exemplo 13), variante C276T de *Actinosynnema mirum* (SEQ ID NO: 16, preparada conforme descrito no Exemplo 14), variante C277S de *T. maritima* (SEQ ID NO: 17), e variante C277T de *T. maritima* (SEQ ID NO: 18). Análise de extratos

celulares contendo a esterase CE-7 em géis de SDS-PAGE, em combinação com a análise dos géis utilizando o *ImageJ*, um programa de processamento de imagem em Java de domínio público, foi utilizada para calcular a concentração de esterase CE-7 nos extratos celulares como uma percentagem de proteína solúvel total. As reações foram agitadas durante apenas os primeiros 45 segundos de reação para misturar inicialmente os reagentes e a enzima. Uma reação de controle comparativo foi executada sob condições idênticas a descrita acima sem adicionar esterase CE-7, onde o ácido peracético produzido na ausência da esterase adicionada foi o resultado da perhidrólise química de triacetina pelo peróxido de hidrogênio sob as condições de reação especificadas. Análise das amostras de reação para a produção de ácido peracético seguiu o método descrito no Exemplo 7 (Tabela 10).

TABELA 10**PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO (PAA) CATALISADA PELA PERHIDROLASE CE-7****VARIANTE A PARTIR DE TRIACETINA E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM TAMPÃO****FOSFATO DE POTÁSSIO (50 mM, PH 7,0) A 25 °C.**

Fonte de esterase CE-7	SEQ ID NO	Triacetina (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	Esterase CE-7 variante (µg/mL)	PAA em 2 min (ppm)	PAA em 5 min (ppm)	PAA em 10 min (ppm)	PAA em 20 min (ppm)	PAA em 30 min (ppm)
controle - sem enzima		10	20	0	3,1	8,0	2,6	4,1	4,0
<i>A. mirum</i> tipo selvagem	4	10	20	0,5	8,1	11	19	34	46
<i>A. mirum</i> C276S	14	10	20	0,5	39	76	99	92	80
<i>A. mirum</i> C276T	16	10	20	0,5	26	60	96	118	115
<i>T. maritima</i> C277S	17	10	20	0,5	22	43	63	74	68

Fonte de esterase CE-7	SEQ ID NO	Triacetina (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	Esterase CE-7 variante (µg/mL)	PAA em 2 min (ppm)	PAA em 5 min (ppm)	PAA em 10 min (ppm)	PAA em 20 min (ppm)	PAA em 30 min (ppm)
<i>T. maritima</i> C277T	18	10	20	0,5	29	58	96	131	132

EXEMPLO 18

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO A PARTIR DE TRIACETINA E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR ESTERASES CE-7 VARIANTES

[0151] As reações (10 mL de volume total) foram executadas a 25 °C em tampão carbonato de sódio (20 mM, pH 10,5) contendo triacetina (0,75 mM), peróxido de hidrogênio (1,4 mM, a partir de percarbonato de sódio) e 1,0 µg/mL ou 2,0 µg/mL de esterase CE-7 a partir de *Actinosynnema mirum* tipo selvagem (SEQ ID NO: 4, preparada conforme descrito no Exemplo 1), variante C276S de *Actinosynnema Mirum* (SEQ ID NO: 14, preparada conforme descrito no Exemplo 13), variante C276T de *Actinosynnema mirum* (SEQ ID NO: 16, preparada conforme descrito no Exemplo 14), variante C277S de *T. maritima* (SEQ ID NO: 17), e variante C277T de *T. maritima* (SEQ ID NO: 18). Análise de extratos celulares contendo a esterase CE-7 em géis de SDS-PAGE, em combinação com a análise dos géis utilizando o *ImageJ*, um programa de processamento de imagem em Java de domínio público, foi utilizada para calcular a concentração de esterase CE-7 nos extratos celulares como uma porcentagem de proteína solúvel total. As reações foram agitadas durante apenas os primeiros 45 segundos de reação para misturar inicialmente os reagentes e a enzima. Uma reação de controle comparativo foi executada sob condições idênticas a descrita acima sem adicionar esterase CE-7, onde o ácido peracético produzido na ausência da esterase adicionada foi o resultado da perhidrólise química de triacetina pelo peróxido de hidrogênio sob as condições de reação especificadas. Análise das amostras de reação

para a produção de ácido peracético seguiu o método descrito no Exemplo 7 (Tabela 11).

TABELA 11

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO (PAA) CATALISADA PELA PERHIDROLASE CE-7

VARIANTE A PARTIR DE TRIACETINA E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM TAMPÃO

CARBONATO DE SÓDIO (20 mM, PH 10,5) A 25 °C.

Fonte de esterase CE-7	SEQ ID NO	Triacetina (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	Esterase CE-7 variante (µg/mL)	PAA em 2 min (ppm)	PAA em 5 min (ppm)	PAA em 10 min (ppm)	PAA em 20 min (ppm)	PAA em 30 min (ppm)
controle - sem enzima		0,75	1,4	0	1,3	2,7	4,7	7,7	9,7
<i>A. mirum</i> tipo selvagem	4	0,75	1,4	1,0	2,0	3,6	5,4	6,8	7,5
<i>A. mirum</i> C276S	14	0,75	1,4	1,0	4,6	9,3	13,0	16,0	17,0
<i>A. mirum</i> C276T	16	0,75	1,4	1,0	5,3	11,1	17,1	21,1	23,1
<i>T. maritima</i> C277S	17	0,75	1,4	1,0	2,9	5,2	8,0	11,1	12,0
<i>T. maritima</i> C277T	18	0,75	1,4	1,0	3,4	6,2	9,5	13,2	14,5
<i>A. mirum</i> tipo selvagem	4	0,75	1,4	2,0	2,1	3,8	5,2	6,3	6,5
<i>A. mirum</i> C276S	14	0,75	1,4	2,0	6,8	12,0	14,9	17,2	18,7
<i>A. mirum</i> C276T	16	0,75	1,4	2,0	8,6	16,0	20,7	24,4	26,1
<i>T. maritima</i> C277S	17	0,75	1,4	2,0	3,8	7,0	10,5	13,4	14,4
<i>T. maritima</i> C277T	18	0,75	1,4	2,0	4,7	8,4	12,8	16,5	17,9

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UM ÁCIDO PEROXICARBOXÍLICO, caracterizado por compreender:

(a) fornecimento de um conjunto de componentes de reação que compreende:

monoacetina; diacetina; triacetina; monopropionina; dipropionina; tripropionina; monobutirina; dibutirina; tributirina; penta-acetato de glicose; penta-acetato de β -D-galactose, hexa-acetato de sorbitol, octa-acetato de sacarose, tetra-acetato de xilose; xilana acetilada; fragmentos de xilana acetilada; β -D-ribofuranose-1,2,3,5-tetra-acetato; tri-O-acetil-D-galactal; tri-O-acetil-D-glucal; monoésteres ou diésteres de 1,2-etanodiol, 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, 1,2-butanodiol, 1,3-butanodiol, 2,3-butanodiol, 1,4-butanodiol, 1,2-pentanodiol, 2,5-pentanodiol, 1,6-pentanodiol, 1,2-hexanodiol, 2,5-hexanodiol, 1,6-hexanodiol; ácido 4-acetoxibenzóico; e misturas dos mesmos;

(2) uma fonte de peróxigênio; e

(3) um catalisador enzimático, compreendendo um polipeptídeo possuindo atividade perhidrolítica, em que referido polipeptídeo possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, desde que o resíduo de aminoácido ligado ao lado C-terminal da histidina catalítica seja diferente de ácido glutâmico;

(b) combinação do conjunto de componentes de reação sob condições de reação adequadas em que ácido peroxicarboxílico é produzido; e

(c) opcionalmente, diluição do ácido peroxicarboxílico produzido na etapa (b);

em que o ácido peroxicarboxílico produzido é ácido peracético, ácido perpropionico, ácido perbutírico, ácido perlático, ácido perglicólico, ácido

permetoxiacético, ácido per- β -hidroxibutírico, ou misturas dos mesmos.

2. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender adicionalmente a etapa de:

(d) contato de uma superfície rígida ou objeto inanimado com o ácido peroxicarboxílico produzido na etapa (b) ou etapa (c), em que a referida superfície rígida ou o referido objeto inanimado é desinfetado, branqueado, descorado ou uma combinação dos mesmos.

3. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo objeto inanimado ser um instrumento médico.

4. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender adicionalmente a etapa de: (d) contato de um artigo de vestuário ou têxtil com o ácido peroxicarboxílico produzido na etapa (b) ou etapa (c); em que o artigo de vestuário ou têxtil recebe um benefício.

5. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo benefício ser selecionado a partir do grupo que consiste em desinfecção, sanitização, branqueamento, descoloração, desodorização, e combinações dos mesmos.

6. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender adicionalmente a etapa de:

(d) contato da polpa de madeira ou polpa de papel com o ácido peroxicarboxílico produzido na etapa (b) ou etapa (c); em que a polpa de madeira ou polpa de papel é branqueada.

7. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo substrato ser triacetina.

8. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo catalisador enzimático estar na forma de uma enzima parcialmente purificada ou uma enzima purificada.

9. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pela sequência de aminoácidos ser SEQ ID NO: 14 ou 16.

10. COMPOSIÇÃO, obtida pelo processo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada por compreender:

(a) um conjunto de componentes de reação que compreende:

(1) pelo menos um substrato selecionado a partir do grupo consistindo em:

monoacetina; diacetina; triacetina; monopropionina; dipropionina; tripropionina; monobutirina; dibutirina; tributirina; penta-acetato de glicose; penta-acetato de β -D-galactose, hexa-acetato de sorbitol, octa-acetato de sacarose, tetra-acetato de xilose; xilana acetilada; fragmentos de xilana acetilada; β -D-ribofuranose-1,2,3,5-tetra-acetato ; tri-O-acetil-D-galactal; tri-O-acetil-D-glucal; monoésteres ou diésteres de 1,2-etanodiol, 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, 1,2-butanodiol, 1,3-butanodiol, 2,3-butanodiol, 1,4-butanodiol, 1,2-pentanodiol, 2,5-pentanodiol, 1,6-pentanodiol, 1,2-hexanodiol, 2,5-hexanodiol, 1,6-hexanodiol; ácido 4-acetoxibenzóico; e misturas dos mesmos;

(2) uma fonte de peroxigênio; e

(3) um catalisador enzimático, compreendendo um polipeptídeo possuindo atividade perhidrolítica, em que referido polipeptídeo possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, desde que o resíduo de aminoácido ligado ao lado C-terminal da histidina catalítica seja diferente de ácido glutâmico; e

(b) pelo menos um ácido peroxicarboxílico formado após a combinação do conjunto de componentes de reação de (a);

em que o ácido peroxicarboxílico produzido é ácido peracético, ácido perpropionico, ácido perbutírico, ácido perlático, ácido perglicólico, ácido permetoxiacético, ácido per- β -hidroxibutírico, ou misturas dos mesmos.

11. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por ser uma composição de tratamento de roupa.

12. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por ser uma composição para cuidados pessoais.

13. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por ser um xampu, uma loção corporal, um gel de banho, um hidratante tópico, um creme dental, um gel dental, um antisséptico bucal, um enxaguatório bucal, um enxaguatório antiplaca ou um produto de limpeza tópica.

14. SISTEMA DE GERAÇÃO E FORNECIMENTO DE PERÁCIDO, caracterizado por compreender:

(a) um primeiro compartimento compreendendo:

(1) um catalisador enzimático, compreendendo um polipeptídeo possuindo atividade perhidrolítica, em que referido polipeptídeo possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, desde que o resíduo de aminoácido ligado ao lado C-terminal da histidina catalítica seja diferente de ácido glutâmico;

(2) pelo menos um substrato selecionado a partir do grupo consistindo em:

monoacetina; diacetina; triacetina; monopropionina; dipropionina; tripropionina; monobutirina; dibutirina; tributirina; penta-acetato de glicose; penta-acetato de β -D-galactose, hexa-acetato de sorbitol, octa-acetato de sacarose, tetra-acetato de xilose; xilana acetilada; fragmentos de xilana acetilada; β -D-ribofuranose-1,2,3,5-tetra-acetato; tri-O-acetil-D-galactal; tri-O-acetil-D-glucal; monoésteres ou diésteres de 1,2-etanodiol, 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, 1,2-butanodiol, 1,3-butanodiol, 2,3-butanodiol, 1,4-butanodiol, 1,2-pentanodiol, 2,5-pentanodiol, 1,6-pentanodiol, 1,2-hexanodiol, 2,5-hexanodiol, 1,6-hexanodiol;

ácido 4-acetoxibenzóico; e misturas dos mesmos;

- (3) um tampão opcional; e
- (b) um segundo compartimento compreendendo;
 - (1) fonte de peróxigênio;
 - (2) um agente estabilizador de peróxido; e
 - (3) um tampão opcional.

15. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo substrato compreender triacetina.

16. POLIPEPTÍDEO ISOLADO, obtido pelo processo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado por possuir atividade perhidrolítica, em que referido polipeptídeo possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 ou SEQ ID NO: 16.

