



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

(21) PI 0718506-5 A2



* B R P I 0 7 1 8 5 0 6 A 2 *

(22) Data de Depósito: 20/09/2007
(43) Data da Publicação: 12/11/2013
(RPI 2236)

(51) Int.Cl.:
D06M 16/00
D06L 3/00
D06L 3/11
D06L 1/14
D06P 1/46
C11D 3/386
C12N 9/88

(54) Título: PECTATO LIASE E MÉTODO DE USO PARA BIOLIMPEZA

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 22/09/2006 US 60/846,329

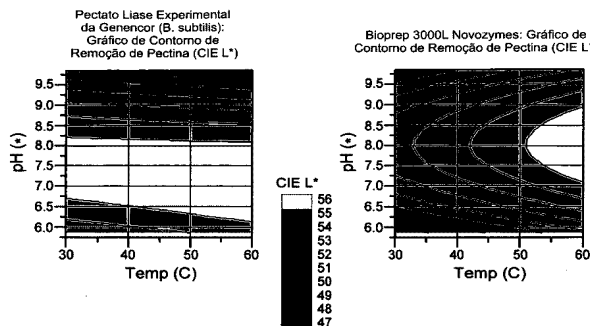
(73) Titular(es): Danisco Us Inc., Genencor Division

(72) Inventor(es): Ayrookaran J. Poulouse, Brian Schmidt, Franciscus J. C. Van Gastel, Mee-Young Yoon

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2007020410 de 20/09/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/039353de 03/04/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PECTATO LIASE E MÉTODO DE USO PARA BIOLIMPEZA**".

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

O presente pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório U.S. Nº 60/846.329 depositado em 22 de setembro de 2006 que é aqui incorporado a título de referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

Compostos e composições compreendendo uma pectato liase de *Bacillus subtilis*, seu uso em biolimpeza, alvejamento, tingimento, retirada de cola, tratamento de fibra celulósica e composições de limpeza e combinações dos mesmos conforme aqui descrito.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Polímeros de pectina são constituintes de paredes de célula de planta. Pectina é um heteropolissacarídeo com uma estrutura principal compreendida de homogalacturonana (regiões moles) e ramnogalacturonana (regiões pilosas) alternadas. Polímeros lineares de ácido α -D-galacturônico 1,4-ligado formam as regiões moles. As porções de ácido galacturônico podem ser esterificadas com metila no grupo carboxila para um grau variável, geralmente de uma maneira não-aleatória com blocos de ácido poligalacturônico sendo completamente esterificados com metila.

Pectinases podem ser classificadas por substrato preferencial, isto é, pectina esterificada com muita metila ou pectina esterificada com pouca metila e ácido poligalacturônico (pectato). Elas podem ser também classificadas através de seu mecanismo de reação, isto é, eliminação beta ou hidrólise. Pectinase pode ser principalmente de endo-ação, isto é, cortando o polímero em sítios aleatórios dentro da cadeia para dar uma mistura de oligômeros. Alternativamente, pectinases podem ser de exo-ação, com o que elas atacam a partir de uma extremidade da pectina. Várias atividades de pectinase que agem sobre as regiões moles de pectina estão incluídas na classificação de enzimas provida pela *Enzyme Nomenclature* (1992) tal como pectato liase (EC 4.2.2.2), pectina liase (EC 4.2.2.10), poligalacturonase (EC 3.2.1.15), pectina esterase (EC 3.2.1.11), galactanase

(EC 3.2.1.89), arabinase (EC 3.2.1.99) e manase (EC 3.2.1.78).

Pectato liases foram clonadas de gêneros de bactéria diferentes. Até agora, a maioria das pectato liases que foram purificadas tem uma atividade ótima de pH de oito ou mais, tipicamente tem uma faixa de temperatura ótima de 50°C ou mais e requer cátions divalentes para atividade máxima, com íons de cálcio sendo os mais estimuladores.

Composições capazes de retirada de cola, alveamento, limpeza, tingimento e combinações dos mesmos em uma etapa são necessárias, como o são reagentes de limpeza. No processamento têxtil de fibras naturais, fios e tecidos, uma etapa de pré-tratamento ou preparação é tipicamente requerida para preparar apropriadamente os materiais naturais para uso adicional e em particular para estágios de tingimento e/ou acabamento tipicamente requeridos para produtos comerciais. Essas etapas de tratamento têxtil removem impurezas e corpos coloridos, ou naturalmente existentes ou aqueles adicionados pelas etapas de fiação e tecelagem às fibras e/ou tecidos.

Embora tratamentos têxteis possam incluir vários tratamento e estágios variados, os mais comuns incluem: retirada de cola - a remoção de agentes de colagem, tal como amidos, através de imersão enzimática, alcalina ou oxidativa; limpeza - a remoção de gorduras, óleos, ceras, substâncias pécticas, grãos, proteína e gorduras através de contato com uma solução de hidróxido de sódio em temperaturas quase de ebulição; e alveamento - a remoção e clareamento de corpos coloridos de têxteis geralmente usando agentes de oxidação (tal como peróxido de hidrogênio, hipoclorito e dióxido de cloro) ou usando agentes de redução (tal como sais de dióxido de enxofre ou hidrossulfeto).

Processamento têxtil enzimático comercial tipicamente requer a separação dessas etapas de pré-tratamento devido à ampla variação de condições presentes em cada uma das etapas. No entanto, esta separação de etapas de tratamento leva a custos adicionais altos adicionados ao processo de tratamento geral devido à necessidade de etapas de enxágue múltiplas requeridas entre os respectivos estágios, e custos de energia altos

devido à alta temperatura de processamento acima de 95°C. As etapas de enxágue e/ou secagem adicionais acrescentam custos adicionais enormes, tempo e materiais de refugo ao processo de tratamento.

5 Deste modo, a combinação de vários estágios de pré-tratamento em um tratamento de uma etapa teria um benefício ambiental significativo e impacto significativo no tratamento comercial de têxteis na forma de custos e materiais de refugo reduzidos sobre os processos comerciais tipicamente empregados.

10 No entanto, a combinação dessas três etapas comuns, quando previamente investigada, foi insatisfatória. Tecnologia de alveamento empregada atualmente envolve o uso de alveamento com peróxido de hidrogênio alcalino em temperaturas em excesso de 95°C. Tais temperaturas altas e sistemas de alveamento fortes são completamente incompatíveis com as muitas enzimas utilizadas em uma operação de retirada de cola. Então, a
15 combinação da tecnologia de retirada de cola e alveamento em temperaturas em excesso de 95°C leva à destruição das enzimas de retirada de cola e um resultado de retirada de cola insatisfatório. Técnicas de retirada de cola alternativas, tal como imersão alcalina ou oxidativa, envolvem o uso de agentes químicos agressivos que levam a dano da fibra. Por outro lado,
20 redução da temperatura na qual o tratamento de uma etapa é conduzido para permitir retirada de cola eficaz resulta em um alveamento inaceitavelmente pobre com valores de brancura abaixo do limite comercialmente aceitável. Ainda, este tipo de processo de temperatura baixa sem uma enzima de limpeza produz um tecido de baixa capacidade umectante que é
25 inaceitável para processos de tingimento, impressão e acabamento adicionais.

Limpeza de manchas envolve a remoção de substâncias coloridas que compreendem as manchas. Um tipo comum de mancha se origina de materiais vegetais, tal como manchas de grama, vegetais (espinafre,
30 beterrabas, cenouras, tomates, frutas tal como bagas e uvas) e materiais derivados de planta tal como vinho, cerveja, sucos de fruta, molhos de tomate e similar. Os pigmentos geralmente aderem a materiais fibrosos

através de ligações covalentes ou através de ligação física ("grudam"). Remoção desses pigmentos pode ser muito difícil, uma vez que detergentes pode dificilmente remover a massa de fibra-pigmento de uma superfície que precisa ser limpa. Pesquisa mostrou que paredes de célula de planta
5 consistem em uma rede complicada de materiais fibrosos. A composição das paredes celulares varia consideravelmente dependendo da fonte do material vegetal. No entanto, em geral, a composição de uma planta compreende polissacarídeos não-amido. Esses polissacarídeos existem em várias formas, incluindo, por exemplo, celulose, hemicelulose e pectinas.

10 Então, há uma necessidade contínua de identificar pectato liases para uso em etapas de biolimpeza, alvejamento, retirada de cola, tingimento e combinações dos mesmos, bem como em composições detergentes, composições de limpeza, que têm uma temperatura ótima entre 10-50°C (por exemplo, 20-30°C), operem otimamente em um ambiente ácido a leve-
15 mente básico (pH < 8,5) e não sejam dependentes da presença de cátions divalentes, especialmente cálcio.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Deste modo, são aqui providos compostos, composições e métodos de uso dos mesmos para biolimpar, alvejar, retirar cola e/ou tingir
20 fibras celulósicas, bem como limpar substâncias duras e têxteis. Os métodos e composições descritos aqui obviam um ou mais dos problemas devido a limitações e desvantagens que são atualmente sentidas na técnica.

Então, um aspecto provido é uma pectato liase compreendendo o polipeptídeo da SEQ ID NO: 1. São ainda providas pectato liases obtidas
25 de *Bacillus subtilis* tendo um peso molecular de cerca de 43 kD e um pI de cerca de 7,3 sob condições de SDS-PAGE de redução. Um pH ótimo para algodão cru é cerca de 6,0 a 8,0, no entanto variaria se outro substrato for usado.

Outra modalidade provê um ácido nucleico codificando SEQ ID
30 NO: 1, tal como SEQ ID NO: 2. Vetores compreendendo o dito ácido nucleico operativamente ligado ao vetor são compreendidos como o são as células hospedeiro compreendendo o vetor e expressando o polipeptídeo

codificado pelo ácido nucleico. Células hospedeiro podem ser células hospedeiro procarióticas ou eucarióticas, tal como espécie de *Bacillus*.

Um aspecto adicional compreende uma composição de biolimpeza compreendendo uma das pectato liase descritas em uma solução aquosa. A composição de biolimpeza pode compreender ainda um agente de alvejamento ou composição de alvejamento. Agente de alvejamento inclui, mas não está limitado, um alvejante oxidativo, peróxido de sódio, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, dicloroisocianurato de sódio ou combinação dos mesmos. A composição de alvejamento pode ser, por exemplo, uma fonte de éster, uma acil transferase e uma fonte de peróxido de hidrogênio. A composição de biolimpeza e/ou composição de biolimpeza e alvejamento pode compreender ainda um agente de retirada de cola. As composições de biolimpeza podem compreender ainda enzimas de biolimpeza adicionais tal como pectinase, uma cutinase, uma celulase, uma hemicelulase, uma protease, uma lipase ou uma combinação das mesmas.

Em ainda uma modalidade adicional, uma composição de tratamento de uma etapa para têxteis é compreendida. As composições compreendem: (a) uma pectato liase obtida de *Bacillus subtilis* tendo um peso molecular de cerca de 43 kD, um pH de cerca de 7,3 sob condições de SDS-PAGE de redução; (b) uma ou mais enzimas de retirada de cola; e (c) um ou mais agentes de alvejamento e/ou composição de alvejamento. Seria aparente que alvejamento e tingimento não aconteceriam na mesma etapa, mas podem ser combinados com limpeza e retirada de cola. A composição pode compreender ainda uma enzima de biolimpeza selecionada do grupo consistindo em uma pectinase, uma cutinase, uma celulase, uma hemicelulase, uma protease, uma lipase e uma combinação das mesmas. A composição de tratamento de uma etapa pode compreender ainda um ou mais componentes auxiliares, onde o dito componente auxiliar é um tensoativo, um emulsificante, um agente de quelação e/ou um estabilizador ou uma combinação dos mesmos. A composição pode compreender ainda um ativador de alvejamento. Os agentes de alvejamento para uso nas ditas composições de tratamento de uma etapa incluem, mas não estão limitados

a, um alvejante oxidativo, peróxido de sódio, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, dicloroisocianurato de sódio ou combinações dos mesmos. Os tensoativos para uso na dita composição de tratamento de uma etapa podem incluir, mas não estão limitados a, um tensoativo não-iônico, um
5 tensoativo aniônico, um tensoativo catiônico, um tensoativo zwitteriônico ou uma combinação dos mesmos.

Outro aspecto compreende um método para limpeza e alvejamento de um têxtil compreendendo contato do têxtil por uma duração de tempo e sob condições adequadas para permitir branqueamento do têxtil
10 com uma solução aquosa compreendendo um alvejante e uma pectato liase obtida de *Bacillus subtilis* tendo um peso molecular de cerca de 43 kD, um pI de cerca de 7,3 sob condições de SDS-PAGE de redução. Condições adequadas que permitem branqueamento incluem um pH de cerca de 5 a cerca de 11; um tempo entre cerca de 2 minutos e 24 horas, com mais
15 preferência entre cerca de 15 minutos e 12 horas; e com mais preferência entre cerca de 30 minutos e 6 horas; uma temperatura entre cerca de 15°C e 90°C. Temperatura adequada pode ser decidida com base no processo usado para o tratamento. Temperatura adequada para limpeza em *pad batch* frio e alvejamento é cerca de 15°C a cerca de 45° C e de preferência cerca
20 de 25°C a cerca de 35°C. Temperaturas para processos contínuos, semicontínuos e outros em batelada incluem cerca de 15°C a cerca de 90°C, de preferência cerca de 20°C a cerca de 75°C e com mais preferência cerca de 25°C a cerca de 60°C. O agente de alvejamento pode ser peróxido de hidrogênio e presente em uma quantidade entre cerca de 100 ppm a 5000
25 ppm. Então um conjunto exemplar de condições compreendido compreende um pH de cerca de 6 a 8, uma duração de tempo de cerca de 2 minutos a 24 horas, uma temperatura de cerca de 25°C a 60°C e onde o alvejante é peróxido de hidrogênio e está presente em uma quantidade de cerca de 1000 ppm a 3000 ppm.

30 Ainda outro aspecto compreende um método para processamento em uma etapa de têxteis compreendendo: (a) provisão de uma composição de processamento têxtil de uma etapa e um têxtil com necessidade de

processamento, e onde a dita composição de processamento de têxtil de uma etapa compreende uma pectato liase obtida de *Bacillus subtilis* tendo um peso molecular de cerca de 43 kDa, um pI de cerca de 7,3 sob condições de SDS-PAGE de redução; (b) contato do dito têxtil com a dita

5 composição de processamento de têxtil de uma etapa por uma duração de tempo e sob condições suficientes para permitir retirada de cola, limpeza e alvejamento do têxtil. A composição de processamento de têxtil de uma etapa pode compreender ainda: (a) uma ou mais enzimas de biolimpeza; (b) um ou mais agentes de alvejamento e/ou composições de alvejamento; e (c)

10 um ou mais agentes de retirada de cola. Uma ou mais enzimas de biolimpeza podem incluir mas não estão limitadas a uma pectinase, uma cutinase, uma protease, uma celulase, uma hemicelulase, uma lipase ou uma combinação das mesmas. Agentes de retirada de cola podem incluir, mas não estão limitados a, uma amilase, uma celulase, uma manase ou uma

15 combinação das mesmas. A composição de processamento de têxtil de uma etapa pode compreender ainda um componente auxiliar selecionado do grupo consistindo em um tensoativo, um emulsificante, um agente de quebração, um estabilizador ou uma combinação dos mesmos. Agentes de alvejamento para uso na composição de processamento de têxtil de uma

20 etapa compreendida incluem, mas não estão limitados a, um sistema de alvejamento enzimático e alvejantes químicos tal como, mas não limitado a, alvejante oxidativo, peróxido de sódio, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, dicloroisocianurato de sódio ou combinações dos mesmos. Os têxteis para tratamento são aqueles compreendendo um material celulósico ou

25 contendo celulósico, por exemplo, algodão. As condições para realização de um processamento de uma etapa podem ser realizadas em uma temperatura de cerca de 15°C e 90°C, de preferência de a partir de cerca de 20°C a cerca de 75°C e com mais preferência de a partir de cerca de 25°C a cerca de 60°C e um pH de cerca de 5 a 10, com mais preferência de a

30 partir de cerca de 6 a cerca de 10 e com mais preferência de a partir de cerca de um pH de cerca de 6 a cerca de 8, por um tempo entre cerca de 2 minutos e 24 horas. A temperatura de tratamento e pH adequados podem

ser decididos dependendo do processo selecionado do tratamento.

Outro aspecto compreende um método para preparação de têxtil que compreende biolimpeza e alvejamento simultâneos ou sequenciais, onde a dita etapa de limpeza compreende contato do dito têxtil com uma
5 composição aquosa compreendendo uma pectato liase de *Bacillus* tendo um peso molecular de cerca de 43 kD, um pI de cerca de 7,3 sob condições de SDS-PAGE de redução e onde o dito contato acontece sob condições adequadas para biolimpeza.

Ainda um aspecto adicional compreende um método de
10 biolimpeza e tingimento de um têxtil compreendendo: (a) preparação de uma solução aquosa compreendendo uma pectato liase de *B. subtilis* tendo um peso molecular de cerca de 43 kD, um pI de cerca de 7,3 sob condições de redução de SDS-PAGE de redução e um pH ótimo de cerca de 6,0 a 8,0, e onde a dita pectato liase está presente em uma quantidade de cerca de 10 a
15 500 mol/min/kg de têxtil em um pH de cerca de 5 a 11, de preferência um pH de cerca de 5 a 9 e com mais preferência um pH de a partir de cerca de 6 a cerca de 8 e uma temperatura de cerca de 15°C a 90°C (ou de a partir de cerca de 20°C a cerca de 75°C ou com mais preferência de a partir de cerca de 25°C a cerca de 60°C) e tendo menos do que 2 mM de cátions
20 divalentes; (b) incubação do têxtil na solução aquosa por um tempo suficiente para biolimpeza; e (c) suplementação da solução aquosa com um sistema de tingimento e incubação do têxtil por um tempo suficiente para obter têxtil tingido.

Um aspecto adicional provê uma composição detergente
25 compreendendo: (a) um tensoativo; (b) uma pectato liase de *B. subtilis* tendo um peso molecular de cerca de 43 kD, um pI de cerca de 7,3 sob condições de SDS-PAGE de redução; e (c) opcionalmente um aditivo detergente onde o dito candidato a detergente é um *builder*, um agente de alvejamento, um agente antiespumante, um abrasivo, um agente de suspensão, um reagente
30 de liberação de sujeira, um bactericida, um lubrificante ou uma combinação dos mesmos. A composição detergente compreendida pode compreender ainda uma enzima hemicelulase tal como, mas não limitado a, xilanase,

arabinofuranosidase, actil xilano estearase, glucuronidase, esterase de ácido ferúlico, esterase de ácido coumárico, endo-galactanase, mananase, lichenase, endo-arabinase, exo-arabinase, exo-galactanase ou uma combinação das mesmas. A composição detergente pode compreender ainda uma protease, uma celulase, uma lipase ou uma combinação das mesmas.

Ainda um aspecto adicional compreende um método para limpeza de um têxtil compreendendo exposição de um têxtil com necessidade de limpeza a uma composição detergente compreendendo: (a) um tensoativo; (b) uma pectato liase de *B. subtilis* tendo um peso molecular de cerca de 43 kD, um pI de cerca de 7,3 sob condições de SDS-PAGE de redução; e (c) opcionalmente um aditivo detergente onde o dito candidato a detergente é um *builder*, um agente de alvejamento, um agente antiespumante, um abrasivo, um agente de suspensão, um agente de liberação de sujeira, um bactericida, um lubrificante ou uma combinação dos mesmos. A composição detergente pode compreender ainda uma protease, uma celulase, uma lipase ou uma combinação das mesmas.

Ainda um aspecto adicional provê composições e métodos para limpeza de superfícies duras. A dita composição pode compreender uma solução aquosa compreendendo uma pectato liase de *B. subtilis* tendo um peso molecular de cerca de 43 kD, um pI de cerca de 7,3 sob condições de SDS-PAGE de redução e um pH ótimo de cerca de 6,0 a 8,0. A faixa pode ser maior para composições de limpeza e detergente, por exemplo, de a partir de cerca de um pH de 5 a 11.

Deve ser compreendido que ambas a descrição geral acima e a descrição detalhada a seguir são exemplares e explicadoras e pretendem prover explicação adicional dos compostos, composições e métodos revelados.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Os desenhos acompanhantes são incorporados ao e constituem uma parte do presente pedido e ilustram. Junto com a descrição, as figuras servem para ilustrar os aspectos das composições e métodos discutidos.

A Figura 1 mostra a faixa de pH de pectato liase de *B. subtilis*

Exp. *B. subtilis* em remoção de pectina com pH no eixo y e temperatura (°C) no eixo x. A pectato liase de *B. subtilis* (painel da esquerda) foi comparada com a atividade de pectato liase comercialmente disponível de Bioprep 3000L (painel da direita). 2 ppm de cada enzima foram incubados com algodão não-limpo (Testfabrics, 428U) por 1 hora sob condições de pH (5,9-9,8) e temperatura (30-60°C) diferentes para comparar perfis de pH e temperatura preliminares da pectato liase de *B. subtilis* e Bioprep 3000L. O *design* experimental e análise de dados foram feitos usando um programa de *software* estatístico. Após tratamento com enzima e um enxágue completo do tecido de algodão. Os discos de tecido tratados foram tingidos com corante vermelho de rutênio para quantificar a quantidade de pectina restante no tecido após os tratamentos. Os tecidos tingidos foram então enxaguados completamente e secos ao ar antes da medição dos valores de CIE L* usando um espectrômetro Minolta CR-200. O CIE L* inferior indica ligação de pectina maior. Quanto maior a ligação de pectina, menor a performance de limpeza da enzima. Na figura, a sombra mais escura corresponde a menos remoção de pectina.

A Figura 2 mostra a resposta de dose de remoção de pectina de um tecido de algodão cru. O experimento foi realizado a 55°C por 20 minutos em um pH de 7,5 para a pectato liase de *B. subtilis* (GCOR). Para Bioprep 3000L, o ensaio foi novamente realizado a 55°C por 20 minutos, mas o pH foi aumentado para 8,2 para testar a enzima sob seu pH ótimo. O eixo x é apresentado em concentração de proteína total (ppm). O eixo y está em unidades CIE L*. CIE é a *Commission Internationale de l'Eclairage*. L é o parâmetro de intensidade de luz. "a" é um parâmetro de verde para vermelho e "b" é o parâmetro azul para amarelo.

A Figura 3 mostra performance de remoção de pectina de pectato liase de *B. subtilis* em 0,1 ppm (painel da esquerda), 0,5 ppm (painel do meio) e 1 ppm (painel da direita) através de pH (eixo y) e temperatura (°C) (eixo x). A pectato liase de *B. subtilis* tinha um espectro de temperatura amplo (isto é, 25-26°C) e espectro de pH amplo.

A Figura 4 mostra a estabilidade de pectato liase de *B. subtilis*

comparado com uma pectato liase comercialmente disponível em temperaturas diferentes e com concentrações diferentes de peróxido de hidrogênio. A Figura 4A mostra a estabilidade da enzima a 55°C, 0, 500, 2500 e 5000 ppm de peróxido de hidrogênio e compara pectato liase de *B. subtilis* (GCOR) e Bioprep 3000L. A Figura 4B mostra os resultados obtidos a 0 ppm e 2500 ppm de peróxido de hidrogênio conforme testado a 25°C na mesma quantidade de pectato liase com o tempo. A atividade da pectato liase de *B. subtilis* (GCOR) realmente aumentou com o tempo a 25°C.

A Figura 5 mostra estabilidade de pectato liase na presença ou ausência do quelante, EDTA e em temperatura ambiente (RT) ou a 55°C. Atividade foi medida como a atividade percentual (%) perdida em 1 hora. A atividade de pectato liase de *B. subtilis* (GCOR) foi comparada com BioPrep 3000L.

A Figura 6. NuPAGE 4-12% de Bis-Tris Gel com tampão contínuo MES demonstrando a pureza da pectato liase de *B. subtilis* e seu peso molecular relativo a controles.

A Figuras 7A e 7B. Os painéis A e B mostram limpeza por 10 ppm de pectato liase de *B. subtilis* em 0,15 mL/L de detergente líquido de limpeza pesada AATCC WOB 2003 sobre manchas frescas.

As Figuras 8A e 8B mostram limpeza por 1 ppm de pectato liase de *B. subtilis* em 1,5 mL/L de detergente líquido de limpeza pesada AATCC WOB 2003 sobre manchas frescas.

A Figura 9 mostra a comparação de performance de limpeza de pectato liase de *B. subtilis* comparado com amilase de *B. licheniformis* em detergente líquido de limpeza pesada AATCC WOB 2003 sobre manchas frescas.

A Figura 10 mostra a performance de limpeza de pectato liase de *B. subtilis* comparado com amilase de *B. licheniformis* em um detergente líquido AATCC WOB sobre manchas técnicas envelhecidas.

A Figura 11 mostra a performance de limpeza de pectato liase de *B. subtilis* comparado com amilase de *Bacillus sp.* 707 em um detergente líquido comercial sobre manchas frescas.

A Figura 12 mostra a performance de limpeza de pectato liase de *B. subtilis* comparado com amilase de *Bacillus sp.* 707 em um detergente líquido comercial sobre manchas técnicas envelhecidas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES PREFERIDAS

5 As composições, compostos e métodos serão agora descritos em detalhes a título de referência apenas usando as definições e exemplos que seguem. Todas as patentes e publicações, incluindo todas as sequências reveladas em tais patentes e publicações, referidas aqui são expressamente aqui incorporadas a título de referência em sua totalidade
10 para todos os propósitos.

Faixas numéricas são inclusivas dos números definindo a faixa.

A menos que de outro modo indicado, ácidos nucleicos são escritos da esquerda para a direita na orientação 5' para 3'; sequências de aminoácido são escritas da esquerda para a direita em orientação amino
15 para carbóxi, respectivamente.

Os cabeçalhos providos aqui não são limitações dos vários aspectos ou modalidades dos compostos, composições e métodos revelados, que podem ter tido referência no relatório como um todo. Deste modo, os termos definidos imediatamente abaixo são mais completamente
20 definidos com referência ao relatório como um todo.

1. Abreviações e Definições

1.1 Definição

A menos que de outro modo aqui definido, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como geralmente
25 compreendido por uma pessoa de habilidade comum na técnica. Por exemplo, Singleton e Sainsburry, *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY* (2ª ed., John Wiley and Sons, NY, 1994); e Hale e Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY* (Harper Perennial, NY, 1991) provê aqueles de habilidade na técnica com um
30 dicionário geral de muitos dos termos usados aqui.

Também, conforme aqui usado, os termos no singular, "o" e "a" incluem todas as referências no plural a menos que o contexto indique

claramente de outro modo. A menos que de outro modo indicado, ácidos nucleicos são escritos da esquerda para a direita na orientação 5' para 3'; sequências de aminoácido são escritas da esquerda para direita em orientação amino para carbóxi, respectivamente. Deve ser compreendido que as composições, compostos e métodos não são limitados à metodologia, protocolos e reagentes particulares descritos, uma vez que esses podem variar, dependendo do contexto que eles são usados por aqueles de habilidade na técnica.

É pretendido que cada limitação numérica máxima dada no presente relatório inclua cada limitação numérica inferior, como se tais limitações numéricas inferiores fossem expressamente escritas aqui. Cada limitação numérica mínima dada no presente relatório incluirá limitações numéricas maiores, como se tais limitações numéricas maiores fossem expressamente escritas aqui. Cada faixa numérica dada no presente relatório incluirá cada faixa numérica mais estreita que se encaixe em tal faixa numérica maior, como se tais faixas numéricas mais estreitas fossem todas expressamente escritas aqui.

O termo "alvejamento", conforme aqui usado, significa o processo de tratamento de materiais têxteis tal como uma fibra, fio, tecido, roupa e não-tecidos para produzir uma cor mais clara na dita fibra, fio, tecido, roupa ou não-tecidos. Por exemplo, alvejamento conforme aqui usado significa o branqueamento do tecido através de remoção, modificação ou mascaramento de compostos causadores de cor em materiais celulósicos ou outros têxteis. Então, "alvejamento" refere-se ao tratamento de um têxtil por uma duração de tempo suficiente e sob condições de pH e temperatura apropriadas para realizar um alvejamento (isto é, branqueamento) do têxtil. Alvejamento pode ser realizado usando agente alvejante químico e/ou agentes de alvejamento enzimaticamente gerados. Exemplos de agentes de alvejamento adequados incluem, mas não estão limitados a, ClO_2 , H_2O_2 , perácidos, NO_2 , etc. Nos presentes processos, métodos e composições, peróxidos tal como H_2O_2 e perácidos são de preferência gerados enzimaticamente.

O termo "agente alvejante" conforme aqui usado compreende qualquer porção que seja capaz de alvejar tecidos.

"Agente(s) de alveamento químico(s)" são entidades que são capazes de alveamento de um têxtil sem a presença de uma enzima. Eles podem requerer a presença de um ativador de alveamento. Exemplos de tais agentes de alveamento químicos adequados úteis nos processos, métodos e composições descritos aqui são peróxido de sódio, perborato de sódio, permanganato de potássio, outros perácidos. Em alguns aspectos, H_2O_2 pode ser considerado um agente de alveamento químico quando ele não foi gerado enzimaticamente *in situ*.

O termo "composição de processamento de têxtil de uma etapa" refere-se a uma preparação compreendendo pelo menos uma enzima de biolimpeza e pelo menos um agente de alveamento enzimaticamente gerado, agente de retirada de cola e/ou agente de tingimento. Então, em algumas modalidades, a composição de processamento compreende ainda pelo menos uma enzima de retirada de cola. A composição de processamento de têxtil de uma etapa vai conter enzimas suficientes para prover os níveis enzimáticos providos aqui no líquido de tratamento, isto é, o meio aquoso. Enzimas úteis aqui são enzimas do tipo selvagem bem como variantes das mesmas. De preferência, as variantes foram engenheiradas para serem oxidativamente estáveis, por exemplo, estáveis na presença de peróxido de hidrogênio e/ou na ausência de íons divalentes.

A expressão "sistema de alveamento enzimático" significa enzimas e substratos capazes de gerar enzimaticamente um agente de alveamento. Um sistema de alveamento enzimático pode compreender uma fonte de éster, uma acil transferase (ou per-hidrolase) e uma fonte de peróxido de hidrogênio.

"Fonte de éster" refere-se a substratos de per-hidrolase que contêm uma ligação éster. Ésteres compreendendo ácidos carboxílicos alifáticos e/ou aromáticos e álcoois são utilizados com as enzimas per-hidrolase. Em modalidades preferidas, a fonte de éster é um éster de acetato. Em algumas modalidades preferidas, a fonte de éster é selecionada

de um ou mais de diacetato de propileno glicol, diacetato de etileno glicol, triacetina, acetato de etila e tributirina. Em algumas modalidades preferidas, as fontes de éster são selecionadas dos ésteres de um ou mais ácidos que seguem: ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido nonanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico e ácido oleico.

O termo "fonte de peróxido de hidrogênio" significa peróxido de hidrogênio que é adicionado ao banho de tratamento têxtil ou a partir de uma fonte exógena (isto é, uma externa ou de fora) ou gerado *in situ* através da ação de uma oxidase de geração de peróxido de hidrogênio em seu substrato.

O termo "oxidase de geração de peróxido de hidrogênio" significa uma enzima que catalisa uma reação de oxidação/redução envolvendo oxigênio molecular (O_2) como o aceitador de elétron. Nessas reações, oxigênio é reduzido em água (H_2O) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Oxidases adequadas para uso aqui são oxidases que geram peróxido de hidrogênio (conforme oposto à água) em seu substrato. Um exemplo de uma oxidase de geração de peróxido de hidrogênio e seu substrato adequados para uso aqui seriam glicose oxidase e glicose. Outras enzimas (por exemplo, álcool oxidase, etileno glicol oxidase, glicerol oxidase, aminoácido oxidase, etc.) que podem gerar peróxido de hidrogênio também encontram uso com substratos de éster em combinação com as enzimas per-hidrolase para gerar perácidos. Em algumas modalidades, a oxidase de geração de peróxido de hidrogênio é uma carboidrato oxidase.

Conforme aqui usado, "têxtil" refere-se a fibras, fios, tecidos, roupas e não-tecidos. O termo compreende têxteis feitos de misturas naturais, sintéticas (por exemplo, fabricadas) e várias naturais e sintéticas. Então, o termo "têxteis(s)" refere-se a fibras, fios, tecidos ou tramados, não-tecidos e roupas não-processados e processados. No presente pedido, os termos "têxtil(eis)", "tecido(s)" e "roupa(s)" serão intercomutáveis a menos que expressamente provido de outro modo. O

termo "têxtil(eis) com necessidade de processamento" refere-se a têxteis que precisam ter a cola tirada e/ou limpos e/ou alvejados ou podem ter a necessidade de outros tratamentos, tal como biopolimento.

O termo "têxtil(eis) com necessidade de alvejamento" refere-se a 5 têxteis que precisam ser alvejados sem referência a outros possíveis tratamentos. Esses têxteis podem ou não ter sido já submetidos a outros tratamentos. Similarmente, esses têxteis podem ou não necessitar tratamentos subsequentes.

Conforme aqui usado, "material(ais) têxtil(eis)" é um termo geral 10 para fibras, intermediários de fio, fios, tecidos, produtos feitos de tecidos (por exemplo, roupas e outros artigos) e não-tecidos.

Conforme aqui usado, o termo "compatível" significa que os componentes de uma composição de processamento de têxtil de uma etapa não reduzem a atividade enzimática da pectato liase ou outras enzimas que 15 possam estar presentes na composição para tal ponto que a pectato liase não seja eficaz conforme desejado durante situações de uso normais. Materiais de composição específicos são exemplificados em detalhes a seguir.

Conforme aqui usado, "quantidade eficaz de enzima pectato 20 liase" refere-se à quantidade de enzima pectato liase necessária para atingir a atividade enzimática requerida nos processos ou métodos descritos aqui. Tais quantidades eficazes são prontamente certificadas por uma pessoa de habilidade comum na técnica e são baseadas em muitos fatores, tal como a variante de enzima particular usada, o pH usado, a temperatura usada e 25 similar, bem como os resultados desejados (por exemplo, nível de brancura, capacidade de tingimento, habilidade em tirar cola).

Conforme aqui usado, "agente químico oxidante" refere-se a um agente químico que tem a capacidade de alvejar um têxtil. O agente químico oxidante está presente em quantidade, pH e temperatura adequados para 30 alvejamento. O termo inclui, mas não está limitado a, peróxido de hidrogênio, alvejantes de cloro e perácidos.

Conforme aqui usado, o termo "conversão enzimática" refere-se

à modificação de um substrato para um intermediário ou a modificação de um intermediário para um produto final através de contato do substrato ou intermediário com uma enzima. Em algumas modalidades, contato é feito através de exposição direta do substrato ou intermediário à enzima
5 apropriada.

Conforme aqui usado, a expressão "estabilidade à proteólise" refere-se à habilidade de uma proteína (por exemplo, uma enzima) em suportar proteólise. Não é pretendido que o termo seja limitado ao uso de nenhuma protease particular para avaliar a estabilidade de uma proteína.

10 Conforme aqui usado, "estabilidade oxidativa" refere-se à habilidade de uma proteína em funcionar sob condições oxidativas. Em particular, o termo refere-se à habilidade de uma proteína em funcionar na presença de várias concentrações de H₂O₂ e/ou perácido. Estabilidade sob
várias condições oxidativas pode ser medida ou através de procedimentos
15 padrão conhecidos daqueles versados na técnica e/ou através dos métodos descritos aqui. Uma mudança substancial em estabilidade oxidativa é evidenciada por pelo menos cerca de 5% ou mais de aumento ou diminuição (na maioria das modalidades, é preferido um aumento) na meia-vida da atividade enzimática, comparado com a atividade enzimática presente na
20 ausência de compostos oxidativos.

Conforme aqui usado, "estabilidade em pH" refere-se à habilidade de uma proteína em funcionar em um pH particular. Em geral, a maioria das enzimas tem uma faixa de pH finita na qual elas funcionam. Em
adição às enzimas que funcionam em pHs de faixa média (isto é, em torno
25 de pH 7), existem enzimas que são capazes de funcionar sob condições com pHs muito altos ou muito baixos. Estabilidade em vários pHs pode ser medida ou através de procedimentos padrão conhecidos daqueles versados na técnica e/ou através de métodos descritos aqui. Uma mudança
substancial em estabilidade em pH é evidenciada por pelo menos cerca de
30 5% ou mais de aumento ou diminuição (na maioria das modalidades, é preferido um aumento) na meia-vida da atividade enzimática, comparado com a atividade enzimática no pH ótimo da enzima. No entanto, não é

pretendido que os presentes processos, métodos e/ou composições descritos aqui sejam limitados a nenhum nível de estabilidade de pH nem faixa de pH.

Conforme aqui usado, "estabilidade térmica" refere-se à
5 habilidade de uma proteína em funcionar em uma temperatura particular. Em geral, a maioria das enzimas tem uma faixa finita de temperaturas na qual elas funcionam. Em adição às enzimas que funcionam nas temperaturas de faixa média (por exemplo, temperatura ambiente), existem enzimas que são capazes de funcionar em temperaturas muito altas ou muito baixas.
10 Estabilidade térmica pode ser medida ou através de procedimentos conhecidos ou através dos métodos descritos aqui. Uma mudança substancial em estabilidade térmica é evidenciada por pelo menos cerca de 5% ou mais de aumento ou diminuição (na maioria das modalidades, é preferido um aumento) na meia-vida da atividade catalítica de um mutante
15 quando exposto a uma temperatura diferente (isto é, maior ou menor) do que a temperatura ótima para atividade enzimática. No entanto, não é pretendido que os processos, métodos e/ou composições descritos aqui sejam limitados a nenhum nível de estabilidade de temperatura nem faixa de temperatura.

Conforme aqui usado, o termo "estabilidade química" refere-se à
20 estabilidade de uma proteína (por exemplo, uma enzima) com relação a agentes químicos que afetam de modo adverso sua atividade. Em algumas modalidades, tais agentes químicos incluem, mas não estão limitado as, peróxido de hidrogênio, perácidos, tensoativos aniônicos, tensoativos catiônicos, tensoativos não-iônicos, quelantes, etc. No entanto, não é
25 pretendido que os processos, métodos e/ou composições descritos aqui sejam limitado as nenhum nível de estabilidade química nem nenhuma faixa de estabilidade química particular.

Conforme aqui usado, os termos "purificado" e "isolado" referem-se à remoção de contaminantes de uma amostra. Por exemplo, pectato
30 liases são purificadas através da remoção de proteínas contaminantes e outros compostos dentro de uma solução ou preparação que não são pectato liases. Em algumas modalidades, pectato liases recombinantes são

expressas em células hospedeiro bacterianas ou fúngicas e essas pectato liases recombinantes são purificadas através da remoção de outros constituintes de célula hospedeiro; a porcentagem de polipeptídeos de pectato liase recombinantes é então aumentada na amostra.

5 Uma "preparação purificada" ou uma "preparação substancialmente pura" de um polipeptídeo (tal como uma enzima), conforme aqui usado, significa um polipeptídeo que foi separado de outras proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos com os quais ele acontece naturalmente. De preferência, o polipeptídeo é também separado de
10 substâncias, por exemplo, anticorpos ou matriz de gel (por exemplo, poliacrilamida), que são usadas para purificá-lo. De preferência, o polipeptídeo constitui pelo menos 10, 20, 50, 70, 80 ou 95% em peso da preparação purificada. As enzimas podem ser usadas ou fornecidas em algumas modalidades tal como uma preparação purificada.

15 Conforme aqui usado, "proteína" refere-se a qualquer composição compreendida de aminoácidos e reconhecida como proteína por aqueles de habilidade na técnica. Os termos "proteína", "peptídeo" e "polipeptídeo" são usados intercomutavelmente aqui. Onde um peptídeo for uma porção de uma proteína, aqueles de habilidade na técnica
20 compreendem o uso do termo no contexto.

 Conforme aqui usado, proteínas funcionalmente e/ou estruturalmente similares são consideradas ser "proteínas relacionadas". Em algumas modalidades, essas proteínas são derivadas de um gênero e/ou espécie diferente, incluindo diferenças entre classes de organismos (por
25 exemplo, uma proteína bacteriana e uma proteína fúngica). Em algumas modalidades, essas proteínas são derivadas de um gênero e/ou espécie diferente, incluindo diferenças entre classes de organismos (por exemplo, uma enzima bacteriana e uma enzima fúngica). Em modalidades adicionais, proteínas relacionadas são providas da mesma espécie. Na verdade, não é
30 pretendido que os processos, métodos e/ou composições descritos aqui sejam limitados a proteínas relacionadas de qualquer fonte(s) particular(es). Ainda, o termo "proteínas relacionadas" compreende homólogos estruturais

terciários e homólogos de sequência primários. Em modalidades adicionais, o termo compreende proteínas que são imunologicamente reativo-cruzadas.

Conforme aqui usado, o termo "derivado" refere-se a uma proteína que é derivada de uma proteína através da adição de um ou mais aminoácidos a um ou ambas as extremidades C- e N-terminais, substituição de um ou mais aminoácidos em um ou vários sítios diferentes na sequência de aminoácido e/ou deleção de um ou mais aminoácidos em uma ou ambas extremidades da proteína ou em um ou mais sítios na sequência de aminoácido, e/ou inserção de um ou mais aminoácidos em um ou mais sítios na sequência de aminoácido. A preparação de um derivado de proteína pode ser conseguida através da modificação de uma sequência de DNA, que codifica a proteína nativa, transformação desta sequência de DNA para um hospedeiro adequado e expressão da sequência de DNA modificada para formar a proteína derivada.

Proteínas relacionadas (e derivado) compreendem "proteínas variantes". Em algumas modalidades preferidas, proteínas variantes diferem de uma proteína de origem, por exemplo, uma proteína do tipo selvagem, e uma da outra por um número pequeno de resíduos de aminoácido. O número de resíduos de aminoácido diferentes pode ser um ou mais, de preferência 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ou mais resíduos de aminoácido. O número de aminoácidos diferente entre variantes está entre 1 e 10. Em alguns aspectos, proteínas relacionadas e particularmente proteínas variantes compreendem pelo menos 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência de aminoácido. Adicionalmente, uma proteína relacionada ou uma proteína variante conforme aqui usado refere-se a uma proteína que difere de outra proteína relacionada ou proteína de origem no número de regiões proeminentes. Por exemplo, em algumas modalidades, proteínas variantes têm 1, 2, 3, 4, 5 ou 10 regiões proeminentes correspondentes que diferem da proteína de origem.

Vários métodos são conhecidos na técnica e são adequados para geração de variantes das enzimas descritas aqui, incluindo, mas não

limitado a, mutagênese de saturação de sítio, mutagênese de varredura, mutagênese insercional, mutagênese aleatória, mutagênese direcionada ao local e evolução direcionada, bem como várias outras abordagens recombinatoriais.

5 Em modalidades particularmente preferidas, proteínas homólogas são engenheiradas para produzir enzimas com a(s) atividade(s) desejada(s).

Conforme aqui usado, o termo "sequência análoga" refere-se a uma sequência dentro de uma proteína que provê função, estrutura terciária e/ou resíduos conservados similares à proteína de interesse (isto é, tipicamente a proteína original de interesse). Por exemplo, em regiões de epítopo que contêm uma hélice alfa ou uma estrutura beta folha, a substituição de aminoácidos na sequência análoga de preferência mantém a mesma estrutura específica. O termo também refere-se a sequências de nucleotídeo, bem como sequências de aminoácido. Em algumas modalidades, sequências análogas são desenvolvidas de modo que os aminoácidos de substituição resultam em uma enzima variante mostrando uma função similar ou melhorada. Em algumas modalidades preferidas, a estrutura terciária e/ou resíduos conservados dos aminoácidos na proteína de interesse estão localizados no ou próximo ao segmento ou fragmento de interesse. Então, onde o segmento ou fragmento de interesse contém, por exemplo, uma estrutura alfa-hélice ou beta-folha, os aminoácidos de substituição de preferência mantêm esta estrutura específica.

Conforme aqui usado, "proteína homóloga" refere-se a uma proteína (por exemplo, pectato liase) que tem ação e/ou estrutura similar a uma proteína de interesse (por exemplo, uma pectato liase de outra fonte). Não é pretendido que homólogos estejam necessariamente relacionados evolucionariamente. Então, é pretendido que o termo compreenda a(s) mesma(s) enzima(s) ou similar(es) (isto é, em termos de estrutura e função) obtidas de espécies diferentes. Em algumas modalidades preferidas, é desejável identificar um homólogo que tenha uma estrutura quaternária, terciária e/ou primária similar à proteína de interesse, uma vez que

substituição para o segmento ou fragmento na proteína de interesse com um segmento análogo do homólogo vai reduzir a quebra da mudança. Em algumas modalidades, proteínas homólogas induzem resposta(s) imunológica(s) similar(es) como uma proteína de interesse.

5 Conforme aqui usado, proteínas do "tipo selvagem" ou "nativas" são aquelas encontradas na natureza. Os termos "sequência do tipo selvagem" e "gene do tipo selvagem" são usados intercomutavelmente aqui para se referir a uma sequência que é nativa ou de ocorrência natural em uma célula hospedeiro. Em algumas modalidades, a sequência do tipo
10 selvagem refere-se a uma sequência de interesse que é o ponto de partida de um projeto de engenharia de proteína. Os genes codificando a proteína de ocorrência natural podem ser obtidos de acordo com os métodos gerais conhecidos daqueles versados na técnica. Os métodos geralmente compreendem sintetização de sondas marcadas tendo sequências putativas
15 codificando regiões da proteína de interesse, preparação de bibliotecas genômicas a partir de organismos expressando a proteína e avaliação das bibliotecas quanto ao gene de interesse através de hibridização para as sondas. Clones de hibridização positivamente são então mapeados e sequenciados.

20 O grau de homologia entre sequências pode ser determinado usando qualquer método conhecido na técnica adequado (vide, por exemplo, Smith e Waterman, 2 ADV. APPL. MATH., 482 (1981); Needleman e Wunsch, 48 J. MOL. BIOL. 443 (1970); Pearson e Lipman, 85 PROC. NAT'L ACAD. SCI. USA 2444 (1988); programas tal como GAP, BESTFIT, FASTA
25 e TFASTA no *Wisconsin Genetics Software Package* (Genetics Computer Group, Madison, WI); e Devereux e outros, 12 NUCL. ACID RES. 387-395 (1984)).

30 Por exemplo, PILEUP é um programa útil para determinar níveis de homologia de sequência. PILEUP cria um alinhamento de sequência múltiplo a partir de um grupo de sequências relacionadas usando alinhamentos em pares, alinhados. Ele pode ser também uma árvore mostrando as relações de agrupamento usadas para criar o alinhamento.

PILEUP usa uma simplificação do método de alinhamento progressivo de Feng e Doolittle (Feng e Doolittle, 35 J. MOL. EVOL. 351-360 (1987)). O método é similar àquele descrito por Higgins e Sharp (Higgins e Sharp, 5 CABIOS 151-153 (1989)). Parâmetros de PILEUP úteis incluindo um peso de lacuna padrão de 3,00, um peso de comprimento de lacuna *padrão* de 0,10 e lacunas de extremidade ponderadas. Outro exemplo de um algoritmo útil é o algoritmo BLAST, descrito por Altschul e outros (Altschul e outros, 215 J. MOL. BIOL., 403-410 (1990); e Karlin e outros, PROC. NAT'L ACAD. SCI. USA 90:5873-5787 (1993)). Um programa BLAST particularmente útil é o programa WU-BLAST-2 (vide Altschul e outros, 266 METH. ENZYMOL., 460-480 (1996)). Parâmetros "W", "T" e "X" determinam a sensibilidade e velocidade do alinhamento. O programa BLAST usa como *defaults* um comprimento de palavra (W) de 11, alinhamentos (B) de 50 de matriz de *scoring* BLOSUM62 (Vide Henikoff e Henikoff, 89 PROC. NAT'L ACAD. SCI. USA 10915 (1989)), expectativa (E) de 10, M'5, N'-4 e uma comparação de ambos filamentos.

As expressões, "substancialmente similar" e "substancialmente idêntica" no contexto de pelo menos dois ácidos nucleicos ou polipeptídeos tipicamente significa que um polinucleotídeo ou polipeptídeo compreende uma sequência que tem pelo menos cerca de 40% de identidade, com mais preferência pelo menos cerca de 50% de identidade, com mais preferência ainda pelo menos cerca de 60% de identidade, com preferência pelo menos cerca de 75% de identidade, com mais preferência pelo menos cerca de 80% de identidade, com mais preferência ainda pelo menos cerca de 90%, com mais preferência ainda de preferência cerca de 95%, com mais preferência cerca de 97% de identidade, algumas vezes um máximo de cerca de 98% e cerca de 99% de identidade de sequência, comparado com a sequência de referência (isto é, tipo selvagem). Identidade de sequência pode ser determinada usando programas conhecidos tal como BLAST, ALIGN e CLUSTAL usando parâmetros padrão (vide, por exemplo, Altschul e outros, 215 J. MOL. BIOL., 403-410 (1990); Henikoff e outros, 89 PROC. NAT'L. ACAD. SCI. USA 10915 (1989); Karin e outros, 90, PROC. NAT'L.

ACAD .SCI. 90:5873 (1993); e Higgings e outros, 73 GENE 73:237-244 (1988)). *Software* para realização de análises BLAST está publicamente disponível através do *National Center for Biotechnology Information*. Bancos de dados podem ser pesquisados usando FASTA (Pearson e outros, 85, Proc. NAT'L. ACAD. SCI. USA 2444-2448 (1988)). Uma indicação que dois polipeptídeos são substancialmente idênticos é que o primeiro polipeptídeo é imunologicamente reativo cruzado com o segundo polipeptídeo. Tipicamente, polipeptídeos que diferem por substituições de aminoácido conservativas são imunologicamente reativos cruzados. Então, um polipeptídeo é substancialmente idêntico a um segundo polipeptídeo, por exemplo, onde os dois peptídeos diferem apenas por uma substituição conservativa. Outra indicação que duas sequências de ácido nucleico são substancialmente idênticas é que as duas moléculas hibridizam uma para a outra sob condições estringentes (por exemplo, dentro de uma faixa de estringência média a alta).

O termo "simultaneamente" ou "simultâneo" ou "uma etapa" pretende indicar que pelo menos uma porção (por exemplo, de preferência cerca de 75% ou mais, com mais preferência cerca de 90% ou mais) de retirada de cola, limpeza, alvejamento e tingimento (e combinações dessas etapas) é realizada em uma única operação. O termo não pretende significar que os têxteis tratados através dos métodos e composições não podem ser tratados mais de uma vez. Pelo contrário, o termo significa que para cada ciclo de tratamento, componentes múltiplos, conforme detalhado em outro lugar no presente pedido, são usados em processamento do têxtil de uma vez. Da mesma maneira, os componentes do tratamento podem ser adicionados de uma vez, todos de uma vez ou em grupos contanto que para pelo menos uma porção do ciclo de tratamento todos os componentes estejam presentes. A porção do ciclo de tratamento onde todos os componentes estão presentes pode variar dependendo do comprimento total do ciclo de tratamento.

O termo "simultaneamente" pretende também indicar em algumas modalidades que pelo menos uma porção da biolimpeza e

alvejamento enzimático é realizada em uma operação única. Isto tem a vantagem óbvia de que a lavagem e outros tratamentos normalmente realizados entre etapas de limpeza, alvejamento e/ou tingimento separadamente conduzidas não são mais necessários. Deste modo, a
5 demanda por água, tempo e energia bem como a demanda por equipamento diferente a ser usado para cada um dos processos são consideravelmente reduzidas. Ainda, dependendo do tipo de tecido a ser tratado e da natureza de impurezas presentes nele, um efeito de retirada de cola pode ser obtido durante a performance dos processos discutidos aqui. Então, em tais casos,
10 nenhum tratamento de retirada de cola adicional precisa ser realizado. Embora seja preferido que toda a retirada de cola seja realizada em conjunto com a etapa de alvejamento, uma pessoa de habilidade comum na técnica vai reconhecer que alguma porção da retirada de cola pode ser realizada separadamente da etapa de alvejamento. O termo "cola" ou "colagem"
15 refere-se a compostos usados na indústria têxtil para melhorar a performance de ondulação através do aumento da resistência à abrasão e resistência do fio. Cola é geralmente feita de, por exemplo, amido ou compostos tipo amido.

O termo "retirada de cola" ou "retirando cola", conforme aqui
20 usado, refere-se ao processo de eliminação de cola, geralmente amido, de têxteis geralmente antes da aplicação de acabamentos, corantes ou alvejantes especiais.

"Enzima(s) de retirada de cola" conforme aqui usado refere-se a
25 enzimas que são usadas para remover enzimaticamente a cola. Enzimas exemplares são amilases e mananases.

O termo "biolimpeza" conforme aqui usado significa remover
impurezas, por exemplo, muito dos compostos não-celulósicos (por exemplo, pectinas, proteínas, cera e grãos, etc) naturalmente encontrados em algodão e outros têxteis. Em adição às impurezas não-celulósicas naturais, limpeza
30 pode remover, em algumas modalidades, materiais introduzidos pela fabricação residuais tal como lubrificantes de fiação, cone e corte. Limpeza significa biolimpeza, mas também inclui o uso de agentes de limpeza

químicos pesados tal como hidróxido de sódio.

O termo "enzima(s) de biolimpeza" então refere-se a enzima(s) capaz(es) de remover pelo menos uma porção das impurezas encontradas em algodão e outros têxteis.

5 O termo "grãos" refere-se a impurezas indesejadas, tal como fragmentos de semente de algodão, folhas, caules e outras partes de planta, que aderem à fibra mesmo após processo de descaroçamento mecânico.

O termo têxteis "crus", conforme aqui usado, refere-se a têxteis que não receberam nenhum alvejamento, tingimento ou tratamento de
10 acabamento após serem produzidos. Por exemplo, qualquer tecido tecido ou tricotado fora do aparelho de tecer que não foi ainda acabado (teve cola retirada, limpo, etc), alvejado ou tingido é chamado um têxtil cru. Os têxteis usados nos exemplos, *infra*, são têxteis crus.

O termo "tingimento", conforme aqui usado, refere-se à
15 aplicação de uma cor, especialmente banhando em uma solução colorida para, por exemplo, têxteis.

O termo fibra, fio ou tecido "celulósico não-algodão" significa fibras, fios ou tecidos que são compreendidos principalmente de uma composição baseada em celulose outra que não algodão. Exemplos de tais
20 composições incluem linho, rami, juta, *raiom*, *lyocell*, acetato de celulose e outras composições similares que são derivadas de celulósicos não-algodão.

O termo "protease" significa um domínio de proteína ou polipeptídeo de uma proteína ou peptídeo derivado de um microorganismo, por exemplo, fungo, bactéria ou de uma planta ou animal, e que tem a
25 habilidade em catalisar clivagem de ligações peptídeo em uma ou mais de várias posições de uma estrutura principal de carboidrato de proteína.

O termo "cutinase", conforme aqui usado, refere-se a uma enzima derivada de uma planta, bacteriana ou fúngica usada em processamento têxtil. Cutinases são enzimas lipolíticas capazes de hidrólise
30 do substrato cutina. Cutinases podem quebrar ésteres de ácido graxo e outras composições à base de óleo que precisam ser removidas no processamento (por exemplo, a limpeza) de têxteis. "Cutinase" significa uma

enzima que tem atividade de hidrólise de cutina de planta significante. Especificamente, uma cutinase terá atividade hidrolítica sobre a cutina do polímero de poliéster encontrado em folhas de plantas. Cutinases adequadas podem ser isoladas de muitas fontes de planta, fúngicas e bacterianas diferentes. Exemplos de cutinases são providos em LIPASES: STRUCTURE, MECHANISM AND GENETIC ENGINEERING, 71-77 (VCH Publishers, editado por Alberghina, Schmid & Verger, 1991); LIPASES, 471-77 (Elsevier, editado por Borgstrom & Brockman, 1984); e Sebastian e outros, 169, J. BACTERIOLOGY, 131-136 (1987).

O termo "pectato liase", conforme aqui usado, refere-se a um tipo de pectinase que cliva pectato para dar oligossacarídeos com grupos 4-desóxi-alfa-D-gluc-4-enuronosila em suas extremidades de não-redução. "Pectinases" são um grupo de enzimas que cliva ligações glicosídicas de substâncias pécticas, principalmente poli(1,4-alfa-D-galacturonida) e seus derivados (vide Sakai e outros, "Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications", em 39 ADVANCED IN APPLIED MICROBIOLOGY, 213-194 (1993)). Pectato liase é também referida como uma poligalacturonato liase (EC 4.2.2.2) (PGL) e poli(1,4-alfa-D-galacturonida) liase. Por "liase de *B. subtilis*" pretende incluir o polipeptídeo de SEQ ID NO: 1, bem como variantes do mesmo que são caracterizadas como tendo uma faixa de pH de cerca de 6 a cerca de 8 quando usando algodão cru como um substrato, um pl de cerca de 7,3, uma faixa de temperatura de cerca de 15°C a cerca de 90°C e é de cerca de 43 kD. Deve ser notado que a faixa de pH pode variar dependendo do substrato usado. Outras faixas de temperatura que podem ser usadas incluem de a partir de cerca de 20°C a cerca de 75°C, e com mais preferência de a partir de cerca de 25°C a cerca de 60°C. Então, variantes podem incluir pectato liases obtidas de outras linhagens de *B. subtilis*.

O termo "pectina" significa pectato, ácido poligalacturônico e pectina que podem ser esterificados para um grau maior ou menor.

O termo " α -amilase", conforme aqui usado, refere-se a uma enzima que cliva as ligações α (1-4)glicosídicas de amilose para dar

moléculas de maltose (dissacarídeos de α -glicose). Amilases são enzimas digestivas encontradas em saliva e são também produzidas por muitas plantas. Amilases quebram carboidratos de cadeia longa (tal como amido) em unidades menores. Uma α -amilase "oxidativa estável" é uma α -amilase que é resistente à degradação por meios oxidativos, quando comparado com α -amilase não-oxidativa estável, especialmente quando comparado com forma de α -amilase não-oxidativa estável da qual α -amilase oxidativa estável foi derivada.

Conforme aqui usado, "microorganismo" refere-se a uma bactéria, um fungo, um vírus, um protozoário e outros micróbios ou organismos microscópicos.

Conforme aqui usado, uma substância (por exemplo, um polinucleotídeo ou proteína) "derivada de" um microorganismo significa que a substância é nativa para o microorganismo.

1.2 Abreviações

As abreviações que seguem são usadas aqui e referem-se a palavras e frases associadas:

AATCC	American Association of Têxtil Chemists and Colorists
APSU	unidade padrão de pectinase alcalina
ATCC	American Type Culture Collection
bp	pares de base
CBG	celobiohidrolase
CMC	carboximetilcelulose
CWDE	enzima de degradação de parede celular
EC	Classe de Enzima
ECU	unidades de endo-celulose
EDTA	etilenodiaminotetraacetato
EGTA	ácido etileno glicol-O,-O'-bis(2-amino-etil)-N,N,N',N'-tetraacético
FPLC	cromatografia líquida de proteína rápida
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
kDa	kilo Dálton
K_m	constante Michaelis-Menten

	pl	ponto isoelétrico
	ppm	partes por milhão
	PVA	álcool de polivinila
	RAU	unidade amilase de referência
5	SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio
	sp.	Espécie como em microorganismo
	TAU	unidade amilase termoestável
	TSAU	unidade de amilase estearotermofilus têxtil
	TTAU	unidade de amilase termoestável têxtil
10	V_{max}	símbolo para velocidade máxima (isto é, taxa limitante) de uma reação de enzima
	w/v	porcentagem em peso de uma substância do volume total
	p/p	em peso

2. Isolamento e Caracterização de Pectato Liase de *B. subtilis*

15 Uma pectato liase (*pel*) foi obtida de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* linh. 168. A proteína foi então superexpressa em *B. subtilis*. A proteína expressa tem uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1. A pectato liase de *B. subtilis* é codificada pelo gene *pel* (SEQ ID NO: 2):

5'-

20 GCTGATTTAGGCCACCGACGTTGGGATCCAATGATGGCTGGGGCGCG
TACTC
GACCGGCACGACAGGCGGATCAAAGCATCCTCCTCAAATGTGTATAC
CGTCAGCAACAGAAACCAGCTTGTCTCGGCATTAGGGAAGGAAACGAA
CACAACGCCAAAAATCATTATATCAAGGGAACGATTGACATGAACGTG
25 GATGACAATCTGAAGCCGCTTGGCCTAAATGACTATAAAGATCCGGAGT
ATGATTTGGACAAATATTTGAAAGCCTATGATCCTAGCACATGGGGCAA
AAAAGAGCCGTCGGGAACACAAGAAGAAGCGAGAGCACGCTCTCAGAA
AAACCAAAAAGCACGGGTCATGGTGGATATCCCTGCAAACACGACGATC
GTCGGTTCAGGGACTAACGCTAAAGTCGTGGGAGGAACTTCCAAATCA
30 AGAGTGATAACGTCATTATTCGCAACATTGAATTCCAGGATGCCTATGAC
TATTTTCCGCAATGGGATCCGACTGACGGAAGCTCAGGGAACTGGA
CACAATACGACAACATCACGATAAACGGCGGCACACACATCTGGATTGA

TCACTGTACATTTAATGACGGTTCGCGTCCGGACAGCACATCACCGAAA
 TATTATGGAAGAAAATATCAGCACCATGACGGCCAAACGGATGCTTCCA
 ACGGTGCTAACTATATCACGATGTCCTACAACCTATTATCACGATCATGAT
 AAAAGCTCCATTTTCGGATCAAGTGACAGCAAAACCTCCGATGACGGCA
 5 AATTA AAAATTACGCTGCATCATAACCGCTATAAAAATATTGTCCAGCGC
 GCGCCGAGAGTCCGCTTCGGGCAAGTGACGTATAACAACCTATTAT
 GAAGGAAGCACAAGCTCTTCAAGTTATCCTTTTAGCTATGCATGGGGAA
 TCGGAAAGTCATCTAAAATCTATGCCCAAACAATGTCATTGACGTACCG
 GACTGTCAGCTGCTAAAACGATCAGCGTATTCAGCGGGGGGAACGGCT
 10 TTATATGACTCCGGCACGTTGCTGAACGGCACACAGATCAACGCATCGG
 CTGCAAACGGGCTGAGCTCTTCTGTTCGGCTGGACGCCGTCTCTGCATG
 GATCGATTGATGCTTCTGCTAATGTGAAATCAAATGTTATAAATCAAGCG
 GGTGCGGGTAAATTAAT-3'.

A pectato liase de 420 aminoácidos será provavelmente
 15 classificada em Classe de Enzima EC 4.2.2.2. Ela tem as propriedades que
 seguem:

Aminoácidos, DNA	420 resíduos; 1260 pares de base
Peso Molecular	45.497
Função	pectato liases (EC 4.2.2.2)
20 Agrupamento de proteína	IG hipotético 16615

A proteína madura tem um peso molecular calculado de 43,4
 kDa e pI de 7,3 com base na análise em gel de SDS-PAGE de redução. A
 proteína madura tem a sequência que segue (mostrada na orientação amino
 para carbóxi):

25 ADLGHQTLGSNDGWGAYSTGTTGGSKASSSNVYTVSNRNQLVSALGKET
 NTPKIIYIKGTIDMNVDDNIKPLGLNDYKDPEYDLDKYLKAYDPSTWKGKKEP
 SGTQEEARARSQKNQKARVMVDIPANTTIVGSGTNAKVVGGNFQIKSDVIIR
 NIEFQDAYDYFPQWDPTDGSSGNWNSQUDNITINGGTHIWIDHCTFNDGS
 RPDSTSPKYYGRKYQHHDGQTDASNGANYITMSYNYHDHDKSSIFGSSD
 30 SKTSDDGKLIKITLHHNRYKNIVQRAPRVRFQVHVYNNYYEGSTSSSSYPF
 SYAWGIGKSSKIYAQNNVIDVPGLSAAKTISVFSGGTALYDSGTLNLTQIN
 ASAANGLSSSVGWTPSLHGSIDASANVKSINVINQAGAGKLN (SEQ ID NO:

1). A proteína foi expressa como uma proteína de fusão fundida à sequência de sinal AprE. A sequência de sinal foi então clivada durante secreção da proteína. Outras sequências de sinal podem ser substituídas.

O gene *pel* de *B. subtilis* foi clonado na linhagem de *B. subtilis* BG3594comK como a célula hospedeiro. Outras células podem ser substituídas para expressão do gene. A proteína madura produzida pela linhagem de *B. subtilis* BG3594comK tinha um peso molecular calculado de 43,4 kDa e pI de 7,3. Esta proteína tem uma faixa de pH ampla e uma faixa de temperatura ampla. Figura 3. O pH ótimo da pectato liase revelada é menor do que aquele de Bioprep® 3000L (Novozymes, faixa de pH de 7,5-8,5). Vide Figura 1. Adicionalmente, a atividade de pH ótima da pectato liase revelada aqui tem atividade em uma faixa ampla de temperatura (isto é, 20°C a 65°C), diferente daquela de Bioprep 3000L que tem uma faixa de temperatura estreita onde ela age.

A pectato liase revelada aqui tem uma resposta de dose de remoção de pectina em grande excesso para aquela obtida pela Bioprep 3000L. Vide Figura 2. A pectato liase revelada tinha uma estabilidade térmica menor a 55°C comparado com aquela de Bioprep 3000L. No entanto, a enzima é otimamente usada em temperatura ambiente. A pectato liase revelada tem uma estabilidade EDTA que é melhorada com relação a Bioprep 3000L quando testada em temperatura ambiente.

A pectato liase inclui homólogos e pode ser expressa em vários microorganismos e células hospedeiras adequados. De preferência a célula hospedeira expressando SEQ ID NO: 1 ou variantes da mesma tem expressão aumentada adequada para expressão em grande escala do polipeptídeo.

Atividade de pectato liase de variantes pode ser medida aplicando uma solução de teste a furos de 4 mm feitos em placas de ágar (tal como, por exemplo, ágar LB), contendo poligalacturonato de sódio 0,7% p/v (Sigma P 1879). As placas são então incubadas por 6 horas em uma temperatura particular (tal como, por exemplo, 75°C). As placas são então enxaguadas ou em (i) CaCl₂ 1M por 0,5 h ou (ii) alquil trimetilamônio Br

misturado 1% (MTAB, Sigma M-7635) por 1 hora. Ambos os procedimentos causam a precipitação de poligalacturonato dentro do ágar. Atividade de pectato liase pode ser detectada através do aparecimento de zonas claras dentro de um antecedente de poligalacturonato precipitado. Sensibilidade do
5 ensaio é calibrada usando diluições de uma preparação padrão de pectato liase.

3. Composições Compreendendo Pectato Liase

Um aspecto provido aqui é uma composição ou preparação de enzima compreendendo uma pectato liase purificada de *B. subtilis* ou
10 variantes da mesma. A pectato liase pode ser usada sozinha ou em combinação com outros polipeptídeos tendo atividade enzimática. Composições preferidas incluem composições de biolimpeza, alvejamento, retirada de cola e/ou de tingimento. Mais preferidas são composições de uma etapa que realizam biolimpeza, alvejamento, retirada de cola e/ou
15 tingimento e combinações dos mesmos em uma etapa de um têxtil. Composições adicionais incluem composições de limpeza tal como detergentes para a limpeza de têxteis, que compreendem pectato liase.

As pectato liases reveladas podem ser também utilizadas em processos de limpeza enzimática (biolimpeza) na preparação de material
20 celulósico, por exemplo, para resposta apropriada em operações de alvejamento e/ou tingimento subsequentes. As enzimas podem ser também utilizadas para remoção de certas sujeiras ou manchas presentes em lavanderia, especialmente sujeiras e pontos resultantes de, por exemplo, alimento contendo galactano ou arabinogalactano, plantas e similar. As
25 enzimas pectato liase podem ser também usadas em soluções de limpeza e reagentes para limpar superfícies duras ao ter o efeito de remoção ou auxílio na remoção de certas sujeiras ou manchas de superfícies duras.

Então, composições podem incluir enzimas de retirada de cola, *inter alia*, enzimas de biolimpeza (em adição à pectato liase), agentes de
30 alvejamento e agentes de tingimento.

3.1 Enzimas de Retirada de Cola

As composições descritas aqui podem incluir enzimas de

retirada de cola em combinação com uma pectato liase. Agentes de retirada de cola podem ser usados com agentes de alvejamento, enzimas de biolimpeza e enzimas de biopolimento em adição à pectato liase e/ou agentes de tingimento. Qualquer enzima de retirada de cola adequada pode ser usada. De preferência, a enzima de retirada de cola é uma enzima amilolítica. Manases e glicoamilases também encontram uso aqui. Com mais preferência, a enzima de retirada de cola é uma α - ou β -amilase e combinações das mesmas.

3.1.1 Amilases

Alfa e beta amilases podem ser usadas e incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Mutantes quimicamente ou geneticamente modificados de tais amilases são também compreendidos. α -amilases preferidas incluem, por exemplo, α -amilases obteníveis de espécies *Bacillus*. Amilases úteis incluem, mas não estão limitadas a: Optimize 40, Optimize 160, Optimize HT 260, Optimize 520, Optimize HT Plus, Optimize FLEX (todas da Genencor Int. Inc.), Duramyl[®], Termamyl[®], Fungamyl[®] e BAN[®] (todas disponíveis da Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca). Outras enzimas amilolíticas preferidas são CGTases (ciclodextrina glicanotransferases, EC 2.4.1.19), por exemplo, aquelas obtidas de espécies de *Bacillus*, *Thermoanaerobactor* ou *Thermoanaerobacterium*.

A atividade de Optimize 40 e Optimize 160 é expressa em unidade de amilase de referência (RAU) por grama (RAU/g) de produto. Uma RAU é a quantidade de enzima que vai converter 1 grama de amido em açúcares solúveis em uma hora sob condições padrão. A atividade de Optimize HT 260, Optimize HT 520 e Optimize HT Plus é expressa em unidade de amilase termoestável têxtil por grama (TTAU/g). Uma TTAU é a quantidade de enzima que é necessária para hidrolisar 100 mg de amido em açúcares solúveis por hora sob condições padrão. A atividade de Optimize FLEX é determinada em unidades de amilase estearotermofilus têxtil por grama (TSAU/g). Uma TSAU é a quantidade de enzima necessária para converter 1 mg de amido em açúcares solúveis em 1 minuto sob condições padrão. Dosagem da amilase varia dependendo do tipo de processo.

Dosagens menores requereriam mais tempo do que dosagens maiores da mesma enzima. No entanto, não há nenhum limite superior na quantidade de amilase de retirada de cola a não ser o que pode ser ditado pelas características físicas da solução. Enzima em excesso não prejudica o tecido; ela permite um tempo de processamento mais curto. Com base no
 5 acima e a enzima utilizada as dosagens mínimas que seguem para retirada de cola são sugeridas:

Produto de Aminase	Dosagem Mínima (por litro de líquido de retirada de cola)	Faixa Típica (por litro de líquido de retirada de cola)
Optimize 40	1.000 RAU	2.000-70.000 RAU
Optimize 160	1.000 RAU	2.000-70.000 RAU
Optimize HT 260	1.000 TTAU	3.000-100.000 TTAU
Optimize HT 520	1.000 TTAU	3.000-100.000 TTAU
Optimize HT Plus	1.000 TTAU	3.000-100.000 TTAU
Optimize FLEX	5.000 TSAU	13.000-65.000 TSAU

As enzimas de retirada de cola podem também de preferência
 10 ser derivadas das enzimas listadas acima onde um ou mais aminoácidos foram adicionados, deletados ou substituídos, incluindo polipeptídeos híbridos, contanto que os polipeptídeos resultantes exibam atividade de retirada de cola. Tais variantes podem ser criadas usando procedimentos de mutagênese convencionais e identificadas usando, por exemplo, técnicas de
 15 avaliação de alto rendimento tal como o procedimento de avaliação em placa de ágar.

A enzima de retirada de cola é adicionada à solução aquosa (isto é, a composição de tratamento) em uma quantidade eficaz para retirar a cola dos materiais têxteis. Tipicamente, enzimas de retirada de cola, tal
 20 como α -amilases, são incorporadas à composição de tratamento em quantidade de a partir de 0,00001% a 2% de proteína de enzima em peso do tecido, de preferência em uma quantidade de a partir de 0,001% a 1% de proteína de enzima em peso do tecido, com mais preferência em uma

quantidade de a partir de 0,001% a 0,5% de proteína de enzima em peso do tecido e com mais preferência ainda em uma quantidade de a partir de 0,01% a cerca de 0,2% de proteína de enzima em peso do tecido.

3.2 Enzimas de Biolimpeza

5 Um aspecto compreende o uso de pectato liase como o único agente de biolimpeza. Outro aspecto compreende seu uso em combinação com uma ou mais enzimas de biolimpeza. As enzimas de biolimpeza podem compreender uma composição de biolimpeza adequada ou uma composição de uma etapa que faz um ou mais de biolimpeza, alvejamento, retirada de
10 cola e/ou tingimento. Outras enzimas de biolimpeza que podem ser usadas em conjunto com a pectato liase revelada e variantes das mesmas incluem, mas não estão limitadas a, outras pectinases incluindo outras pectato liases e cutinases, proteases, lipases e celulases. As enzimas de biolimpeza podem ser usadas com tampões incluindo, mas não limitado a, tampões de
15 fosfato, silicato, carbonato ou citrato, junto com outros agentes químicos auxiliares, tal como, mas não limitado a, agentes umectantes, tensoativos, emulsificantes e agentes de quelação para aumentar as propriedades umectantes do têxtil.

Dependendo do processo escolhido ser tratado, temperaturas
20 diferentes podem ser usadas. Para processos de *pad batch* frio, o tratamento de limpeza pode ser feito, por exemplo, em cerca de 15°C a cerca de 45° e de preferência de a partir de cerca de 25°C a 35°C; para processos contínuos, semicontínuos e outro em batelada, o processo pode ser feito em cerca de 15°C a cerca de 90°C, de preferência de a partir de
25 cerca de 20°C a 75°C e com mais preferência de a partir de cerca de 25°C a cerca de 60°C. Para aumentar as performances de limpeza, agentes auxiliares incluindo, mas não limitado a, agentes umectantes, tensoativos, emulsificantes, agentes de quelação poderiam ser usados sozinhos ou em combinação com outros agentes.

30 3.2.1 Pectinases

Qualquer composição de enzima pectinolítica com a habilidade em degradar a composição de pectina de, por exemplo, paredes de célula,

pode ser usada. Pectinases adequadas incluem, sem limitação, aquelas de origem fúngica ou bacteriana. Pectinases quimicamente ou geneticamente modificadas são também compreendidas. De preferência, as pectinases são recombinantemente produzidas ou de origem natural. Elas podem ser

5 enzimas monocomponentes.

Pectinases podem ser classificadas de acordo com seu substrato preferencial, pectina altamente metil-esterificada ou pectina pouco metil-esterificada e ácido poligalacturônico (pectato) e seu mecanismo de reação, β -eliminação ou hidrólise. Pectinases podem ser principalmente de

10 endo-ação, cortando o polímero em sítios aleatórios dentro da cadeia para dar uma mistura de oligômeros ou elas podem ser de exo-ação, atacando de uma extremidade do polímero e produzindo monômeros e dímeros. Várias atividades de pectinase agindo sobre as regiões moles de pectina estão incluídas na classificação de enzimas provida pela *Enzyme Nomenclature*

15 (1992), por exemplo, pectato liase (EC 4.2.2.2), pectina liase (EC 4.2.2.10), poligalacturonase (EC 3.2.1.15), exo-poligalacturonase (EC 3.2.1.67), exo-poligalacturonato-liase (EC 4.2.2.9) e exo-poli-alfa-galacturonosidase (EC 3.2.1.81). Em modalidades preferidas, os métodos utilizam pectato liases.

Atividade enzimática de pectato liase conforme aqui usado

20 refere-se à catálise da clivagem aleatória de ligações α -1,4-glicosídicas em ácido pécico (também chamado ácido poligalacturônico) através de transeliminação. Pectato liases são também chamadas poligalacturonato liases e poli(1,4-D-galacturonida)liases.

Para os presentes propósitos, atividade enzimática de pectato

25 liase é a atividade determinada pela medição do aumento em absorbância a 235 nm de uma solução p/v 1% de poligalacturonato de sódio em tampão de glicina 1M em pH 10 (vide Collmer e outros, "Assay methods for pectic enzymes" em 161 METHODS ENZYMOL, 329-335 (1988)). Atividade de enzima é tipicamente expressa como x mol/min, isto é, a quantidade de

30 enzima que catalisa a formação de x mol produto/min. Um ensaio alternativo mede a diminuição na viscosidade de uma solução p/v 5% de poligalacturonato de sódio em tampão de glicina 0,1M em pH 10, conforme

medido através de viscosimetria de vibração (unidades APSU). Ensaio de unidade APSU é uma medição de viscosidade usando o substrato ácido poligalacturônico e pode ser realizado conforme discutido no, por exemplo, WO 2006/002034.

5 Pectato liases adicionais que podem ser usadas com a pectato liase de *B. subtilis* e variantes das mesmas incluem pectato liases que foram clonadas de gêneros de bactérias diferentes tal como *Erwinia*, *Pseudomonas*, outras espécies e linhagens de *Bacillus*, *Klebsiella* e *Xanthomonas*. Pectato liases adequadas para uso aqui são de *Bacillus subtilis* (Nasser e outros, 335 FEBS LETTS. 319-326 (1993)) e *Bacillus sp.* YA-14 (Kim e outros, 58 BIOSCI. BIOTECH. BIOCHEM. 947-949 (1994)).
10 Outras pectato liases compreendidas incluem aquelas produzidas pelo *Bacillus pumilus* (Dave e Vaughn, 108, J. BACTERIOL. 166-174 (1971)), *B. polymyxa* (Nagel e Vaughn, 93, ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 344-352 (1961)), *B. stearothermophilus* (Karbassi e Vaughn, 26, CAN. J. MICROBIOL. 26:377-384 (1980)), *Bacillus sp.* (Hasegawa e Nagel, 31, J. FOOD SCI. 838-845 (1996)) e *Bacillus sp.* RK9 (Kelly e Fogarty, 24, J. MICROBIOL. 1164-1172 (1978)) foram também descritos e são compreendidos para serem usados nas presentes composições e métodos em combinação com pectato
15 liase de *B. subtilis* e suas variantes conforme revelado aqui. Pectato liases adicionais compreendidas para uso em combinação incluem aquelas reveladas no WO 04/090099 (Diversa) e no WO 03/095638 (Novozymes).

Uma quantidade eficaz de enzima pectolítica a ser usada depende de muitos fatores, mas pode incluir uma concentração de uma
25 enzima pectolítica no meio aquoso de a partir de cerca de 0,0001% a cerca de 1% de micrograma de proteína de enzima em peso do tecido, de preferência 0,0005% a 0,2% de proteína de enzima em peso do tecido, com mais preferência 0,001% a cerca de 0,05% de proteína de enzima em peso do tecido.

30 3.2.2 Cutinases

Qualquer cutinase adequada que pode ser usada nas presentes composições e métodos incluem, por exemplo, a cutinase derivada da

linhagem *Humicola insolens* DSM 1800, conforme descrito no Exemplo 2 da Patente U.S. Nº 4.810.414 (incorporada aqui a título de referência) ou, em uma modalidade preferida, a cutinase microbiana de *Pseudomonas mendocina* descrita na Patente U.S. Nº 5.512.203, suas variantes e/ou equivalentes. Variantes adequadas são descritas, por exemplo, no WO 03/76580.

Cutinases bacterianas adequadas podem ser derivadas de uma espécie *Pseudomonas* ou *Acinetobacter*, de preferência de *P. stutzeri*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. aeruginosa* ou *A. calcoaceticus*, com mais preferência da linhagem *P. stutzeri* Thai IV 17-1 (CBS 461.85), PG-1-3 (CBS 137.89), PG-1-4 (CBS 138.89), PG-II-11.1 (CBS 139.89) ou PG-II-11.2 (CBS 140.89), *P. aeruginosa* PAO (ATCC 15692), *P. alcaligenes* DSM 50342, *P. pseudoalcaligenes* IN II-5 (CBS 468.85), *P. pseudoalcaligenes* M-1 (CBS 473.85) ou *A. calcoaceticus* Gr V-39 (CBS 460.85). Com relação ao uso de cutinases derivadas de plantas, sabe-se que cutinases existem no pólen de muitas plantas. Então, cutinases derivadas de planta são compreendidas para uso nos métodos e composições revelados. Cutinases podem ser também derivadas de um fungo, tal como *Absidia* spp.; *Acremonium* spp.; *Agaricus* spp.; *Anaeromyces* spp.; *Aspergillus* spp., incluindo *A. auculeatus*, *A. awamori*, *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. fumaricus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. terreus* e *A. versicolor*; *Aeurobasidium* spp.; *Cephalosporum* spp.; *Chaetomium* spp.; *Coprinus* spp.; *Dactyllum* spp.; *Fusarium* spp., incluindo *F. conglomerans*, *F. decemcellulare*, *F. javanicum*, *F. lini*, *F. oxysporum* e *F. solani*; *Gliocladium* spp.; *Humicola* spp., incluindo *H. insolens* e *H. lanuginosa*; *Mucor* spp.; *Neurospora* spp., incluindo *N. crassa* e *N. sitophila*; *Neocallimastix* spp.; *Orpinomyces* spp.; *Penicillium* spp.; *Phanerochaete* spp.; *Phlebia* spp.; *Piromyces* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Rhizopus* spp.; *Schizophyllum* spp.; *Trametes* spp.; *Trichoderma* spp., incluindo *T. reesei*, *T. reesei* (*longibrachiatum*) e *T. viride*; and *Zygorhynchus* spp. Similarmente, é previsto que uma cutinase pode ser encontrada em bactérias tal como *Bacillus* spp.; *Cellulomonas* spp.; *Clostridium* spp.; *Myceliophthora* spp.;

Pseudomonas spp., incluindo *P. mendocina* e *P. putida*; *Thermomonospora spp.*; *Thermomyces spp.*, incluindo *T. lanuginose*; *Streptomyces spp.*, incluindo *S. olivochromogenes*; e em bactérias ruminais de degradação de fibra tal como *Fibrobacter succinogenes*; e em leveduras incluindo *Candida spp.*, incluindo *C. Antarctica*, *C. rugosa*, *C. torresii*; *C. parapsilosis*; *C. sake*; *C. zeylanoides*; *Pichia minuta*; *Rhodotorula glutinis*; *R. mucilaginosa*; e *Sporobolomyces holsaticus*.

Cutinases são de preferência incorporadas à solução de enzima aquosa em uma quantidade de a partir de 0,00001% a 2% de proteína de enzima em peso do tecido, de preferência em uma quantidade de a partir de 0,0001% a 1% de proteína de enzima em peso do tecido, com mais preferência em uma quantidade de a partir de 0,005% a 0,5% de proteína de enzima em peso do tecido e com mais preferência ainda em uma quantidade de a partir de 0,001% a 0,5% de proteína de enzima em peso do tecido.

15 3.2.3 Celulases

Celulases são também compreendidas para uso nos métodos e composições em combinação com a pectato liase de *B. subtilis* e variações das mesmas descritas aqui para biolimpeza. Celulases são classificadas em uma série de famílias de enzima compreendendo endo- e exo-atividades, bem como capacidade de hidrólise de celobiose. A(s) celulase(s) usada(s) em composições e processos pode(m) ser derivada(s) de microorganismos que são conhecidos ser capazes de produzir enzimas celulolíticas, tal como, por exemplo, espécie de *Humicola*, *Thermomyces*, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Myceliophthora*, *Phanerochaete*, *Irpex*, *Scytalidium*, *Schizophyllum*, *Penicillium*, *Aspergillus* ou *Geotricum*. Espécies conhecidas capazes de produzir enzimas celulolíticas incluem *Humicola insolens*, *Fusarium oxysporum* ou *Trichoderma reesei*. Exemplos não-limitantes de celulases adequadas são revelados nos Patente U.S. Nº 4.435.307; Pedido de Patente Europeu Nº 0 495 257; Pedido de Patente PCT Nº WO 91/17244; e Pedido de Patente Europeu Nº EP-A2-271 004, todos aqui incorporados a título de referência em sua totalidade.

Celulases são também úteis para biopolimento de um têxtil.

Algodão e outras fibras naturais (por exemplo, linho, cânhamo) baseadas em celulose podem ser melhorados por um tratamento enzimático conhecido como "biopolimento". Este tratamento dá ao tecido uma aparência mais macia e mais brilhante. O tratamento é usado para remover "penugem" - os
5 filamentos finos de fibra que protudrem da superfície do fio. Uma bolha de penugem é chamada um "pill" no mercado têxtil. Após biopolimento, a formação de penhugem e "pill" é reduzida. Os outros benefícios de remoção de penugem são toque mais suave e brilho de cor superior.

Em uma modalidade, a celulase pode ser usada em uma
10 concentração na faixa de a partir de 0,0001% a 1% de proteína de enzima em peso do tecido, de preferência 0,0001% a 0,05% de proteína de enzima em peso do tecido, especialmente 0,0001 a cerca de 0,01% de proteína de enzima em peso do tecido.

Determinação de atividade de celulase (ECU) pode ser
15 determinada em unidades de endo-celulase (ECU) através da medição da habilidade da enzima em reduzir a viscosidade de uma solução de carboximetil celulose (CMC). O ensaio de ECU quantifica a quantidade de atividade catalítica presente na amostra através da medição da habilidade da amostra em reduzir a viscosidade de uma solução de carboximetil
20 celulose (CMC). O ensaio é realizado em um viscosímetro de vibração (por exemplo, MIVI 3000 da Sofraser, França) a 40°C; pH 7,5; tampão de fosfato 0,1M; Tempo = 30 min usando um padrão de enzima relativo para redução da viscosidade do substrato CHIC (Hercules 7 LED), concentração de enzima de aproximadamente 0,15 ECU/mL). O padrão de arco é definido
25 para 8200 ECU/g.

Uma ECU é quantidade de enzima que reduz a viscosidade para metade sob essas condições.

3.2.4 Outras Enzimas de Biolimpeza

As composições e métodos usando as composições também
30 compreendem o uso das enzimas de biolimpeza discutidas acima em combinação com a pectato liase de *B. subtilis* e variantes da mesma reveladas aqui para biolimpeza. Outras enzimas podem ser usadas ou

sozinhas ou em combinação uma com a outra ou com aquelas listadas acima. Por exemplo, proteases podem ser usadas como agentes de biolimpeza. Proteases adequadas incluem aquelas de origem animal, vegetal ou microbiana, de preferência de origem microbiana. A protease
5 pode ser uma serina protease ou uma metaloprotease, de preferência uma protease microbiana alcalina ou uma protease tipo tripsina. Exemplos de proteases incluem aminopeptidases, incluindo prolil aminopeptidase (3.4.11.5), X-pro amino peptidase (3.4.11.9), leucil aminopeptidase bacteriana (3.4.11.10), aminopeptidase termofílica (3.4.11.12), lisil
10 aminopeptidase (3.4.11.15), triptofanil aminopeptidase (3.4.11.17) e metionil aminopeptidase (3.4.11.18); serina endopeptidases, incluindo quimiotripsina (3.4.21.1), tripsina (3.4.21.4), cucumisina (3.4.21.25), braquiurina (3.4.21.32), cerevisina (3.4.21.48) e subtilisina (3.4.21.62); cisteína endopeptidases, incluindo papaína (3.4.22.2), ficaína (3.4.22.3), quimiopapaína (3.4.22.6),
15 asclepaína (3.4.22.7), actinidaína (3.4.22.14), caricaína (3.4.22.30) e ananaína (3.4.22.31); endopeptidases aspárticas, incluindo pepsina A (3.4.23.1), Aspergilopepsina I (3.4.23.18), Penicilinopepsina (3.4.23.20) e Saccharopepsina (3.4.23.25); e metaloendopeptidases, incluindo Bacillolisina (3.4.24.28).

20 Exemplos não-limitantes de subtilisinas incluem subtilisina BPN', subtilisina amylosacchariticus, subtilisina 168, subtilisina mesentericopeptidase, subtilisina Carlsberg, subtilisina DY, subtilisina 309, subtilisina 147, termitase, aqualisina, Bacillus PB92 protease, proteinase K, protease TW7 e protease TW3.

25 Proteases comercialmente disponíveis incluem Alcalase[®], Savinase[®], Primase[®], Duralase[®], Esperase[®], Kannase[®] e Durazym[®] (Novo Nordisk A/S), Maxatase[®], Maxacal[®], Maxapem[®], Properase[®], Purafect[®], Purafect OxP[®], FN2[®] e FN3[®] (Genencor International Inc.).

30 Proteases adicionais compreendidas para uso nas composições reveladas incluem variantes, tal como aquelas reveladas em patentes ou pedidos de patente publicados EP 130.756 (Genentech), EP 214.435 (Henkel), WO 87/04461 (Amgen), WO 87/05050 (Genex), EP 251.446

(Genencor), EP 260.105 (Genencor), WO 88/08028 (Genex), WO 88/08033 (Amgen), WO 89/06279 (Novo Nordisk A/S), WO 91/00345 (Novo Nordisk A/S), EP 525 610 (Solvay), WO 94/02618 (Gist-Brocades N.V.), Thomas e outros, 318 NATURE 375-376 (1985), Russel e outros, 328 NATURE 496-500 (1987), Thomas e outros, 193 J. MOL. BIOL. 803-813 (1987) todos aqui incorporados a título de referência em sua totalidade.

A atividade de proteases pode ser determinada conforme descrito em METHODS OF ENZYMATIC ANALYSIS vol. 5 (3ª ed., Verlag Chemie, Weinheim, 1985).

10 Outro aspecto compreende o uso de lipases em combinação com a pectato liase revelada e suas variantes para biolimpeza. Lipases adequadas (também chamadas hidrolases de éster carboxílico) incluem, sem limitação, aquelas de origem bacteriana ou fúngica, incluindo triacilglicerol lipases (3.1.1.3) e Fosfolipase A2 (3.1.1.4). Lipases
15 compreendidas incluem, sem limitação, lipases de *Humicola* (sinônimo *Thermomyces*), tal como de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) conforme descrito em patentes ou pedidos de patente publicados EP 258.068 e EP 305.216 ou de *H. insolens* conforme descrito no WO 96/13580; uma lipase de *Pseudomonas*, tal como de *P. alcaligenes* ou *P. pseudoalcaligenes* (EP
20 218.272), *P. cepacia* (EP 331.376), *P. stutzeri* (GB 1.372.034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. linhagem SD 705 (WO 95/06720 e WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012); uma lipase de *Bacillus*, tal como de *B. subtilis* (Dartois e outros, 1131 BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA 253-360 (1993)); *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) ou *B. pumilus* (WO
25 91/16422), todas as referências aqui incorporadas a título de referência em sua totalidade. Outros exemplos são variantes de lipase tal como aquelas descritas nos WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 e WO 97/07202, todos aqui incorporados a título de
30 referência em sua totalidade. Enzimas lipase comercialmente disponíveis preferidas incluem Lipolase®, Lipolase Ultra®, Lipozyme®, Palatase®, Novozym® 435 e Lecitase® (todas disponíveis da Novo Nordisk A/S). A

atividade da lipase pode ser determinada conforme descrito em METHODS OF ENZYMATIC ANALYSIS vol. 4 (3rd ed. Verlag Chemie, Weinheim, 1984).

Será compreendido que qualquer enzima exibindo atividade de biolimpeza pode ser usada nas composições reveladas. Isto é, enzimas de biolimpeza derivadas de outros organismos ou enzimas de biolimpeza derivadas das enzimas listadas acima onde um ou mais aminoácidos foram adicionados, deletados ou substituídos, incluindo polipeptídeos híbridos, podem ser usadas, contanto que os polipeptídeos resultantes exibam atividade de biolimpeza. Variantes podem ser criadas usando procedimentos de metagênese convencionais e identificadas usando, por exemplo, técnicas de avaliação de alto resultado tal como o procedimento de avaliação de placa de ágar.

3.3 Agentes de Alvejamento Químicos e Sistemas de Alvejamento Enzimáticos

Outro aspecto compreende o uso de agentes de alvejamento em combinação com pectato liase de *B. subtilis* e variantes da mesma para tratar têxteis. Nenhum limite é posto ao(s) agente(s) ou sistemas de alvejamento, contanto que os agentes e sistemas não inativem as enzimas da composição. Agentes de alvejamento exemplares incluem, por exemplo, peróxido de hidrogênio, peróxido de carbamida, peróxido de carbonato de sódio, peróxido de sódio, perborato de sódio, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, permanganato e dicloroisocianurato de sódio. Em uma modalidade preferida, peróxido de hidrogênio é usado como um agente de alvejamento. Em outra modalidade, agentes de biolimpeza enzimáticos são usados sozinhos ou com agentes de alvejamento não-enzimáticos. Exemplos não-limitantes de agentes de bioalvejamento enzimáticos são peroxidases (Colonna e outros, "Recent biological developments in the use of peroxidases" , 17 TIBTECH 163-168 (1999)) e oxidorreduções (por exemplo, glicose oxidases) (Prمود, "Liquid laundry detergents containing stabilized glucose-glucose oxidative system for hydrogen peroxide generation", Patente U.S. Nº 5.288.746). Compostos de alvejamento podem estar presente em uma solução aquosa em uma quantidade de a partir de

cerca de 0,01 a cerca de 10 g/L da solução aquosa ou licor de lavagem, e com mais preferência de a partir de cerca de 0,1 a 5 g/L e com mais preferência de a partir de cerca de 0,5 a cerca de 2,5 g/L.

5 Outro aspecto que compreende o uso de per-hidrolases em combinação com agente(s) de alvejamento químico(s) adicional(ais) tal como percarbonato de sódio, perborato de sódio, aduto de sulfato de sódio/peróxido de hidrogênio e aduto de cloreto de sódio/peróxido de hidrogênio e/ou um corante de alvejamento fotossensível, tal como sal de zinco ou alumínio de ftalocianina sulfonada, melhora mais os efeitos de
10 alvejamento. Em modalidades adicionais, as per-hidrolases podem ser adicionadas em combinação adicional com reforçadores de alvejamento (por exemplo, TAED, NOBS). Reforçadores de alvejamento podem ser também utilizados na ausência de per-hidrolases, mas em combinação com as pectato liases e agentes de alvejamento revelados.

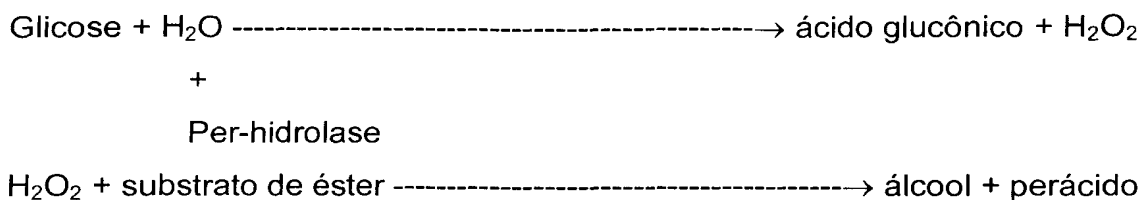
15 3.3.1 Sistemas de Alvejamento Enzimáticos

Componentes-chave de produção de perácido através de per-hidrólise enzimática são enzima, substrato de éster e peróxido de hidrogênio.

3.3.1.1 Peróxido de Hidrogênio

20 Peróxido de hidrogênio pode ser ou adicionado diretamente em batelada ou gerado continuamente *in situ*. As enzimas acil transferases descritas no, por exemplo, PCT/US2004/040438, intitulado "Perhydrolase", depositado em 3 de dezembro de 2004, incorporado aqui a título de referência, também encontram uso com qualquer outra fonte adequada de
25 H₂O₂, incluindo aquela gerada através de meios químicos, eletroquímicos e/ou enzimáticos. Exemplos de fontes químicas são os percarbonatos e perboratos, enquanto um exemplo de uma fonte eletroquímica é uma célula de combustível alimentada com gás oxigênio e hidrogênio, e um exemplo enzimático inclui produção de H₂O₂ a partir da reação de glicose com glicose
30 oxidase. A equação que segue provê um exemplo de um sistema acoplado que pode ser utilizado:

Glicose oxidase



5

Outras enzimas que geram H_2O_2 com um substrato adequado podem ser usadas em combinação com as composições e métodos descritos aqui. Por exemplo, lactato oxidases de espécie *Lactobacillus* que são conhecidas criar H_2O_2 a partir de ácido láctico e oxigênio. Na verdade, uma vantagem dos métodos é que a geração de ácido (por exemplo, ácido glucônico no exemplo acima) reduz o pH de uma solução básica para a faixa de pH onde o perácido é mais eficaz em alvejamento (isto é, no ou abaixo do pKa).

Outras enzimas (por exemplo, álcool oxidase, etileno glicol oxidase, glicerol oxidase, aminoácido oxidase, etc) que podem gerar peróxido de hidrogênio também encontram uso com substratos de éster em combinação com enzimas per-hidrolase para gerar perácidos. Em algumas modalidades preferidas, os substratos de éster são selecionados de um ou mais dos ácidos que seguem: ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido nonanoico, ácido decanóico, ácido dodecanoico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico e ácido oleico. Então, conforme aqui descrito, as composições e processos descritos proveem vantagens definitivas sobre os métodos e composições atualmente usados para alvejamento têxtil.

25 3.3.2 Ativadores de Alvejamento

Qualquer ativador de alvejamento adequado pode ser empregado na presente invenção. Os ativadores de alvejamento preferidos para uso de acordo com a invenção incluem, por exemplo, compostos das classes de substâncias que seguem: açúcares poliacilados ou derivados de açúcar com radicais $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -acila, de preferência radicais acetila, propionila, octanoíla, nonanoíla ou benzoíla, particularmente de preferência radicais acetila, podem ser usados como ativadores de alvejamento. Açúcares ou

30

derivados de açúcar que podem ser usados são mono- ou dissacarídeos e seus derivados reduzidos ou oxidados, de preferência glicose, manose, frutose, sacarose, xilose ou lactose. Ativadores de alveamento particularmente adequados desta classe de substâncias são, por exemplo, 5 pentaacetilglicose, tetraacetato de xilose, 1-benzoil-2,3,4,6-tetra-acetilglicose e 1-octanoil-2,3,4,6-tetra-acetilglicose.

Outra classe de substâncias que são preferidas para uso como ativadores de alveamento inclui, por exemplo, ácidos aciloxibenzenossulfônicos e seus sais de metal alcalino e metal alcalino-10 terroso, tal como radicais C_{1-14} -acila. Radicais acetila, propionila, octanoíla, nonanoíla e benzoíla são preferidos, especialmente radicais acetila e radicais nonanoíla. Ativadores de alveamento particularmente adequados nesta classe de substâncias são ácido acetoxilobenzenossulfônico e ácido benziloxibenzenossulfônico. Eles são de preferência empregados na forma 15 de seus sais de sódio.

Outros ativadores de alveamento para uso na presente invenção incluem MMA e OCL, sozinhos ou em combinação um com o outro ou com TAED; O-aciloxima de ésteres, tal como O-acetiloxima de acetona, O-benzoiloxima de acetona, bis(propilimino)carbonato, 20 bis(cicloexilimino)carbonato como um ativador de alveamento. Oximas aciladas que podem ser usadas como um ativador de alveamento de acordo com a invenção são descritas, por exemplo, na EP-A-0 028 432. Ésteres de oxima que podem ser usados como um ativador de alveamento de acordo com a invenção são descritos, por exemplo, na EP-A-0 267 046.

25 Ativadores de alvejante preferidos adicionais incluem N-acilcaprolactama, tal como N-acetilcaprolactama, N-benzoilcaprolactama, N-octanoilcaprolactama e carbonilbiscaprolactama; aminas N,N-diaciladas e N,N,N',N'-tetraaciladas, tal como N,N,N',N'-tetraacetilmetilenodiamina e -etilenodiamina (TAED), N,N-diacetil-anilina, N,N-diacetil-p-toluidina ou 30 hidantoínas 1,3-diaciladas tal como 1,3-diacetil-5,5-dimetilidantoína; N-alquil-N-sulfonilcarboxamidas, tal como N-metil-N-mesilacetamida ou N-metil-N-mesilbenzamida; hidrazidas cíclicas N-aciladas, triazóis ou urazóis acilados,

tal como hidrazida maleica monoacetilada; hidroxilaminas O,N,N-trissubstituídas, tal como O-benzoil-N,N-succinil-hidroxilamina, O-acetil-N,N-succinilhidroxilamina ou O,N,N-triacetilhidroxilamina; N,N'-diacilsulfamidas, tal como N,N'-dimetil-N,N'-diacetilsulfamida ou N,N'-dietil-N,N'-dipropionilsulfamida; triacetilcianuratos, tal como triacetilcianuratos ou tribenzoilcianurato; anidridos carboxílicos, tal como anidrido benzoico, anidrido m-clorobenzoico ou anidrido ftálico; 1,3-diacil-4,5-diaciloxiimidazolinas, tal como 1,3-diacetil-4,5-diacetoxiimidazolina; tetraacetilglicolurila e tetrapropionilglicolurila; 2,5-dicetopiperazinas diaciladas, tal como 1,4-diacetil-2,5-dicetopiperazina; produtos de acilação de propilenodiuréia e 2,2-dimetilpropilenouréia, tal como tetraacetilpropilenodiuréia; α -aciloxipoliacilmalonamidas, tal como α -acetóxi-N,N'-diacetilmalonamida; diacildioxoexaidro-1,3,5-triazinas, tal como 1,5-diacetil-2,4-dioxoexaidro-1,3,5-triazina; 2-alkil- ou 2-aryl-(4H)-3,1-benzoxazin-4-onas conforme descrito, por exemplo, nas EP-B1-0 332 294 e EP-B 0 502 013 e 2-fenil-(4H)-3,1-benzoxazin-4-ona e 2-metil-(4H)-3,1-benzoxazin-4-ona, nitritos catiônicos, conforme descrito, por exemplo, nas EP 303 520 e EP 458 396 A1, tal como metossulfatos ou tosilatos de trimetilamonioacetoneitrila, N,N-dimetil-N-octilamonioacetoneitrila, 2-(trimetilamonio)propionitrila, 2-(trimetilamonio)-2-metilpropionitrila. Também adequados são os metossulfatos de N-metilpiperazino-N,N'-diacetoneitrila e N-metilmorfolinoacetoneitrila (MMA).

Ativadores de alveamento adicionais para uso na presente invenção incluem ácidos percarbâmicos ou diacil percarbamatos e precursores dos mesmos.

Ativadores de alveamento são tipicamente adicionados em uma quantidade de a partir de cerca de 0,1 a 30 g/l, com mais preferência 0,5 a 10 g/l.

3.3.2 Estabilizadores de Alveamento

Em outra modalidade preferida da presente invenção, o sistema de alveamento contém adicionalmente um ou mais estabilizadores de alveamento. Os estabilizadores de alveamento compreendem aditivos

capazes de adsorver, ligar ou complexar traços de metais pesados. Exemplos de aditivos que podem ser usados de acordo com a invenção com uma ação de estabilização de alvejamento incluem, mas não estão limitados a, compostos polianiônicos, tal como polifosfatos, policarboxilatos, poliidroxicarboxilatos, silicatos solúveis como sais de metal alcalino ou metal alcalino-terroso completamente ou parcialmente neutralizados, em particular como sais de Na ou Mg neutros, que são estabilizadores de alvejamento relativamente fracos. Exemplos de estabilizadores de alvejamento fortes que podem ser usados de acordo com a invenção são agentes de complexação tal como etilenodiaminotetraacetato (EDTA), ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido metil-glicinodiacético (MGDA), ácido β -alaninodiacético (ADA), etilenodiamino-N,N'-dissuccinato (EDDS) e fosfonatos tal como etilenodiaminotetrametilenofosfonato, dietilenotriaminopentametileno-fosfonato (DTMPA) ou ácido hidroxietilideno-1,1-difosfônico na forma dos ácidos ou como sais de metal alcalino parcialmente ou completamente neutralizado.

O estabilizador de alvejamento é tipicamente adicionado à composição de tratamento em uma quantidade de a partir de cerca de 0,1 a cerca de 5 g/ litro da composição, com mais preferência de a partir de cerca de 0,5 a cerca de 2 g/L e com mais preferência cerca de 1 g/L.

A composição de alvejamento de acordo com a invenção contém de preferência pelo menos um estabilizador de alvejamento, e, com mais preferência, pelo menos um dos estabilizadores de alvejamento fortes mencionados acima. Alvejamento eficaz tipicamente resulta em uma ou mais das propriedades que seguem: (i) uma brancura desejada (conforme determinado através da medição de brancura Ganz usando, por exemplo, *Macbeth color eye*); (ii) uma uniformidade satisfatória de remoção de grãos (avaliada através de exame visual); de preferência, a brancura do tecido é 50 unidades Ganz ou mais e com mais preferência 60 unidades Ganz ou mais.

Deste modo, em uma modalidade preferida, o processo de

batelada única compreende um sistema de enzima, tal como pectato liase, peróxido de hidrogênio, um ativador de alveamento (tal como TAED) e um estabilizador de alveamento.

5 Deste modo, em uma modalidade preferida, o processo de
batelada única compreende um sistema de enzima, tal como pectato liase,
peróxido de hidrogênio, um ativador de alveamento (tal como TAED) e um
estabilizador de alveamento.

3.4 Sistemas de Tingimento

10 As composições de pectato liase podem ser usadas com vários
sistemas de tingimento que são compatíveis com (i) as condições usadas
para biolimpeza, se biolimpeza e tingimento forem realizados
simultaneamente ou (ii) as condições são ajustadas subsequentes à
biolimpeza, se tingimento for realizado após biolimpeza. Tais sistemas de
tingimento incluem, sem limitação:

- 15 (a) sistemas de tingimento convencionais compreendendo um ou mais de
- (i) corantes diretos tal como C.I. Direct Red 81; Yellow 11 e 28; Orange 39; Red 76; Blue 78, 86, 106, 107 e 108; Black 22;
 - (ii) corantes reativos tal como, por exemplo, C.I. Reactive Red 1, 3, 6, 17, 120, 194; Blue 4, 19, 171 e 182; Black 5; Violet 5;
 - 20 (iii) corantes vat tal como, por exemplo, C.I. Vat Yellow 28; Orange 11 e 15; Blue 6, 16 e 20; Green 1 e 3; Brown 1; Blank 9 e 27;
 - (iv) corantes de enxofre tal como, por exemplo, C.I. Sulfur Black 1 e 11; Brown 1; Red 10; e
 - (v) corantes azóicos tal como, por exemplo, C.I. Coupling Components 5 e
 - 25 13 em combinação com C.I. Azoic Diazo Components 44 e 45. Tais sistemas
de tingimento convencionais são conhecidos na técnica e são descritos, por
exemplo, em Shore, Ed., CELLULOSIC DYEING (Society of Dyers and
Colorists, Alden PRes, 1995) e em COLOUR INDEX Vol. 1-8 Supplements
(Society of Dyers and Colorists and American Association of Textile
30 Chemists and Colorists, 1977-1988).

3.5 Componentes Auxiliares

As composições podem também incluir vários componentes

auxiliares, também referidos aqui como agentes químicos auxiliares. Tais componentes incluem, mas não estão limitados a, agentes sequestrantes ou de quelação, agentes umectantes, agentes emulsificantes, agentes de controle do pH (por exemplo, tampões), catalisadores de alvejamento, 5 agentes de estabilização, agentes de dispersão, agentes antiespumantes, detergentes e misturas dos mesmos. É compreendido que tais componentes auxiliares estão em adição às enzimas, agentes de alvejamento e agentes de retirada de cola.

3.5.1 Agentes Umectantes

10 Agentes umectantes são tipicamente selecionados de tensoativos e em particular tensoativos não-iônicos. Quando empregados agentes umectantes são tipicamente incluídos em níveis de a partir de cerca de 0,1 a cerca de 20 g/L, com mais preferência de a partir de cerca de 0,5 a cerca de 10 g/L e com mais preferência 0,5 a cerca de 5 g/L do banho. 15 Agentes de estabilização são empregados por uma variedade de razões incluindo capacidade de tamponamento, sequestro, dispersão e em adição melhora da performance dos tensoativos. Agentes de estabilização podem diminuir a taxa de decomposição de peróxido e combinar com ou neutralizar impurezas de metal que podem catalisar decomposição de peróxido e 20 induzir dano de fibra. Agentes de estabilização são bem conhecidos com ambas espécies inorgânicas e orgânicas sendo bem conhecidas e silicatos e organossilicatos ganhando a aceitação mais ampla e quando presentes são empregados em níveis de a partir de cerca de 0,01 a cerca de 30 g/L, com mais preferência de a partir de cerca de 0,01 a cerca de 10 g/l e com mais 25 preferência de a partir de cerca de 0,01 a cerca de 5 g/L do banho.

3.5.2 Tensoativos

Tensoativos adequados para uso incluem, sem limitação, não-iônicos (vide, por exemplo, Patente U.S. Nº 4.565.647, que é aqui incorporada a título de referência); tensoativos aniônicos; catiônicos; e 30 zwitteriônicos (vide, por exemplo, Patente U.S. Nº 3.929.678, que é aqui incorporado a título de referência); que estão tipicamente presentes em uma concentração entre cerca de 0,2% a cerca de 15% em peso, de preferência

de a partir de cerca de 1% a cerca de 10% em peso. Tensoativos aniônicos incluem, sem limitação, alquilbenzenossulfonato linear, α -olefinsulfonato, alquil sulfato (sulfato de álcool graxo), etoxissulfato de álcool, alcanossulfonato secundário, metil éster do ácido alfa-sulfo graxo, ácido 5 alquil- ou alquenilsuccínico e sabão. Tensoativos não-iônicos incluem, sem limitação, álcool etoxilato, nonilfenol etoxilato, alquilpoliglicosídeo, alquildimetilaminoóxido, monoetanolamida do ácido graxo etoxilado, monoetanolamida do ácido graxo, amida do ácido poliidroxi alquil graxo e derivados N-acil N-alquila de glicosamina ("glucamidas"). Um tensoativo 10 preferido para uso em modalidades é um tensoativo não-iônico ou uma mistura de não-iônico e aniônico.

3.5.3 Agentes de Quelação

Agentes de quelação podem ser também empregados e podem ser selecionados do grupo consistindo em amino carboxilatos, amino 15 fosfonatos, agentes de quelação aromáticos polifuncionalmente substituídos e misturas, todos como anteriormente definido.

Amino carboxilatos úteis como agentes de quelação ótimos incluem etilenodiaminotetraacetatos, N-hidroxietilenodiaminotriacetatos, nitrilotriacetatos, etilenodiamino tetrapropionatos, trietilenotetraaminoexa- 20 cetatos, fosfonatos para não contêm grupos alquila ou alquenila com mais do que cerca de 6 átomos de carbono.

Agentes de quelação aromáticos polifuncionalmente substituídos são também úteis nas presentes composições. Vide, por exemplo, Patente 25 U.S. Nº 3.812.044. Compostos preferidos deste tipo em forma ácida são diidroxidissulfobenzenos, tal como 1,2-diidroxi-3,5-dissulfobenzenodietileno-tiraminopentaacetatos e sais de etanoldiglicinas, metal alcalino, amônio e amônio substituídos e misturas.

Amino fosfonatos são também adequados para uso como 30 agentes de quelação nas composições reveladas quando pelo menos níveis baixos de fósforo total são permitidos.

Um quelante biodegradável preferido para uso aqui é dissuccinato de etilenodiamina ("EDDS"), especialmente o isômero [S,S]

conforme descrito na Patente U.S. Nº 4.704.233 expedida para Hartman e Perkins. Outros quelantes compreendidos incluem EDTA e EGTA.

Quando presentes, agentes de quelação são empregados em níveis de a partir de cerca de 0,01 a cerca de 10 g/L, com mais preferência de a partir de cerca de 0,1 a cerca de 5 g/L e com mais preferência de a partir de cerca de 0,2 a cerca de 2 g/L.

4. Processos para Biolimpeza Sozinha ou em Combinação com Alvejamento, Retirada de Cola e/ou Tingimento

A maneira na qual a solução aquosa contendo a(s) enzima(s) e sistema de alvejamento é contatada com o material têxtil dependerá de se o regime de tratamento é contínuo, semicontínuo, batelada de enchimento descontínuo, batelada (ou fluxo contínuo). Por exemplo, para processamento contínuo ou *padbatch* descontínuo, a solução de enzima aquosa está de preferência contida em um banho saturador e é aplicada continuamente ao material têxtil conforme ele viaja através do banho, processo durante o qual o material têxtil tipicamente absorve o líquido de processamento em uma quantidade de, por exemplo, 0,5-1,5 vez seu peso. Em operações de batelada, o tecido é exposto à solução de enzima por um período variando de a partir de cerca de 2 minutos a 24 horas em uma razão de líquido-para-tecido de 5:1-50:1. Esses são parâmetros gerais. Em algumas modalidades, o tempo pode ser diminuído através do uso de soluções mais concentradas das enzimas e outros compostos. Um versado na técnica é capaz de determinar os parâmetros melhor adequados para suas necessidades individuais.

Os métodos revelados aqui podem ser realizado em temperaturas menores do que as técnicas de limpeza, retirada de cola e alvejamento tradicionais. Em uma modalidade, os métodos são realizados em temperaturas abaixo de 95°C, de preferência entre cerca de 20°C e 75°C. Em uma modalidade mais preferida, os métodos são realizados entre cerca de 25°C e 60°C.

Os métodos podem ser realizados em uma faixa de pH mais próxima do neutro do que técnicas de retirada de cola, limpeza e

alvejamento tradicionais. Embora os presentes métodos encontrem uso em um pH entre cerca de 5 e 11, um pH menor do que 9 é preferido. Em uma modalidade, o pH no qual os métodos são realizado se encontra entre cerca de 6 e 9, e de preferência entre 6 e 8.

5 Uma pessoa de habilidade comum na técnica vai reconhecerá que as condições de processo a serem usadas podem ser selecionadas de modo a se adaptarem a um equipamento particular ou um tipo particular de processo que é desejável usar. Por exemplo, embora o têxtil com necessidade de tratamento de preferência permaneça em contato com a
10 solução de tratamento em uma temperatura de a partir de cerca de 15°C a cerca de 95°C, de preferência de a partir de cerca de 15°C a cerca de 65°C, com mais preferência cerca de 20°C a cerca de 45°C e por um período de tempo adequado para tratamento do têxtil que é pelo menos cerca de 2 minutos a 24 horas, com mais preferência de a partir de cerca de 30 minutos
15 a cerca de 12 horas, de preferência de a partir de cerca de 30 minutos a cerca de 6 horas e com mais preferência de a partir de cerca de 30 a cerca de 90 minutos. Com certeza, uma pessoa de habilidade comum na técnica vai reconhecer que as condições de reação tal como tempo e temperatura vão variar dependendo do equipamento e/ou processo empregado e dos
20 tecidos tratados.

 Exemplos preferidos de tipos de processo a serem usados incluem, mas não estão limitados a, tipos Jet, Jigger/Winch, Pad-Roll e Pad-Steam. Os processos combinados podem ser realizados como um processo em batelada, semicontínuo ou contínuo usando vapor ou os princípios de
25 alvejamento a frio. Como um exemplo, o processo pode compreender as etapas que seguem: a) impregnação do tecido em um banho de limpeza e alvejamento conforme aqui descrito seguindo espremer o líquido em excesso de modo a manter a quantidade de líquido necessária para a reação ser realizada (normalmente entre 60% e 120% do peso do tecido
30 seco); (b) submissão do tecido impregnado a vapor de modo a trazer o tecido para a temperatura de reação desejada, geralmente entre cerca de 20°C e cerca de 80°C; e (c) manutenção ao dobrar ou pregar o tecido em

uma J-Box, U-Box, máquina de tapete ou similar por um período de tempo suficiente para permitir que limpeza e alvejamento aconteçam.

Conforme mencionado em outro local, retirada de cola pode ser um resultado desejado. Deste modo, para certos tipos de tecido pode ser vantajoso e/ou necessário submeter o tecido a um tratamento de retirada de cola a fim de se obter um produto final de uma qualidade desejada. Em tais casos, as combinações de processos podem ser utilizadas em têxteis tal como um processo de retirada de cola, alvejamento e limpeza combinado ou processo de retirada de cola e alvejamento combinado ou um processo de retirada de cola e limpeza combinado.

Os métodos envolvem provisão de um componente têxtil não-acabado na solução de tratamento conforme descrito. O componente têxtil pode compreender fibras, fios, tecidos incluindo tecidos, tricotados, roupas e não-tecidos. Por não-acabado quer dizer que o componente têxtil é um material que não teve a cola retirada, limpo, alvejado, tingido, impresso ou de outro modo provida uma etapa de acabamento tal como uma prensa durável. Com certeza, uma pessoa de habilidade comum na técnica vai reconhecer que os têxteis não foram passados por uma roupa ou outro processo de fabricação envolvendo corte e costura do material.

Os presentes processos podem ser empregados com qualquer material têxtil incluindo celulósicos tal como algodão, linho, rami, cânhamo, *raiom*, *lyocell*, acetato de celulose e triacetato de celulose e material sintético incluindo, mas não limitado a, poliéster, náilon, *spandex*, lycra, acrílicos e várias outras misturas de materiais naturais e sintéticos. Material natural inclui fibras de proteína tal como lã, seda, cashmere, bem como celulósicos conforme aqui descrito.

O presente processo pode ser empregado para alvejamento sem dano à fibra ou tecido notável a vários tipos de têxteis sintéticos e suas misturas, incluindo, mas não limitado a, poliéster, *raiom*, acetato, náilon, algodão/poliéster, algodão/lycra, etc., que podem ser suscetíveis à hidrólise e degradação alcalina.

Os métodos podem incluir ainda etapas de marcação a fogo e

mercerização após a etapa de tratamento. Embora retirada de cola possa ser empregada em uma etapa separada, em modalidades preferidas a etapa de retirada de cola está incluída no tratamento de uma etapa através da inclusão de uma(s) enzima(s) de retirada de cola no banho de tratamento
5 deste modo combinando, alvejando, retirando a cola e limpando em uma etapa única.

Com certeza os processos incluem na aplicação preferida uma etapa de lavagem ou séries de etapas de lavagens seguindo os métodos de tratamento de uma etapa providos aqui. Lavagem de têxteis tratados é bem
10 conhecida e dentro do nível de habilidade do versado. Estágios de lavagem estarão tipicamente presentes após cada uma das etapas de retirada de cola, limpeza e alvejamento quando presentes bem como após a etapa de tratamento. Lavagem deve também acontecer após uma etapa de tingimento. Ainda, as etapas de tratamento, sem importar sua ordem e/ou
15 combinações, podem em modalidades preferidas incluir uma etapa de umedecimento ou pré-umedecimento para assegurar umedecimento igual ou uniforme no têxtil.

Capacidade umectante dos têxteis é importante para qualquer tingimento e/ou acabamento de têxtil. Capacidade umectante leva à
20 penetração superior do têxtil pelo corante ou agentes de acabamento e um resultado de tingimento e/ou acabamento superior. Deste modo, a capacidade umectante do têxtil é uma indicação de quão eficaz o processo de tratamento foi. Capacidade umectante maior significa um processo de tratamento mais eficaz e superior, isto é, um período de tempo mais curto
25 para umedecimento. Alvejamento com peróxido de hidrogênio têxtil convencional proveu perfis de umedecimento aceitáveis apenas em temperatura em excesso de 95°C, enquanto alvejamento em temperatura menor (70°C) resulta em perfis de umedecimento de mais do que cerca de 40%. Um teste para absorvância é o Método do Teste AATCC 79-1995, que pode ser usado
30 para checar rapidamente o umedecimento após o tratamento.

Dano à fibra baseado em fluidez é medido através do método de teste AATCC 82-1996 envolvendo a dispersão das fibras em cuprietileno

diamina (CP). Uma amostra representativa de fibras de cerca de 1,5 mm é cortada e dissolvida em CP conforme definido pela equação $CP=120 X$ (peso da amostra) $\times 0,98$ em uma garrafa de espécime com várias bolas de vidro, posta sob nitrogênio e dissolvida por agitação por aproximadamente 2 horas. Mais CP é adicionada conforme definido pela equação $CP=80X$ (peso da amostra) $\times (0,98)$ e agitação adicional sob nitrogênio por três horas. A solução é posta sob agitação constante para prevenir separação da dispersão. A solução pode então ser medida em um viscosímetro Oswald Canon Fenske calibrado em um banho de temperatura constante de 25°C para determinar o tempo de efluxo. Fluidez é calculada a partir da fórmula $F=100/ctd$, onde c =constante do viscosímetro, t =tempo de efluxo e d =densidade da solução 1,052.

4.1 Aplicações Industriais

Os métodos e composições revelados têm muitas aplicações práticas na indústria, como é aqui compreendido, e esta descrição pretende ser exemplar e não-inclusiva.

Em uma modalidade, as presentes composições, compostos e métodos podem ser usados no processamento de fibras, fios, tecidos, roupas e não-tecidos. Aplicações principais incluem: o processamento enzimático de uma etapa de têxteis envolvendo a limpeza e alvejamento de têxteis. A retirada de cola dos têxteis pode também ser realizada simultaneamente com a limpeza, alvejamento e a limpeza, alvejamento e/ou biopolimento.

A dosagem dada (isto é, níveis) dos componentes de enzima na composição depende da atividade específica, das condições de processo e do resultado desejado. Os níveis de dosagem podem ser determinados por um versado na técnica.

As composições e métodos descritos aqui proveem tratamentos de têxtil eficazes com perda de resistência reduzida comparado com tratamentos baseados em agentes químicos tradicionais, por exemplo, limpeza alcalina, alvejamento, etc. Sem ser limitado pela teoria, acredita-se que as composições e métodos danifiquem as fibras menos e então

reduzindo a perda de resistência quando comparado com tratamentos químicos convencionais. Perda de resistência pode ser medida através de técnicas bem conhecidas no campo tal como ASTM D 5034 (teste *Grab*), ASTM D 5035 (teste *Strip*), ASTM D 3787 (teste *Ball burst*) e/ou ASTM D 3786 (Resistência a arrebentamento hidráulico de produtos tricotados e tecidos não-tecidos).

Os agentes de limpeza podem ser usados sozinhos ou em combinação com outros agentes de limpeza, agentes de retirada de cola, agentes de alvejamento e agentes de tingimento e em combinações. Para assegurar bom contato entre as enzimas e o têxtil, umedecedores devem ser utilizados. Umedecedores podem ser aplicados antes ou ao mesmo tempo que as enzimas.

Quelantes suaves e fortes podem ser usados, uma vez que a enzima de biolimpeza revelada não é dependente de cálcio. Então, quelantes suaves tal como, mas não limitado a, polifosfonatos, ácido glucônico e ácido cítrico podem ser usados bem como quelantes fortes tal como EDTA. Uso de quelantes pode variar dependendo das necessidades de outras enzimas presentes na composição. No entanto, remoção de cálcio auxilia na remoção de cera e para evitar dano ao alvejamento.

20 4.2 Métodos para Retirada de Cola e Limpeza de Banho Único

Um aspecto provê retirada de cola e limpeza em uma etapa ou banho único que acontece nas mesmas condições que ou retirada de cola ou limpeza. Têxteis são tratados com uma combinação de água, enzimas de retirada de cola e uma enzima de biolimpeza, de preferência em combinação com um ou mais agentes tal como, mas não limitado a, estabilizadores, tensoativos, agentes umectantes, agentes de dispersão, agentes sequestrantes e agentes emulsificantes, bem como misturas dos mesmos. O tecido com a cola retirada é deixado ficar no líquido de processamento por um período de manutenção suficientemente longo para realizar a retirada de cola e limpeza. O período de manutenção é dependente do tipo de regime de processamento e das temperaturas usadas e pode variar de a partir de cerca de 15 minutos a cerca de 2 horas bem como até 24 horas.

Processamento pode ser em batelada, semicontínuo ou contínuo, com o têxtil sendo contatado pela corrente de processamento de líquido em largura aberta ou forma de cordão. Operações contínuas geralmente usam um saturador com o que um peso igual aproximado de líquido de processamento por peso de tecido é aplicado ao tecido, seguido por uma câmara de permanência aquecida onde a reação química acontece. Uma seção de lavagem então prepara o tecido para a próxima etapa de processamento. A fim de assegurar muita brancura e boa capacidade umectante, e então tingimento, as enzimas de retirada de cola e limpeza e outros agentes devem ser removidos completamente do tecido. Um processo contínuo pode ser realizado em cerca de 15°C a cerca de 95°C, por cerca de 5 minutos a cerca de 1 hora, em um pH de cerca de 5 a cerca de 11.

Processos em batelada geralmente acontecem em um banho de processamento (isto é, banho único), com o que o têxtil é contatado com aproximadamente 8-15 vezes seu peso de líquido de processamento. Após o período de reação, o líquido de processamento é drenado, o têxtil é enxaguado e a etapa seguinte realizada.

Para processos *padbatch* descontínuos, um saturador é usado com o que um peso igual aproximado de líquido de processamento por peso de tecido é aplicado ao tecido, seguido por um período de residência, que no caso de processo *padbatch* a frio poderia ser um ou mais dias. Por exemplo, um processo *padbatch* a frio pode ser realizado entre cerca de 20-40°C por 8-24 horas ou mais em pH na faixa em torno de 5 e 11. Um processo *padbatch* pode ser realizado em cerca de 25-85°C por cerca de 1-6 horas e em um pH similar.

Para enzimas de retirada de cola, tal como uma alfa-amilase alcalina (por exemplo, AQUAZYM® 120L, Novozymes ou Purastar® OxAm, Genecor) está presente em uma faixa de cerca de 180 a 240 KNU/L ou cerca de 180 a 240 KNU por kg de têxtil. Outras faixas de enzimas de retirada de cola incluindo, mas não estão limitadas a, 1-100 KNU/kg de têxtil ou 2-20 KNU/kg de têxtil. KNU é a atividade de alfa-amilase e pode ser

calculada conforme discutido no WO 2006/002034.

5 Geralmente, um tensoativo é adicionado ao processo para aumentar a solubilização de compostos hidrofóbicos e/ou prevenir sua deposição de volta no têxtil. Então, neste contexto, um detergente é sinônimo de um tensoativo. Detergentes podem ser tensoativos não-iônicos, um tensoativo aniônico, um tensoativo catiônico, um tensoativo anfótero, um tensoativo zwitteriônico e um tensoativo semipolar ou mistura dos mesmos. Tensoativos para limpeza e retirada de cola combinadas estão geralmente presentes em uma quantidade de a partir de cerca de 0,1% a cerca de 60% em peso. Tensoativos escolhidos devem ser compatíveis com os componentes de enzima presentes na composição. Em composições líquidas e em gel, tensoativos são formulados de um modo que pelo menos não degrade a estabilidade das enzimas presentes. Tensoativos podem ser formulados conforme ensinado na técnica. vide, por exemplo, Pedido PCT
10 Internacional WO 2006/002034.
15

4.3 Métodos para Alveijamento, Limpeza e/ou Retirada de Cola Combinados

Em um aspecto, limpeza e alveijamento combinados usando a liase revelada são compreendidos. Então, limpeza e alveijamento com a enzima na presença de um sistema de alveijamento enzimático e um peróxido são compreendidos com uma faixa de pH ótimo de cerca de 6 a cerca de 8 para remoção de pectina. Um sistema de alveijamento enzimático preferido é aquele de acil transferase.
20

Para processos *padbatch* a frio, a temperatura está de preferência entre cerca de 15°C e 45°C e com mais preferência entre cerca de 25°C a cerca de 35°C. Temperaturas maiores podem ser usadas para processos *padbatch* não-frio de até 95°C. A solução aquosa ou líquido de lavagem tipicamente tem um pH entre cerca de 5 e cerca de 11. De preferência, o pH da composição de tratamento está entre cerca de 5 e cerca de 9, e com mais preferência entre cerca de 6 a cerca de 8.
25

30 Em uma modalidade, o método de batelada única para tratamento de têxteis é realizado sem a adição de álcali. De preferência, este tratamento é usado para tratamento de têxteis sensíveis a alcalino, tal como,

mas não limitado a, seda, lã, náilon, poliéster, lycra, acetato de celulose e misturas. Em outra modalidade, o método de batelada única para tratamento de têxteis é realizado em um pH abaixo de 9, com mais preferência abaixo de 8 e com mais preferência ainda abaixo de 7.

5 Em outra modalidade, o método de batelada única para tratamento de têxteis é realizado com a adição de alcalino. De preferência, o contato é realizado em uma faixa de pH de cerca de 8 a cerca de 11. O pH pode ser controlado, por exemplo, com a adição de um agente alcalino tal como NaOH. Agentes alcalinos podem ser adicionados em quantidades de a
10 partir de cerca de 0,1 a cerca de 10% em peso de tecido, conforme necessário para obter o pH desejado. No entanto, como um versado na técnica compreenderia, a quantidade de agente alcalino adicionada depende da quantidade de composto de alvejamento usada.

 Será compreendido que dosagem e concentração ótimas das
15 enzimas, compostos de alvejamento, estabilizadores de alvejamento e agentes alcalinos (se usados), o volume da solução aquosa ou líquido de lavagem e o pH e temperatura vão variar dependendo: (i) da natureza da fibra, isto é, fibra bruta, fio ou têxtil; (ii) se limpeza e alvejamento simultâneos ou sequenciais são realizados; (iii) da(s) enzima(s) particular(es) usada(s) e
20 da atividade específica da enzima; (iv) das condições de temperatura, pH, tempo, etc., na qual processamento acontece; (v) a presença de outros componentes no líquido de lavagem; e (vi) o tipo de regime de processamento usado, isto é, *padbatch* contínuo, descontínuo ou batelada. A otimização das condições de processo pode ser determinada usando
25 experimentação de rotina tal como através do estabelecimento de uma matriz de condições e teste de pontos diferentes na matriz. Por exemplo, a quantidade de enzima, a temperatura na qual o contato acontece e o tempo total de processamento podem ser variados, após o que os materiais celulósicos ou têxtil resultantes são avaliados quanto a (a) remoção de
30 pectina; (b) uma propriedade de limpeza tal como, por exemplo, capacidade umectante; e (c) qualidade de alvejamento, tal como brancura.

 Em uma modalidade preferida, as condições ou composições de

tratamento podem ser ajustadas para favorecer os processos de retirada de cola, limpeza ou alvejamento tal como através do ajuste do pH, concentração de agente umectante ou concentração de quelante catiônico divalente tal como tetraacetato de etileno diamina de modo a promover mais o processo de alvejamento. Em uma modalidade preferida, o modo sequencial pode compreender ainda ajuste de uma ou mais propriedades da composição da solução aquosa ou líquido de lavagem entre as etapas (ii) e (iii). Por exemplo, pH, concentração de agente umectante ou concentração de quelante catiônico divalente, tal como tetraacetato de etileno diamina, podem ser ajustados entre as etapas (ii) e (iii) de modo a promover mais o processo de alvejamento. As condições das primeira e segunda incubações podem também diferir com relação à temperatura, agitação, tempo e similar.

4.4 Métodos para Biopreparação e Tingimento de Banho Único

Um aspecto compreende biopreparação (ou limpeza) e tingimento sendo realizados em um banho único. Existem pelo menos dois modos de prática dos métodos. Em um aspecto, uma enzima de biolimpeza e um sistema de tingimento são adicionados à solução aquosa ou líquido de lavagem que contata a fibra celulósica ou tecido, e incubação é realizada por tempo suficiente e sob condições apropriadas para atingir ambos limpeza eficaz e tingimento eficaz. Em um método alternativo, (i) uma enzima de biolimpeza é adicionada ao líquido de lavagem; (ii) uma primeira incubação é realizada por tempo suficiente e sob condições apropriadas para pelo menos iniciar, e de preferência obter, limpeza eficaz; (iii) o líquido de lavagem contendo a enzima de biolimpeza é então suplementado com um sistema de tingimento; e (iv) uma segunda incubação é realizada por um tempo suficiente e sob condições apropriadas para obter tingimento eficaz. Será compreendido que o segundo método descrito pode compreender ainda ajuste de uma ou mais propriedades da composição do líquido de lavagem entre duas etapas (ii) e (iii) (tal como, por exemplo, pH, resistência iônica, concentração ou agente umectante ou concentração de quelante catiônico divalente tal como EDTA ou EGTA, e que as condições das primeira e segunda incubações podem também diferir com relação à temperatura,

agitação, pH, tempo e similar.

A concentração de enzima(s) na solução aquosa pode ser ajustada de modo que a dosagem de enzima(s) adicionada a uma dada quantidade de fibra está entre cerca de 0,1 e cerca de 10.000 mol/min/kg de fibra, de preferência entre cerca de 1 e cerca de 2.000 mol/min/kg de fibra e com mais preferência entre cerca de 10 e cerca de 500 mol/min/kg de fibra. Usando uma unidade de medição diferente, as dosagens de enzima(s) podem ser, por exemplo, entre cerca de 250 e 12.000 APSU/kg de fibra (APSU significa unidade padrão de pectinase alcalina), de preferência entre cerca de 500 e 9000 APSU/kg de fibra e com mais preferência entre cerca de 1000 e 6000 APSU/kg de fibra.

A solução aquosa contendo a enzima de biolimpeza tem um pH entre cerca de 5 e cerca de 11 e com mais preferência de a partir de cerca de 6-10. O pH preferido dependerá de se limpeza e tingimento são realizados simultaneamente ou sequencialmente. Se limpeza e tingimento forem realizados simultaneamente, o líquido de lavagem tem de preferência um pH entre cerca de 5 e cerca de 8,5, e com mais preferência entre cerca de 7 e cerca de 8. Quando as etapas são realizadas sequencialmente, o líquido de lavagem nas etapas (i) e (ii) pode ter de preferência um pH entre cerca de 6 a 9, por exemplo, entre cerca de 7,0 e cerca de 8,5 e nas etapas (iii) e (iv) entre cerca de 6 e cerca de 9. Ainda, o líquido de lavagem de preferência ou contém uma concentração baixa de cálcio adicionado, isto é, menos do que 2 mM de Ca^{2+} ou não tem Ca^{2+} adicionado ou outros cátions divalentes totalmente.

Quando biolimpando e tingindo simultaneamente, a temperatura na qual os processos de limpeza e tingimento combinados são realizados pode ser entre cerca de 15°C e cerca de 95°C, com mais preferência entre cerca de 20°C e 80°C e com mais preferência entre cerca de 40°C e 70°C. Temperaturas similares podem ser utilizadas quando as etapas de biolimpeza e tingimento acontecem sequencialmente, ou as temperaturas podem variar para incluir faixas entre cerca de 25°C e cerca de 50°C para a etapa de limpeza; e a temperatura na qual o tingimento subsequente é

realizado pode ser entre cerca de 30°C e cerca de 100°C, de preferência abaixo de 50°C. Será compreendido que a escolha de temperatura(s) vai depender de (i) da natureza da fibra, isto é, fibra bruta, fio ou têxtil; (ii) da enzima particular usada para limpeza, bem como da enzima oxidativa particular se usada para tingimento; e (iii) o corante ou tipo de corante particular. Por exemplo, tingimento por esgotamento é normalmente realizado entre cerca de 60°C e 95°C. Tingimento direto usando corante reativo é realizado, por exemplo, a 60°C a 80°C e tingimento com enxofre acontece em torno de cerca de 95°C. Adicionalmente, ambos tingimentos com enxofre e direto (por exemplo, corantes Ciba tal como Solophenyl) requerem uma concentração alta de sal (por exemplo, NaCl). Tingimentos reativo e direto também requerem um pH de preferência na faixa de cerca de pH 6 a 8, que funciona bem com a pectato liase revelada aqui.

Limpeza eficaz tipicamente resulta em uma capacidade umectante de menos do que cerca de 10 segundos, de preferência menos do que cerca de 5 segundos e com mais preferência menos do que cerca de 2 segundos, quando medida usando o teste de queda de acordo com AATCC Test Method 39-1980. Tipicamente, limpeza eficaz requer a digestão de uma proporção substancial da pectina na fibra, de preferência pelo menos 30% em peso, com mais preferência pelo menos 50% em peso e com mais preferência pelo menos 70%. Digestão de pectina refere-se à clivagem de ligações α -1,4-glicosídicas em pectina de modo que os produtos de digestão podem ser removidos da fibra através de, por exemplo, enxágue ou qualquer outro método de separação convencional. Métodos para medição do grau de digestão de pectina de uma fibra incluem, sem limitação, o método de tingimento de Vermelho de rutênio conforme descrito por, por exemplo, Luft, 171 THE ANATOMICAL RECORD 347 (1971).

Tingimento eficaz tipicamente resulta em uma ou mais das propriedades que seguem: (i) matiz e profundidade de cor desejadas (conforme determinado através das medições CIE $L^*a^*b^*$ usando, por exemplo, um *Mecbeth color eye*); (ii) uma uniformidade satisfatória de tingimento (avaliada através de exame visual); e (iii) propriedades de fixação

de corante tal como fixação à lavagem, fixação à luz e fixação à danificação (úmido e seco) de pelo menos cerca de 3,0, de preferência acima de 3,5 e com mais preferência acima de 4,0 (conforme medido em uma escala cinza de cor usando Método EP1 conforme revelado no AATCC TECHNICAL
5 MANUAL, vol. 7, 350 (1995)).

Ainda, os métodos usando composições com uma pectato liase de *B. subtilis* podem resultar em absorção aumentada de corante em fibras submetidas à biolimpeza e tingimento *single-vat* relativo a fibras submetidas a tingimento. De preferência, o aumento de absorção de corante é pelo
10 menos cerca de 10%. Absorção de corante pode ser medida através de, por exemplo,: (i) medição da exaustão de uma solução corante ou (ii) medição da intensidade de cor no tecido (valor $L*a*b$).

Para atingir limpeza eficaz, a dosagem de enzima(s) (mol/min/kg de fibra), a concentração de enzima(s) no líquido de lavagem (mol/min/L de líquido de lavagem) e o volume total de líquido de lavagem aplicados a uma
15 dada quantidade de fibra (L/kg de fibra) variarão dependendo: (i) da natureza da fibra, isto é, fibra bruta, fio ou têxtil; (ii) se limpeza e tingimento simultâneos ou sequências são realizados; (iii) a(s) enzima(s) particular(es) usada(s) e a atividade específica da enzima; (iv) as condições de
20 temperatura, pH, tempo, etc., nas quais o processamento acontece; e (v) a presença de outros componentes no líquido de lavagem.

Determinação de condições adequadas incluindo, por exemplo, dosagem de enzima, concentração de enzima (ou concentração de enzimas em uma mistura de enzimas), volume de solução e temperatura a serem
25 usadas pode ser conseguida usando experimentação de rotina através do estabelecimento de uma matriz de condições e teste de pontos diferentes na matriz. Por exemplo, a quantidade de enzima, a temperatura na qual o contato acontece e o tempo total de processamento podem ser variados, após o que a fibra ou têxtil resultante é avaliado quanto à (a) remoção de
30 pectina; (b) uma propriedade de limpeza tal como, por exemplo, capacidade umectante; e (c) qualidade de tingimento.

Em limpeza e tingimento simultâneos, a fibra é contatada com

pectato liase (opcionalmente na presença de outras enzimas) e um corante celulósico tal como C.I. Reactive Blue 184 sob as condições que seguem: (i) uma temperatura de cerca de 45°C; (ii) um pH de cerca de 7,0-8,0; (iii) a ausência de cátions divalentes adicionados; (iv) uma razão de líquido de lavagem:tecido entre cerca de 0,5 e cerca de 50; e (v) uma dosagem de enzima de biolimpeza entre cerca de 10 e cerca de 500 mol/min/kg de fibra.

Nos exemplos abaixo é mostrado que a etapa de limpeza pode ser realizada usando uma pectato liase revelada ou preparação de pectato liase em uma temperatura de 50°C ou menos (mas acima de 50°C) e otimamente em temperatura ambiente. O pH da reação de biolimpeza alvejamento combinados pode ser de a partir de cerca de 6 a cerca de 11 e opcionalmente cerca de 6,0 a 8,5.

5. Composições de Limpeza

Remoção de manchas derivadas de plantas, comida e frutas é um desafio para a indústria de limpeza, seja limpeza de têxteis ou outras substâncias. Essas manchas tipicamente contêm misturas complexas de material fibroso com base principalmente em carboidratos e seus derivados: fibras e componentes de parede celular. Polímeros de pectina são constituintes importantes de paredes de célula de planta e estão associados com manchas derivadas de plantas ou frutas. As manchas são geralmente encontradas em tecidos sujos. Essas manchas são encontradas, por exemplo, em tecidos sujos. Essas sujeiras são frequentemente difíceis de remover eficazmente de um substrato sujo. Sujeiras altamente coloridas ou "secas" derivadas de sucos de fruta e/ou vegetais são particularmente desafiadoras de remover. Exemplos específicos para limpeza de tais sujeiras incluem manchas de vegetais, tal como aquelas de espinafre, beterraba, cenoura e tomates; frutas tal como cerejas, bagas, mangas, pêssegos, abricós, bananas e uvas. Adicionalmente, componentes pectina e pectato são também usados em aditivos alimentares, tal como em sorvetes, molho de tomate, geléias, compotas e alimentos para bebê. Então, outro aspecto é a limpeza de manchas causadas como um resultado de um alimento com tais aditivos alimentares sujando um têxtil ou superfície. Então, inclusão de

uma pectato liase em uma composição detergente ou composição de limpeza auxiliará na quebra de pectinas e pectatos encontrados em manchas, através da clivagem das pectinas e pectatos em componentes que são mais fáceis de remover.

5 Composições de limpeza podem compreender pelo menos 50%, de preferência pelo menos 75% de uma pectato liase. A composição pode compreender ainda uma hemicelulase com base na quantidade total (p/p) de enzimas de degradação de parede de célula de planta. Em algumas modalidades, a composição pode compreender 90% (p/p) ou mais de uma
10 pectato liase como a atividade de enzima de degradação de parede celular de planta. Em outro aspecto, as composições compreendem outras enzimas. Outras classes de enzima consideradas em uma ou mais combinações incluem, mas não estão limitadas a, proteases, amilases, beta-glucanases, lipases, hemicelulases, cutinases, pectinases e outras pectato liases.

15 Há um alto grau de interação entre celulose, hemicelulose e pectina na parede celular. A degradação enzimática dessas estruturas de polissacarídeo particularmente intensivamente reticuladas não é simples. Um grande número de enzimas é conhecido estar envolvido na degradação de paredes de célula de planta. elas podem ser amplamente subdivididas
20 em celulasas, hemicelulasas e pectinases (Ward e Young, 8 CRC CRITICAL REV. IN BIOTECH. 273-274 (1989)).

 Celulose é o componente polissacarídeo principal de paredes de célula de planta. Ela consiste em polímeros de glicose β -1,4-ligados. Celulose pode ser quebrada por celulasas, também chamadas enzimas
25 celulolíticas. Enzimas celulolíticas foram divididas tradicionalmente em três classes: endoglucanases, exoglucanases ou celobiohidrolases (CBG) e β -glicosidasas (J. Knowles e outros, 5 TRENDS IN BIOTECH. TECH. 255-261 (1987)). Tal como todas as enzimas de degradação de parede celular, celulasas podem ser produzidas por um grande número de bactérias,
30 leveduras e fungos.

 Pectinas são constituintes principais das paredes de célula de partes comestíveis de frutas e vegetais. A lamela média, que está situada

entre as paredes da célula, é principalmente composta de protopectina, que é a forma insolúvel de pectina. Pectinas são consideradas adesivos intracelulares e, devido à sua natureza coloidal, elas têm uma função importante no sistema de regulação de água de plantas. A quantidade de pectina em plantas pode ser muito alta. Por exemplo, cascas de limão são descritas conter pectina até 30% de seu peso seco, cascas de laranja contêm de a partir de 15-20% e cascas de maçã cerca de 10% (K. Norz, ZUCKER UND SUSSWAREN WIRTSCHAFT 38: 5-6 (1985)).

Pectinas são compostas de estrutura principal de ramnogalacturonana onde cadeias 1,4-ligadas (α -D-galacturonana) são interrompidas em intervalos pela inserção de resíduos (α -L-ramnopiranosila) 1,2-ligados (W. Pilnik e outros, em THE BIOCHEMISTRY OF FRUITS AND THEIR PRODUCTS, vol. 1, Capítulo 3, (Academic Press, 1970)). Outros açúcares, tal como D-galactose, L-arabinose e D-xilose estão presentes como cadeias laterais. Muitos resíduos de galacturonana são esterificados com grupos metila nas posições C2 e C3.

Um grande número de enzimas é conhecido degradar pectinas. Exemplos de tais enzimas são pectina esterase, pectina liase (também chamada pectina transeliminase), pectato liase e endo- ou exo-poligalacturonase (Pilnik e Voragen, 4 FOOD BIOTECH 319-328 (1990)). À parte das enzimas degradando regiões moles, enzimas degradando regiões pilosas tal como ramnogalacturonase e enzimas acessório foram também encontradas (Schols e outros, 206 CARBOHYDRATE RES. 105-115 (1990); Searle Van Leeuwen e outros, 38 APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL. 347-349 (1992)).

Hemiceluloses são um grupo complexo de polissacarídeos não-amido na parede de célula de planta. Elas consistem em polímeros de xilose, arabilose, galactose ou manose, que são frequentemente e altamente ramificados e conectados a outras estruturas de parede celular. Então, uma multiplicidade de enzimas pode ser usada para degradar essas estruturas. Xilanases, galactanases, arabinanases, lichenases e manases são algumas enzimas de degradação de hemicelulose úteis para degradação dessas estruturas. Então, composições de limpeza podem compreender uma ou

mais dessas enzimas de degradação de hemicelulose em combinação com pectato liase. Deste modo, enzimas selecionadas para uso em composições compreendidas funcionariam otimamente em uma faixa de temperatura de a partir de cerca de 15-50°C e um pH de a partir de cerca de 6,0 a cerca de 8,0.

Endo- e exo-xilanases são enzimas acessório tal como glucuronidases, arabinofuranosidases, acetil xilano esterase e esterase de ácido ferúlico ou esterase de ácido coumárico são discutidas em, por exemplo, Kormelink (1992, Ph.D Thesis, University of Wageningen, Países Baixos). Essas enzimas são produzidas por uma ampla variedade de microorganismos e têm temperaturas e pHs ótimos variáveis.

Tal como outras enzimas de degradação de parede celular (CWDEs), galactanases são sintetizadas por muitos microorganismos (vide, por exemplo, Dekker e Richards, 32 ADV. CARBOHYDRAT. CHEM. BIOCHEM. 278-319 (1976)). Em paredes de célula de planta, dois tipos de arabinogalactanas estão presentes: tipo I, 1,4- β -galactanas e tipo II, 1,3/1,6- β -galactanas, que têm uma estrutura principal ramificada (Stephen, THE POLYSACCHARIDES 97-193 (G.O. Aspinael (ed.), Academic Press, Nova York, 1983)). Ambos tipos de galactanas requerem que seu próprio tipo de endo-enzima seja degradado. Pode ser esperado que outras enzimas, tal como enzimas de degradação de arabinana e exo-galactanase, desempenhem um papel na degradação de arabinogalactanas.

Lichenases (EC 3.2.1.73) hidrolisam ligações 1,4- β -D-glicosídicas em β -D-glucanos contendo ligações 1,3 e 1,4. Lichenases reagem em β -D-glucanos contendo apenas ligações 1,4 tal como, por exemplo, em celulose. Então, aplicação de lichenase não danifica fibras de celulose em tecidos. Lichenases são produzidas por bactérias tal como *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *B. licheniformis* e por algumas plantas (vide, por exemplo, S. Bielecki e outros, 10 CRIT. REV. IN BIOTECHN. 275-304 (1991)).

Arabinanas consistem em uma cadeia principal de subunidades α -L-arabinose ligadas α -(1 \rightarrow 5) umas às outras. Cadeias laterais são ligadas

α -(1→3) ou algumas vezes α -(1→2) à estrutura principal α -(1→5)-L-arabinana. Em maçãs, por exemplo, um terço da arabinose total está presente nas cadeias laterais. O peso molecular de arabinana é normalmente cerca de 15 kDa.

5 Enzimas de degradação de arabinana são conhecidas ser produzidas por uma variedade de plantas e microorganismos. Três enzimas obteníveis de *Aspergillus Niger* foram clonadas através de técnicas biológicas moleculares (vide, por exemplo, Pedido de Patente Europeu 0506190). Também, arabinosidases de bactérias tal como *Bacteroides* foram
10 clonadas (vide, por exemplo, Whitehead e Hespell 172 J. BACTERIOL. 2408 (1990)).

Galactomananas são polissacarídeos de armazenamento encontrados em sementes de *Leguminosae*. Galactomananas têm uma estrutura principal de (1→4)- β -manana linear e são substituídas com
15 resíduos de (1→6)- α -galactose únicos. Por exemplo, em goma guar, a razão de manose/galactose é cerca de 2 a 1. Galactomananas são aplicadas como espessantes em produtos alimentícios tal como molhos e sopas.

Enzimas mananase são descritas, por exemplo, no Pedido PCT Internacional WO 93/24622.

20 Glicomanana consiste em uma cadeia principal de glicose e manose. A cadeia principal pode ser substituída com grupos galactose e acetila; manases podem ser produzidas por vários microorganismos, incluindo bactérias e fungos.

Outra classe de enzimas que pode ser incluída são celulases.
25 Celulases são algumas vezes incorporadas para melhorar maciez, como um componente antidescamamento ou para efeitos de limpeza adicionais. Celulases não podem ser usadas em quantidades significantes, uma vez que muitas fibras têxteis compreendem uma alta porcentagem de fibras de celulose. As fibras de celulose são suscetíveis à quebra por celulases. Deste
30 modo, celulases, em si, não são então particularmente adequadas para limpeza de têxteis e tecidos, porque elas não podem ser adicionadas em uma quantidade suficiente para remover manchas de origem vegetal sem

danificar o têxtil. Celulases podem ser adicionadas a um detergente ou composição de limpeza de têxtil junto com outras enzimas, que são capazes de quebrar paredes de célula de planta. As combinações enzimáticas incluem concentrações menores de cada uma das enzimas individuais, por causa da ação acertada pela mistura de enzima sobre a massa fibrosa e suas manchas. Então, o uso de enzimas de degradação de parede celular pode criar condições de limpeza ótimas, sem dano às fibras têxteis, se a quantidade de celulase(s) for reduzida para menos do que 50%, de preferência menos do que 25% e com mais preferência menos do que 10% da quantidade total (p/p) de enzimas de degradação de parede de célula de planta presentes na composição. Alternativamente, quaisquer enzimas celulase podem estar presentes na composição de limpeza.

Em suma, um grande número de enzimas de degradação de parede de célula de planta existe, produzidas por organismos diferentes. Dependendo de sua fonte, as enzimas diferem em especificidade de substrato, pH e temperatura ótima, V_{max} , K_m , etc. A complexidade das enzimas reflete a natureza complexa das paredes de célula de planta, que difere fortemente entre espécies de planta e dentro de espécies entre tecidos de planta. Uma mistura de enzima adequada para uso em composições de limpeza, biolimpeza e alvejamento pode ser preparada dependendo da fonte de material de planta, do propósito da aplicação e das condições de aplicação específicas (por exemplo, pH, temperatura, substrato, íons divalentes e presença de peróxido).

Nos últimos anos, a disponibilidade e variedade dessas enzimas de degradação de parede de célula aumentaram consideravelmente, o que abre a possibilidade de uso de combinações selecionadas dessas enzimas como aditivos em composições detergente e de limpeza. Essas composições detergente e de limpeza são particularmente adequadas para remoção de manchas vegetais.

Como muitas das enzimas de degradação de parede celular estudadas se originam de fungos e mostram pH ótimo na faixa de pH ácido, identificação de pectato liases que operam em pH ácido, tal como aquelas

discutidas aqui, é de benefício para preparação de novas composições detergente e de limpeza.

Em muitos casos, pode ser possível obter as enzimas reveladas através da cultura dos microorganismos produzindo-as e isolamento da enzima da cultura ou do caldo de cultura. As enzimas podem também ser obtidas através de tecnologia de DNA recombinante, com o que uma célula hospedeiro é provida com a informação genética codificando a enzima desejada, junto com elementos adequados para expressão desta informação genética.

Uma célula hospedeiro pode ser um microorganismo homólogo, ou um microorganismo heterólogo, que pode incluir ambos mas não está limitado a, bactérias, bacilos, leveduras e fungos; eles podem, no entanto, também incluir células eucarióticas superiores tal como células de planta ou animal. Pode ser também muito útil prover uma célula hospedeiro com informação genética codificando mais de uma enzima ou mais de uma atividade de enzima, por exemplo, uma enzima híbrida.

Embora alguma ênfase tenha sido posta sobre microorganismos como uma fonte conveniente para as enzimas, será compreendido que enzimas de qualquer fonte podem ser usadas, contanto que elas possuam a atividade de serem capazes de quebrar pelo menos parte das paredes de célula de planta.

Uma vez que esta atividade é a propriedade mais relevante, ficará claro que derivados, fragmentos ou combinações dos mesmos com a mesma atividade ou similar que aquela de pectato liase de *B. subtilis* podem ser usados e devem ser incluídos dentro da definição de enzima.

Derivados incluem mutantes onde um ou mais aminoácidos foram adicionados, deletados ou substituídos para manter ou melhorar certas propriedades das enzimas, bem como enzimas quimicamente modificadas.

Composições podem compreender uma enzima única, pectato liase. Com mais preferência, será uma mistura de enzimas diferentes, que são de preferência capazes de degradar partes diferentes de paredes

celulares de planta, auxiliam em alvejamento, limpeza ou remoção de componentes de mancha (por exemplo, manchas de uma composição alimentícia onde componentes de parede celular de planta estão presentes como espessantes ou agentes de endurecimento ou similar). A enzima é

5 uma exopoligalacturonato liase, que tem um substrato preferido de poligalacturonato. Essas enzimas clivam o poligalacturonato em galacturonatos insaturados $\Delta 4:5$. Os produtos são geralmente digalacturonatos $\Delta 4:5$ insaturados separado da extremidade de redução do

10 substrato. Até recentemente, pH ótimo foi indicado como entre 8,0 e 9,5 e íons de cálcio foram considerados uma necessidade absoluta para todas as enzimas relatadas exceto aquelas para *Erwinia spp.* Vide, por exemplo John R. Whitaker, "Microbiol Pectolytic Enzymes", em MICROBIAL ENZYMES AND BIOTECHNOLOGY 158 (2ª ed., W.M. Fogarty e C.T. Kelly, 1990, Elsevier Science Pub. Co., Inc.).

15 Uma lista não-exclusiva de enzimas compreendida para uso em combinação com a pectato liase de *B. subtilis* inclui o que segue. Amilases podem ser usadas e incluem, por exemplo, α - ou β -amilases de origem bacteriana ou fúngica. Mutantes quimicamente ou geneticamente modificados de tais amilases são também compreendidos. Uma listagem

20 exemplar de α -amilases inclui, por exemplo, α -amilases obteníveis de espécies *Bacillus*, em particular uma linhagem especial de *B. licheniformis* (Pedido da Grã-Bretanha N° 1296839). Amilases comercialmente disponíveis relevantes incluem Natalase[®], Stainzyme[®], Duramy[®], Termamyl[®], Termamyl[®] Ultra, Fungamyl[®] e BAN[®] (disponível da Novozymes

25 A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) e Rapiasem e Maxamyl[®] (disponível da DSM, Holanda). Alternativamente, as α -amilases podem ser derivadas de linhagens de *Bacillus sp.* NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 e DSM 9375. Outras α -amilases incluem aquelas derivadas de *Bacillus sp.* DSM 12649 conforme revelado no WO 0060060 (aqui incorporado a título de

30 referência), bem como suas variantes. Outras amilases úteis são CGTases (ciclodextrina glicanotransferases, EC 2.4.1.19), por exemplo, aquelas obteníveis de espécies de *Bacillus*, *Thermoanaerobactor* ou

Thermoanaerobacterium.

Endo-glicanases podem ser também usadas junto com pectato liase e/ou outra enzima. Proteases compreendem aquelas de origem animal, vegetal ou microbiana. Proteases de origem microbiana são preferidas.

5 Mutantes quimicamente ou geneticamente modificados de tais proteases estão incluídos nesta relação. A protease pode ser uma serina protease, de preferência uma protease microbiana alcalina ou uma proteinase tipo tripsina. Exemplos de proteases alcalinas são subtilisinas, especialmente aquelas derivadas de *Bacillus*, por exemplo, subtilisina Novo, subtilisina

10 Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 e subtilisina 168 (descrita no, por exemplo, WO 89/06279). Exemplos de proteases tipo tripsina são tripsina (por exemplo, de origem de porco ou bovina) e protease de *Fusarium* conforme descrito, por exemplo, no WO 89/06270.

As enzimas podem também ser combinadas com uma hemicelulase para prover performance de detergência aperfeiçoada sobre sólidos

15 que contêm hemicelulose e polissacarídeos similares. Tais hemicelulases incluem xilanas, xiloglicanases, arabinofuranosidases, acetil xilano esterases, glucuronidases, esterases de ácido ferúlico, esterases de ácido coumárico, endo-galactanases, mananases, endo- e exo-arabinanases, exo-

20 galactanases. Mananases adequadas incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Mutantes quimicamente ou geneticamente modificados estão incluídos. Por exemplo, composições podem compreender uma mananase tal como aquela derivada de uma linhagem do gênero *Bacillus*, especialmente *Bacillus sp.* 1633 revelada no WO 99/64619 ou *Bacillus*

25 *agaradhaerens*, por exemplo, da linhagem tipo DSM 8721. Uma mananase adequada é Mannaway[®] produzida pela Novozymes A/S.

As combinações de enzima também compreendem o uso de uma β -glicanase (EC 3.2.1.6) para prover performance de detergência aperfeiçoada sobre sujeiras que contêm β -glicanos. β -glicanases preferidas

30 adicionais incluem lichenases e laminarinases. Por exemplo, pectato liase pode ser combinada com outras enzimas pectinolíticas tal como protopectinase, outras pectinases, poligalacturonase ou pectato liases

adicionais para prover performance de detergência aperfeiçoada sobre sujeiras pectináceas. Enzimas pectinolíticas adequadas incluem aquelas descritas nos, por exemplo, WO 99/27083, WO 99/27084, WO 00/55309 e WO 02/092741.

5 A pectato liase discutida aqui pode ser ainda combinada com enzimas pectina liases (EC 4.2.2.10), ramnogalacturononao liases (EC não definido), endo-1,4-galactanases (EC 3.2.1.89), xiloglicanases (EC não definido), xilanases (EC 3.2.1.8), arabinanases (EC 3.2.1.99), α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), manano endo-1,4-manosidases (EC 10 3.2.1.78), β -manosidases (EC 3.2.1.25), β -1,3-1,4-glicanases (EC 3.2.1.73), ramnogalacturonano hidrolases, exo-poligalacturonases (EC 3.2.1.67), ramnogalacturonases (EC não definido), glicano 1,3- β -glicosidases (EC 3.2.1.58), glicano endo-1,6- β -glicosidases (EC 3.2.1.75), manano endo-1,4- β -manosidases (EC 3.2.1.78), endo-1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8), celulose 15 1,4-celobiosidases (EC 3.2.1.91), celobioidrolases (EC 3.2.1.91), poligalacturonases (EC 3.2.1.15), acetil e metil esterase (tal como: ramnogalacturonano metil esterases, ramnogalacturonan acetil esterases, pectina metilesterases (EC 3.1.1.11), pectina acetilesterases (EC não definido), xilano metil esterases, acetil xilano esterases (EC 3.1.1.72), feruloil 20 esterases (EC 3.1.1.73), cianmoil esterases (EC 3.1.1.73)) para prover performance de detergência aperfeiçoada sob sujeiras correspondentes.

Para aumentar remoção de sujeira, enzimas podem ser incluídas com atividade de endo-separação. Essas enzimas cortam compostos de fibra polimérica em pedaços menores, e então aumentam a solubilização da 25 massa de fibra com seus pigmentos associados.

As composições podem ser especificamente adaptadas para seu uso pretendido. Por exemplo, composições para limpeza de têxteis, ou à mão ou automaticamente, vão geralmente compreender ingredientes diferentes das composições para limpeza de artigos de cozinha (talheres ou 30 louças), pisos e azulejos. As composições de limpeza vão também diferir de composições preparadas para uso como "pré-tratamento", que são aplicados a um substrato com mancha ou sujeira antes da sua lavagem ou aplicação

de um segundo detergente.

Ingredientes comuns para tais composições incluem tensoativos, *builders*, agentes de alvejamento, enzimas tal como amilases e proteases, etc.

5 Composições detergente podem ser formuladas como pós ou líquidos de lavagem. Elas podem ser utilizadas como detergentes de lavanderia, composições de lavagem de prato, limpadores de artigos domésticos ou domésticos (por exemplo, piso e azulejo), composições de pré-lavagem e/ou outras composições de limpeza de têxtil, tecido e roupa.

10 5.1.1 Tensoativos Têxteis

Outra modalidade refere-se a uma composição aquosa contendo pectato liase de *B. subtilis* compreendendo ainda um tensoativo exibindo uma resposta compatível ou sinérgica com o efeito de alvejamento e/ou limpeza aumentado. As composições fortificadas com tensoativo podem
15 compreender um sistema tensoativo, onde o tensoativo pode ser selecionado de tensoativo não-iônico e/ou aniônico e/ou catiônico e/ou anfótilico e/ou zwitteriônico e/ou semipolar, como uma combinação de tais tensoativos em combinação com uma pectato liase. Outras enzimas podem ser também incluídas na composição.

20 O tensoativo está tipicamente presente em um nível de a partir de 0,1% a 60% (com mais preferência 0,2%-15%) em peso e é com mais preferência formulado de modo que ele promove, ou pelo menos não degrada, a estabilidade de qualquer enzima nessas composições.

Sistemas preferidos a serem usados compreendem um
25 tensoativo não-iônico e/ou aniônico. Condensados de óxido de polietileno, polipropileno e polibutileno de alquil fenóis são adequados para uso como o tensoativo não-iônico de sistemas tensoativos, com os condensados de óxido de polietileno sendo preferidos. Os produtos de condensação de álcoois alifáticos primários e secundários com cerca de 1 a cerca de 25
30 moles de óxido de etileno são adequados para uso como o tensoativo não-iônico de sistemas tensoativos não-iônicos. Também úteis como um tensoativo não-iônico são alquilpolissacarídeos, conforme descrito, por

exemplo, na Patente U.S. Nº 4.565.647. Os produtos de condensação de óxido de etileno com uma base hidrofóbica formada pela condensação de óxido de propileno com propileno glicol são também adequados para uso. Outros tensoativos não-iônicos úteis nas composições descritas incluem produtos de condensação de óxido de etileno com o produto resultante da reação de óxido de propileno e etilenodiamina, bem como álcool etoxilato, nonilfenol etoxilato, alquilpoliglicosídeo, óxido de alquildimetilamino, monoetanolamida de ácido graxo etoxilado, monoetanolamida do ácido graxo, amida do ácido poliidroxi alquil graxo e derivados N-acil N-alquila de glicosamina ("glucamidas").

Tensoativos aniônicos preferidos incluem tensoativos de alquil sulfato alcoxilados e os ésteres de fosfato análogos. Tensoativos aniônicos adequados a serem usados são tensoativos de alquil éster sulfonato, olefinsulfonatos, alquil sulfatos (sulfatos de álcool graxo), álcool etoxi sulfatos, alcano sulfonatos secundários, metil ésteres de ácido alfa-sulfo graxo, ácido alquil- ou alquenilsuccínico e sabão, incluindo ésteres lineares de ácidos carboxílicos C8-C20 (isto é, ácidos graxos), que são sulfonados com SO₃ gasoso. Outros tensoativos aniônicos úteis para limpeza de têxtil podem ser também incluídos em uma composição de enzima aquosa. Composições de enzima aquosas podem também conter tensoativos catiônicos, anfotéricos, zwitteriônicos e semipolares, bem como os tensoativos não-iônicos e/ou aniônicos outros que não aqueles já descritos aqui.

Quando incluídas aqui, as composições de enzima aquosas tipicamente compreendem de a partir de cerca de 1% a cerca de 40% em peso e com mais preferência de a partir de cerca de 3% a cerca de 20% em peso de tensoativos.

5.1.2 Agentes Antiespumantes

Outro ingrediente opcional em composições de limpeza, alvejamento e limpeza de têxtil pode ser um supressor de espuma ou agente antiespumante. Agentes antiespumantes exemplares incluem silicones, DC-S44 (Dow Corning) e misturas de sílica-silicone. Os agentes antiespumantes

são normalmente empregados em níveis de a partir de 0,001% a 2% em peso da composição, de preferência de a partir de 0,01% a 1% em peso. Vide, por exemplo, Patente U.S. Nº 3.933.622.

5.1.3 Proteases

5 Proteases adequadas para uso nas composições descritas incluem aquelas de origem animal, vegetal ou microbiana. De preferência, as proteases são de origem microbiana. A protease pode ser uma serina protease ou uma metaloprotease, tal como protease microbiana alcalina ou uma protease tipo tripsina. Exemplos de proteases incluem, mas não estão
10 limitados a,

(a) aminopeptidases incluindo, mas não limitado a, prolil aminopeptidase (EC 3.4.11.5), X-pro aminopeptidase (EC 3.4.11.9), leucil aminopeptidase bacteriana (EC 3.4.11.10), aminopeptidase termofílica (EC 3.4.11.12), lisil aminopeptidase (EC 3.4.11.15), triptofanil aminopeptidase
15 (EC 3.4.11.17) e metionil aminopeptidase (EC 3.4.11.18);

(b) serina endopeptidases incluindo, mas não limitado a, quimioprotease (EC 3.4.21.1), tripsina (EC 3.4.21.4), cucumisina (EC 3.4.21.25), braquiurina (EC 3.4.21.32), cerevisina (EC 3.4.21.48) e subtilisina (EC 3.4.21.62);

20 (c) cisteína endopeptidases incluindo, mas não limitado a, papaína (EC 3.4.22.2), ficaína (EC 3.4.22.3), quimiopapaína (EC 3.4.22.6), asclepaína (EC 3.4.22.7), actinidaína (EC 3.4.22.14), caricaína (EC 3.4.22.30) e ananaína (EC 3.4.22.31);

(d) endopeptidases aspárticas incluindo, mas não limitado a,
25 pepsina A (EC 3.4.23.1), Aspergiloepsina I (EC 3.4.23.18), Peniciloepsina (EC 3.4.23.20) e Saccharoepsina (EC 3.4.23.25); e

(d) metaloendopeptidases tal como Bacilolisina (EC 3.4.24.28).

Exemplos não-limitantes de subtilisinas incluem subtilisina BPN', subtilisina amylossacchariticus, subtilisina 168, subtilisina mesentericopeptidase, subtilisina Carlsberg, subtilisina DY, subtilisina 309,
30 subtilisina 147, termitase, aqualisina, Bacilo PB92 protease, proteinase K, protease TW7 e protease TW3.

Proteases comercialmente disponíveis incluem Alcalase[®], Savinase[®], Primase[®], Duralase[®], Esperase[®], Kannase[®] e Durazym[®] (Novo Nordisk A/S), Maxatase[®], Maxacal[®], Maxapem[®], Properase[®], Purafect[®], Purafect Oxp[®], FN2[®] e FN3[®] (Genencor International Inc.).

5 Também úteis nas composições e métodos são variantes de protease, tal como aquelas reveladas nos Pedidos de Patente Europeus (EP) N^{os} 130756 (Genentech); EP 260105 (Genencor); EP 251446 (Genencor); Pedido Europeu 525610 (Solvay); e EP 214435 (Henkel); Pedidos de Patente PCT Internacionais N^{os} WO 87/04461 (Amgen); WO 10 87/05050 (Genex); WO 88/08828 (Genex); WO 88/08033 (Amgen); WO 89/06279 (Novo Nordisk A/S); WO 91/00345 (Novo Nordisk A/S); e WO 94/02618 (Gist-Brocades N.V.); e Thomas e outros, 318 NATURE 375-376 (1985); Thomas e outros, 193 J. MOL. BIOL. 193:803-813 (1987); Russel e outros, 328 *Nature* 496-500 (1987).

15 Atividade de proteases pode ser determinada, por exemplo, conforme descrito em METHODS OF ENZYMATIC ANALYSIS, vol. 5 (3^a ed. Verlag Chemie, Weinheim, 1984).

5.1.4 Lipases

20 Lipases são também compreendidas para inclusão em uma composição compreendendo pectato liase de *B. subtilis*. Lipases adequadas (também chamadas hidrolases de éster carboxílico) incluem, sem limitação, aquelas de origem bacteriana ou fúngica, incluindo triacilglicerol lipases (EC 3.1.1.3) e Fosfolipase A₂ (EC 3.1.1.4). Lipases adicionais incluem, mas não estão limitadas a, aquelas de *Humicola* (sinônimo *Thermomyces*), tal como 25 de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) conforme descrito nas, por exemplo, Patentes Europeias N^{os} 258 068 e 305 216 ou de *H. insolens* conforme descrito no Pedido PCT Internacional WO 96/13580; uma lipase de *Pseudomonas*, tal como de *P. alcaligenes* ou *P. pseudoalcaligenes* (Patente EP N^o 218 272), *P. cepacia* (Patente EP N^o 331 376), *P. stutzeri* (Patente da 30 Grã-bretanha N^o 1.372.034), *P. fluorescens*, linhagem *Pseudomonas* sp. SD 705 (vide, por exemplo, Pedido PCT Internacional N^o WO 95/06720 e WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (Pedido PCT Internacional N^o WO 96/12012);

uma lipase de *Bacillus*, tal como de *B. subtilis* (vide, por exemplo, Dartois e outros, 1131 BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA 253-360 (1993)); *B. stearothermophilus* (Pedido Japonês Nº 64/744992) ou *B. pumilus* (Pedido PCT Internacional Nº WO 91/16422). Outros exemplos podem incluir
5 variantes de lipase tal como aquelas descritas nos Pedidos PCT Internacionais Nºs WO 92/05249, WO 94/01541, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 e WO 97/07202; e Patente Européia Nº 407 225 e 260 105. Enzimas lipases comercialmente disponíveis incluem, mas não estão
10 limitadas a, Lipolase[®], Lipolase Ultra[®], Lipozyme[®], Palatase[®], Novozym[®] 435 e Lecitase[®] (todas disponíveis da Novo Nordisk A/S). A atividade de uma lipase em uma composição pode ser determinada, por exemplo, conforme descrito em METHODS OF ENZYMATIC ANALYSIS, vol. 4 (3ª ed., Verlag Chemie, Weinheim, 1984).

15 Enzimas de biolimpeza adicionais podem ser usadas com a pectato liase. Tais enzimas de biolimpeza adicionais podem ser derivadas de outros microorganismos ou enzimas de biolimpeza derivadas das enzimas listadas acima onde um ou mais aminoácidos foram adicionados, deletados ou substituídos, incluindo polipeptídeos híbridos. Tais polipeptídeos
20 derivados e híbridos podem ser usados contanto que os polipeptídeos resultantes exibam atividade de biolimpeza. Tais variantes podem ser criadas usando procedimentos de metagênese convencionais e identificadas usando, por exemplo, técnicas de avaliação de alto rendimento tal como os procedimentos de avaliação de placa de ágar. Por exemplo, atividade de
25 pectato liase pode ser medida através da aplicação de uma solução de teste a furos de 4 mm feitos em placas de ágar (por exemplo, ágar LB), contendo poligalacturonato de sódio 0,7% p/v (Sigma P 1879). As placas são então incubadas por 6 horas em uma temperatura particular (por exemplo, 25-40°C). As placas são então molhadas em, por exemplo, ou (i) CaCl₂ 1M por
30 0,5 h; ou (ii) brometo de alquil trimetilamônio 1% (MTAB, Sigma M-7635) por 1 hora. Ambos procedimentos causam a precipitação de poligalacturonato dentro do ágar. Atividade de pectato liase pode ser detectada através do

aparecimento de zonas claras dentro de uma base de poligalacturonato precipitado. Sensibilidade do ensaio é calibrada usando diluições de uma preparação padrão de pectato liase.

5 Determinação de temperatura, pH e dependência de cátion divalente de uma enzima de biolimpeza isolada pode ser conseguida usando métodos convencionais. Por exemplo, um ensaio de atividade enzimática pode ser realizado em uma faixa de temperaturas e pHs, e na presença e ausência de concentrações de Ca^{+2} diferentes, e temperatura e pH ótimo e efeito de cátion divalente (se algum) é quantificado. Temperatura, pH e
10 dependência de cátion são então determinados para estabelecer a adequabilidade de uma pectato liase particular para uso nas composições e métodos de uso aqui compreendidos. Esses podem ser testados em uma disposição de substratos também.

Enzimas de biolimpeza podem ser derivadas de sua célula de
15 origem ou podem ser recombinantemente produzidas e podem ser purificadas ou isoladas. Conforme aqui usado, uma enzima "purificada" ou "isolada" é uma que foi tratada para remover material de não-enzima derivado da célula onde ela foi sintetizada que poderia interferir com sua atividade enzimática. Tipicamente, a enzima de biolimpeza é separada do
20 microorganismo bacteriano ou fúngico onde ela é produzida como um constituinte endógeno ou como um produto recombinante. Se a enzima for secretada no meio de cultura, purificação pode compreender separação do meio de cultura da biomassa através de centrifugação, filtragem ou precipitação usando métodos convencionais. Alternativamente, a enzima
25 pode ser liberada da célula hospedeiro através de rompimento de célula, e então separada da biomassa. Em alguns casos, purificação adicional pode ser conseguida através de métodos de purificação de proteína convencionais, incluindo, sem limitação, precipitação de sulfato de amônio; extração de ácido ou caotrope; troca de íon; peneira molecular; e
30 cromatografia hidrofóbica, tal como FLPC e HPLC; foco isoeletrico preparativo; e eletroforese em gel de poliacrilamida preparativa. Alternativamente, purificação pode ser conseguida usando cromatografia de

afinidade tal como cromatografia de imunoafinidade. Por exemplo, pectato liases recombinantes híbridas podem ser usadas tendo uma sequência de aminoácido adicional que serve como um "tag" de afinidade, que facilita purificação usando uma matriz de fase sólida apropriada.

5 A enzima de biolimpeza pode ser quimicamente modificada para aumentar uma ou mais propriedades que proveem características vantajosas, tal como, por exemplo, solubilidade maior, labilidade menor ou dependência de íon divalente, etc. As modificações incluem, sem limitação, fosforilação, acetilação, sulfatação, acilação ou outras modificações de
10 proteína conhecidas daqueles de habilidade na técnica.

5.1.5 Sistema de *Builder*

As composições de acordo com a presente invenção podem compreender ainda um sistema de *builder*. Qualquer sistema de *builder* convencional é adequado para uso aqui incluindo materiais de
15 aluminossilicato, silicatos, policarboxilatos e ácidos graxos, materiais tal como tetraacetato de etilenodiamina, sequestrantes de íon de metal tal como aminopolifosfonatos, particularmente ácido etilenodiamino tetrametileno fosfônico e ácido dietileno triamino pentametileno fosfônico. Embora menos preferido por razões ambientais óbvias, *builders* de fosfato podem ser
20 também usados.

Builders adequados podem ser um material de troca de íon, geralmente um material de aluminossilicato hidratado inorgânico, mais particularmente um zeólito sintético hidratado tal como zeólito hidratado A, X, B, HS ou MAP.

25 Outro material de *builder* inorgânico adequado é silicato em camada, por exemplo, SKS-6 (Hoechst). SKS-6 é um silicato em camada cristalino consistindo em silicato de sódio ($\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$).

Policarboxilatos adequados contendo um grupo carbóxi incluem ácido láctico, ácido glicólico e derivados de éter dos mesmos.
30 Policarboxilatos contendo dois grupos carbóxi incluem os sais solúveis em água de ácido succínico, ácido malônico, ácido (etilenodióxi)diacético, ácido maléico, ácido diglicólico, ácido tartárico, ácido tartrônico e ácido fumárico,

bem como os éter carboxilatos descritos na, por exemplo, Patente U.S. N° 3.935.257 e carboxilatos de sulfinila. Policarboxilatos contendo três grupos carbóxi incluem, em particular, citratos, aconitratos e citraconatos solúveis em água, bem como derivados de succinato tal como os materiais carboximetiloxissuccinatos, lactoxissuccinatos e os oxipolicarboxilato tal como tricarboxilatos de 2-oxa-1,1,3-propano.

Policarboxilatos contendo quatro grupos carbóxi incluem oxidissuccinatos; 1,1,2,2-etano tetracarboxilatos; 1,1,3,3-propano tetracarboxilatos contendo substituintes sulfo (vide, por exemplo, Patente U.S. N° 3. 936.448); e os citratos pirolisados sulfonados; e policarboxilatos contendo substituintes fosfona.

Policarboxilatos alicíclicos e heterocíclicos incluem ciclopentano-cis,cis-cistetracarboxilatos; ciclopentadienida pentacarboxilatos; 2,3,4,5-tetraidro-furano-cis,cis; cistetracarboxilatos; 2,5-tetraidro-furano-cis; discarboxilatos; tetracarboxilatos de 2,2,5,5-tetraidrofurano; 1,2,3,4,5,6-hexano-hexacarboxilatos e derivados carboximetila de álcoois polídricos tal como sorbitol, manitol e xilitol. Policarboxilatos aromáticos incluem derivados de ácido melítico, ácido piromelítico e ácido ftálico revelados.

Policarboxilatos preferidos incluem hidróxi-carboxilatos contendo até três grupos carbóxi por molécula, mais particularmente citratos.

Sistemas de *builder* preferidos para uso nas presentes composições incluem uma mistura de um *builder* de aluminossilicato insolúvel em água tal como zeólito A ou de um silicato em camada (SKS-6) e um agente de quelação carboxilato solúvel em água tal como ácido cítrico.

Um quelante adequado para inclusão nas composições detergentes de acordo com a invenção é ácido etilenodiamino-N,N'-dissuccínico (EDDS) ou os sais de metal alcalino, metal alcalino-terroso, amônio ou amônio substituído do mesmo, ou misturas dos mesmos. Compostos EDDS preferidos são a forma de ácido livre e o sal de sódio ou magnésio dos mesmos. Exemplos de tais sais de sódio preferidos de EDDS incluem Na_2EDDS e Na_4EDDS . Exemplos de tais sais de magnésio preferidos de EDDS incluem MgEDDS e Mg_2EDDS . Os sais de magnésio

são os mais preferidos para inclusão em composições de acordo com a invenção.

Também compreendidos são materiais de *builder* que podem fazer parte do sistema de *builder* para uso em composições granulares incluindo, mas não limitado a, materiais inorgânicos tal como carbonatos de metal alcalino, bicarbonatos, silicatos e materiais orgânicos tal como os fosfonatos orgânicos, amino polialquileno fosfonatos e amino policarboxilatos.

Outros sais orgânicos solúveis em água adequados são os ácidos homo- ou copoliméricos ou seus sais, onde o ácido policarboxílico compreende pelo menos dois radicais carboxila separados um do outro por não mais do que dois átomos de carbono. Sais de poliacrilato incluem aqueles de um peso molecular de 2000 a 5000 Dáltons e seus copolímeros com anidrido maléico, tais copolímeros tendo um peso molecular de a partir de 20.000 a 70.000, especialmente cerca de 40.000.

Sais de *builder* de detergência são normalmente incluídos em quantidades de a partir de 5% a 80% em peso da composição. Níveis preferidos de *builder* para detergentes líquidos são de a partir de 5% a 30%.

5.1.6 Agentes de Alvejamento

Ingredientes detergentes opcionais adicionais que podem ser incluídos nas composições detergentes da presente invenção incluem agentes de alvejamento tal como perborato PB1, PB4 e percarbonato. Esses componentes de agente de alvejamento podem incluir um ou mais agentes de alvejamento de oxigênio e, dependendo do agente de alvejamento escolhido, um ou mais ativadores de alvejamento. Compostos de alvejamento de oxigênio presentes estarão tipicamente presentes em níveis de a partir de cerca de 1% a cerca de 25%. Em geral, compostos de alvejamento são componentes adicionados opcionais em formulações não-líquidas, por exemplo, detergentes granulares. Ele pode também incluir sistemas de alvejamento conforme aqui discutido.

O componente do agente de alvejamento para uso aqui pode ser qualquer um dos agentes de alvejamento úteis para composições detergente

incluindo alvejantes de oxigênio bem como outros conhecidos na técnica.

O agente de alvejamento adequado para a presente invenção pode ser um agente de alvejamento ativado ou não-ativado.

Uma categoria de agente de alvejamento de oxigênio que pode ser usada compreende agentes de alvejamento de ácido carboxílico e sais dos mesmos. Exemplos adequados desta classe de agentes incluem hexaidrato de monoperoxifalato de magnésio, o sal de magnésio de ácido meta-cloro perbenzóico, ácido 4-nonilamino-4-oxoperoxibutírico e ácido diperoxidodecanodióico. Tais agentes de alvejamento são revelados nas Patentes U.S. Nº 4.483.781, EP 0 133 354 e Patente U.S. Nº 4.412.934. Agentes de alvejamento altamente preferidos também incluem ácido 6-nonilamino-6-oxoperoxicapróico tal como aqueles descritos na Patente U.S. Nº 4.634.551.

Outra categoria de agentes de alvejamento compreende os agentes de alvejamento de halogênio. Exemplos de agentes de alvejamento de hipoaleto, por exemplo, incluem ácido tricloro isocianúrico e os dicloroisocianuratos de sódio e potássio e N-cloro e N-bromo alcano sulfonamidas. Tais materiais são normalmente adicionados a 0,5-10% em peso do produto acabado, de preferência 1-5% em peso. Tais agentes de alvejamento de halogênio são geralmente menos preferidos para uso em detergentes enzimáticos.

Os agentes de liberação de peróxido de hidrogênio podem ser usados em combinação com ativadores de alvejamento tal como tetraacetililenodiamina (TAED), nonanoiloxibenzenossulfonato (NOBS, vide, por exemplo, Patente U.S. Nº 4.412.934), 3,5-trimetil-hexanoloxibenzenossulfonato (ISONOBS, vide, por exemplo, EP 120 591) ou pentaacetilglicose (PAG), que são per-hidrolisados para formar um perácido como a espécie de alvejamento ativa, levando a efeito de alvejamento aperfeiçoado. Ainda, muito adequados são os ativadores de alvejamento C8 (6-octanamido-caproil) oxibenzeno-sulfonato, C9 (6-nonanamido caproil)oxibenzenossulfonatos e C10 (6-decanamido caproil)oxibenzenossulfonato ou misturas dos mesmos. Ativadores também adequados são ésteres de citrato acilados

tal como revelado no Pedido de Patente Europeu Nº 91870207.7.

Agentes de alvejamento úteis, incluindo peroxiácidos e sistemas de alvejamento compreendendo ativadores de alvejamento e compostos de alvejamento de peróxido de hidrogênio para uso em composições de limpeza.

5 O peróxido de hidrogênio pode também estar presente através da adição de um sistema enzimático (isto é, uma enzima e um substrato para a mesma) que é capaz de geração de peróxido de hidrogênio no início ou durante o processo de lavagem e/ou enxágue. Tais sistemas enzimáticos são revelados no Pedido de Patente Europeu EP 0 537 381.

10 Agentes de alvejamento outros que não agentes de alvejamento de oxigênio são também conhecidos na técnica e podem ser utilizados aqui. Um tipo de agente de alvejamento de não-oxigênio de interesse particular inclui agentes de alvejamento fotoativados tal como ftalocianinas de zinco e/ou alumínio sulfonadas. Esses materiais podem ser depositados sobre o
15 substrato durante o processo de lavagem. Quando da irradiação com luz, na presença de oxigênio, tal como pendurando as roupas para secar à luz do dia, a ftalocianina de zinco sulfonada é ativada e, conseqüentemente, o substrato é alvejado. Ftalocianina de zinco e processo de alvejamento fotoativado preferidos são descritos na, por exemplo, Patente U.S. Nº
20 4.033.718. Tipicamente, uma composição detergente vai conter cerca de 0,025% a cerca de 1,25%, em peso, de ftalocianina de zinco sulfonada.

Agentes de alvejamento podem também compreender um catalisador de manganês. O catalisador de manganês pode ser, por exemplo, um dos compostos descritos em "Efficient manganese catalysts for
25 low-temperature bleaching", 369 NATURE 637-639 (1994).

5.1.7 Outros componentes

Componentes adicionais que podem ser usados nas composições detergente em várias combinações incluem agentes de suspensão e antirredeposição de sujeira, agentes de liberação de sujeira,
30 abrillantadores óticos, abrasivos, bactericidas, inibidores de mancha, agente colorantes e/ou perfumes encapsulados ou não-encapsulados.

Materiais de encapsulação especialmente adequados são

cápsulas solúveis em água que consistem em uma matriz de polissacarídeo e compostos poliídros.

Outros materiais de encapsulação solúveis em água adequados compreendem dextrinas derivadas de ácido ésteres de amido não-gelatinizado de ácidos dicarboxílicos substituídos (vide, por exemplo, Patente U.S. N° 3.455.838). Tais dextrinas de ácido-éster são, de preferência, preparadas a partir de tais amidos tal como milho ceroso, sorgo ceroso, sagu, tapioca e batata. Exemplos adequados dos ditos materiais de encapsulação incluem N-Lok fabricado pela National Starch. O material de encapsulação N-Lok consiste em um amido de milho modificado e glicose. O amido é modificado através da adição de grupos substituídos monofuncionais tal como anidrido do ácido octenil succínico.

Agentes antirre deposição típicos usados em detergentes incluem colóides geralmente orgânicos, solúveis em água, incluindo, por exemplo, os sais solúveis em água de ácidos carboxílicos poliméricos tal como ácido poliacrílico ou ácido polimaléico ou copolímeros do mesmo, cola, gelatina, sais de ácidos éter carboxílicos ou ácidos éter sulfônicos de amido ou celulose o sais de ésteres de ácido sulfúrico de celulose ou amido. Grupos ácidos contendo poliamidas solúveis em água são também usados como agente antirre deposição. Preparações de amido solúveis e outros produtos de amido diferentes daqueles mencionados acima, por exemplo, amido parcialmente hidrolisado, podem ser também usadas. Carboximetil celulose de sódio, metil celulose, hidroxietil celulose, metil hidroxietil celulose e misturas das mesmas são de preferência usadas. Esses materiais são normalmente usados em níveis de a partir de 0,05% a 10% em peso, com mais preferência de a partir de 0,2% a 8%, com mais preferência de a partir de 0,5% a 6% em peso da composição.

Também compreendido é o uso de abrillantadores óticos. Abrillantadores óticos preferidos são aniônicos em caráter, cujos exemplos são 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2,2'-dissulfonato de dissódio; 4,4'-bis-(2-morfolin-4-anilino-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2:2'-dissulfonato de dissódio; 4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-

ilamino) estilbeno-2,2'-dissulfonato de dissódio; 4',4"-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ilamino) estilbeno-2-sulfonato de monossódio; (4,'4-bis-(2-anilino-4-(N-metil-N-2-hidroxi-etilamino)-s-triazin-6-ilamino)-estilbeno-2,2'-dissulfonato de dissódio; 4,4'-bis-(4-fenil-2,1,3-triazol-2-il)-estilbeno-2,2'-dissulfonato de dissódio; 4,4'-bis(2-anilino-4-(1-metil-2-hidroxi-etilamino)-triazin-6-ilamino)estilbeno-2,2'-dissulfonato de dissódio; 2-(estilbil-4"-(nafto-1',2':4,5)-1,2,3-triazol-2"-sulfonato de sódio; e 4,4'-bis(2-sulfoestiril)bifenila.

Outros materiais poliméricos úteis são os polietileno glicóis, particularmente aqueles de peso molecular de cerca de 1000-10000 Dáltons, mais particularmente cerca de 2000 a 8000 e com mais preferência cerca de 4000. Esses são usados em níveis de a partir de cerca de 0,20% a 5%, com mais preferência de a partir de cerca de 0,25% a 2,5% em peso. Esses polímeros e os sais de policarboxilato homo- ou co-polimérico previamente mencionados são valiosos para melhora da manutenção da brancura, deposição de cinza no tecido e performance de limpeza em sujeiras de argila, proteináceas e oxidáveis na presença de impurezas de metal de transição. Agentes de liberação de sujeira são também compreendidos para uso em composições detergentes e de limpeza propostas. Essas podem incluir copolímeros ou terpolímeros convencionais de ácido tereftálico com unidades etileno glicol e/ou propileno glicol em várias disposições. Exemplos de tais polímeros são revelados nas Patentes U.S. Nºs 4.116.885 e 4.711.730 e EP 0 272 033. Também muito úteis são poliésteres modificados como copolímeros aleatórios de tereftalato de dimetila, sulfoisofталato de dimetila, etileno glicol e 1,2-propanodiol, os grupos finais consistindo em principalmente sulfobenzoato e secundariamente em monoésteres de etileno glicol e/ou 1,2-propanodiol. O alvo é obter um polímero capeado em ambas extremidades por grupos sulfobenzoato, "principalmente", no presente contexto a maioria dos presentes ditos copolímeros vai ser capeada na extremidade por grupos sulfobenzoato. No entanto, alguns copolímeros serão menos do que completamente capeados, e então seus grupos finais podem consistir em monoéster de etileno glicol e/ou 1,2-propanodiol, disto consiste "secundariamente" em tais espécies.

Também compreendido é o uso de agentes de amolecimento em composições detergente. Esses agentes podem ser de tipo inorgânico ou orgânico. Agentes de amolecimento inorgânicos são exemplificados pelas argilas esmectita conforme revelado, por exemplo, na GB-A-1 400898 e na Patente U.S. Nº 5.019.292. Agentes de amolecimento de tecido orgânicos incluem as aminas terciárias insolúveis em água conforme revelado nas GB-A1 514 276 e EP 0 011 340 e sua combinação com sais de amônio mono C_{12} - C_{14} quaternário são revelados na EP-B-0 026 528 e amidas de cadeia dilonga conforme revelado na EP 0 242 919. Outros ingredientes orgânicos úteis de sistemas de amolecimento de tecido incluem materiais de óxido de polietileno de peso molecular alto conforme revelado nas EP 0 299 575 e 0 313 146.

Níveis de argila esmectita estão normalmente na faixa de a partir de cerca de 5% a 15%, com mais preferência de a partir de cerca de 8% a cerca de 12% em peso, com o material sendo adicionado como um componente misturado seco ao restante da formulação. Agentes de amolecimento de tecido orgânicos tal como aminas terciárias insolúveis em água ou materiais amida de cadeia dilonga são incorporados em níveis de a partir de cerca de 0,5% a 5% em peso, normalmente de a partir de cerca de 1% a 3% em peso enquanto os materiais de óxido de polietileno de peso molecular alto e os materiais catiônicos solúveis em água são adicionados em níveis de a partir de cerca de 0,1% a 2%, normalmente de a partir de cerca de 0,15% a 1,5% em peso. Esses materiais são normalmente adicionados à porção seca por pulverização da composição, embora em alguns casos possa ser mais conveniente adicioná-los como uma partícula misturada seca ou pulverizá-los como líquido derretido em outros componentes sólidos da composição.

Outro componente para uso em composições detergente são agentes de inibição de transferência de corante poliméricos. Esses agentes podem ser incluídos nas composições detergentes de a partir de cerca de 0,001% a 10%, de preferência de a partir de cerca de 0,01% a 2%, com mais preferência de a partir de cerca de 0,05% a 1% em peso de agentes de

inibição de transferência de corante poliméricos. Os ditos agentes de inibição de transferência de corante poliméricos são normalmente incorporados a composições detergente a fim de inibir a transferência de corantes de tecidos coloridos para tecidos lavados com os mesmos. Os polímeros têm a habilidade em complexar ou adsorver os corantes fugitivos retirados do tecido antes dos corantes terem a oportunidade de se ligarem a outros artigos na lavagem. Agentes de inibição de transferência de corante poliméricos adequados especialmente adequados são polímeros de N-óxido de poliamida, copolímeros de N-vinil-pirrolidona e N-vinilbenzimidazol, polímeros de polivinilpirrolidona, poliviniloxazolidonas e polivinilimidazóis e misturas dos mesmos. Adição de tais polímeros também aumenta a performance das enzimas de acordo com a invenção.

Será aparente ao versado na técnica que várias modificações e variações podem ser feitas nas composições, compostos e métodos descritos aqui.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Síntese e Purificação de Enzima

A pectato liase de um derivado de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* linhagem 168 foi produzida em *B. subtilis* usando o promotor *aprE* para transcrição eficiente do gene e a sequência de sinal *AprE* para a secreção eficiente da pectato liase no meio de cultura. O gene *pel* foi amplificado a partir do DNA cromossomal (isolado de um derivado de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* linhagem 168 através de técnicas de extração de fenol padrão) através de PCR usando o *iniciador* de oligonucleotídeo avançado, 5'-TTCAGCGAAGACAGCGCGCAGGCAGCTGATTTAGGCCACCAGACGTT G GG-3' (SEQ ID NO: 3) e o *iniciador* reverso 5'-TTTTCAAAGCTTTA ATTTAA TTTACCCGCACCCGCTTGATTT-3' (SEQ ID NO: 4). O *iniciador* avançado funde a sequência de codificação da sequência de sinal *AprE* em estrutura com a sequência de codificação do gene *pel* maduro. O *iniciador* avançado também inclui um sítio de restrição *Bsbl* que após clivagem gera uma sequência protuberante que é compatível com um sítio *BssHII*. O

iniciador reverso introduz um sítio de restrição *HindIII* após o códon de parada da região de codificação do gene *pel*. A reação PCR foi realizada usando polimerase Herculase® (Stratagene, La Jolla, CA) essencialmente conforme recomendado pelo fabricante. O fragmento de aproximadamente

5 1,2 quilobase (kb) foi purificado (Kit de Purificação PCR, Qiagen, Inc., Valencia, CA) e digerido com *BbsI* e *HindIII*. O vetor de expressão, um derivado de p2JM103, foi digerido com *BssHII* e *HindIII*, a faixa de vetor isolada e então ligada ao fragmento de PCR digerido carregando o gene *pel*. O vetor de expressão resultante, p2JM103pel, tem aproximadamente 700 pb

10 do promotor *aprE* e sequência de sinal (vide Ferrari e outros, 170, J.BACT. 170:289-295 (1988); e Henner e outros, 170 J. BACT. 170:296-300 (1988)), começando no sítio *EcoRI* a montante do promotor *aprE* e terminando no sítio *BssHII* que foi introduzido na sequência de sinal *AprE*. O sítio *EcoRI* do fragmento de DNA *aprE* tinha sido clonado no sítio *EcoRI* do plasmídeo

15 integracional pJM103 (Perego, "Integrational vectors for genetic manipulation in *Bacillus subtilis*", em *BACILLUS SUBTILIS AND OTHER GRAM-POSITIVE BACTERIA: BIOCHEMISTRY, PHYSIOLOGY AND MOLECULAR GENETICS*, 615-624 (Sonenshein, Hoch e Losick (eds.), American Society for Microbiology, Washington D.C., 1993). A sequência de DNA do

20 fragmento *aprE* dos sítios de restrição *EcoRI* e *BssHI* é: 5'-GAATTCTCCATTTTCTTCTGCTATCAAATAACAG ACTCGTGATTTTCCA AACGAGCTTTCAAAAAGCCTCTGCCCCTTGCAAATCGGATGCCTGTCT ATAAAATTCCCGATATTGGTTAAACAGCGGCGCAATGGCGGCCGCATCT GATGTCTTTGCTTGGCGAATGTTTCATCTTATTTCTTCCTCCCTCTCAATA

25 ATTTTTTCATTCTATCCCTTTTCTGTAAAGTTTATTTTTCAGAATACTTTTATCATCATGCTTTGAAAAATATCACGATAATATCCATTGTTCTCACGGAA GCACACGCAGGTCATTTGAACGAATTTTTTCGACAGGAATTTGCCGGGA CTCAGGAGCATTTAACCTAAAAAGCATGACATTTTCAGCATAATGAACAT TTAATCATGTCTATTTTTCGTTCTTTTCTGTATGAAAATAGTTATTTTCGAGT

30 CTCTACGGAAATAGCGAGAGATGATATACCTAAATAGAGATAAAATCATCTCAAAAATGGGTCTACTAAAATATTATTCCATCTATTACAATAAATTCA CAGAATAGTCTTTTAAGTAAGTCTACTCTGAATTTTTTTAAAAGGAGAGG

GTAAAGAGTGAGAAGCAAAAATTGTGGATCAGCTTGTTGTTTGCCTTA
 ACGTTAATCTTTACGATGGCGTTCAGCAACATGAGCGCGC-3' (SEQ ID
 NO: 5). A extremidade 3' do gene *pel* foi clonada a montante do terminador
 LAT (do gene de α -amilase de *Bacillus licheniformis*, Yuuki e outros, 98, *J.*
 5 *Biochem.*, (Tóquio) 1147-56 (1985)) usando um sítio *Hind*III que tinha sido
 introduzido na extremidade 5' do terminador. A extremidade 3' do terminador
 LAT tinha sido clonada no sítio *Hind*III do plasmídeo pJM103 como um
 oligonucleotídeo de modo que o sítio *Hind*III original no plasmídeo foi
 eliminado após ligação. A sequência de DNA da região de terminador LAT
 10 do sítio *Hind*III para o sítio *Hind*III morto em pJM103 é:
 5'-AAGCTTAACTCGAGGTTAACAGAGGACGGATTCCTGAAGGAAATCC
 GTTTTTTT ATTTTAAATTAAGAGCTT-3' (SEQ ID NO: 6).

Para construir o hospedeiro de produção, pJM103pel foi usado
 para transformar BG3594comK de *B. subtilis* (*degU^{Hy}32*, *oppA*, Δ *spolIE*,
 15 Δ *aprE*, Δ *npRE*, *amyE::xyIRPxyIAcomK-phleo*). Células competentes foram
 feitas através da indução com xilose do gene *comK* dirigida pelo promotor
xyIA (Hahn e outros, 21 MOL. MICROBIOL. 763-75 (1996)). Transformantes
 foram selecionados em placas de ágar de Caldo Luria com 5 μ g/mL de
 cloranfenicol e colônias selecionadas foram serialmente posta em linhas em
 20 placas de ágar de Caldo Luria com 25 μ g/mL de cloranfenicol até que
 crescimento de colônia rápido foi obtido a fim de selecionar clones com
 números de cópia de gene maiores. Para a produção de *pel*, culturas foram
 cultivadas em fermentadores de 14L.

Produção de pectato liase é baseada em parte em fermentação,
 25 recuperação e formulação de *Bacillus* conhecidas na técnica, e pode ser
 ajustada consequentemente.

Para crescer em inócuo, caldo Luria-Bertoni (LB) foi
 suplementado com glicose 1% e 25 ppm de antibiótico cloranfenicol (usado
 como um marcador de cepa) foram adicionados ao caldo. Meios ricos em
 30 nutriente similares podem substituir o caldo LB. O meio foi semeado com
 células que tinham sido congeladas em um estoque de glicerol em um banho
 de nitrogênio líquido. A semente foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 2L

contendo 600 mL do meio preparado, agitados a 200 rpm a 37° C. O inócuo culturado foi então transferido para um fermentador quando a densidade óptica (OD) a 550 nm era cerca de 1. O fermentador é alimentado com componentes do meio nas concentrações providas abaixo com base em 0+ (tamanho da batelada apos transferência do inócuo).

Matéria-prima	Concentração (g/kg 0+)
Farinha de soja	140,0
KH ₂ PO ₄	5,4
NaH ₂ PO ₄ aq.	10,7
Ácido Cítrico	0,13
FeCl ₃ ·6aq	0,09
MnCl ₂ ·4aq	0,06
MgSO ₄ ·7aq	4,0
Antiespumante	2,0
Enzimas Celulase, hemicelulase, pectina	2,0
Glicose	5,0

Meio de fermentação foi tratado com misturas industriais de celulases, hemicelulases e pectinases, conforme indicado na tabela acima, para tornar a solução menos viscosa. Para alimentar a batelada, 600 g de glicose por kg de solução esterilizada foram usados. Níveis de glicose e oxigênio dissolvido (DO) em excesso limitados foram mantidos até coleta. Solução de amônia foi usada para controlar o pH em 7,4. O fermentador foi esfriado para manter a temperatura em 37°C. Tempo de fermentação total foi de 36 horas.

Após coleta, o caldo de fermentação foi esfriado. O caldo foi então tratado com sais e floculantes e filtrado para remover células. O material foi então ultrafiltrado para concentrar a pectato liase. A pectato liase concentrada foi formulada para pH 6,25 com os estabilizadores de propileno glicol 40% e Proxel 0,25%.

Pectato liase concentrada foi administrada em um gel Bis-Tris 4-

12% NuPAGE com tampão de administração MES. Um peso molecular padrão Mark12 (MW) foi administrado com as amostras (faixas 1 e 10). A Figura 6 mostra o gel. A faixa 2 tem 2,5 µg de proteína total de albumina de soro bovino (BSA) (controle). A faixa 3 tem 5 µg de BSA. A faixa 4 tem pectato liase concentrada obtida como acima descrito em uma concentração de 5 µg por faixa e conforme diluído com HCl. A faixa 5 tem pectato liase concentrada obtida conforme descrito acima em uma concentração de 5 µg por faixa e como diluída com água deionizada (DI). A faixa 6 tem 5 µg das Novozymes Bioprep 3000L. A faixa 7 tem 10 µg de BSA. A faixa 8 tem 10 µg de pectato liase obtida conforme acima descrito e conforme diluído com HCl. A faixa 9 tem 10 µg da Novozymes Bioprep 3000L.

Exemplo 2

Caracterização de Pectato Liase

Performances de remoção de pectina da pectato liase de *B. subtilis* (SEQ ID NO: 1) foram comparadas com a pectato liase comercialmente disponível, Bioprep 3000L (Novozymes), sob as condições que seguem.

Pectato Liasas	Proteína Total* mg/mL	Proteína TCA* (mg/mL)
Exp. Pectato liase de <i>B. subtilis</i> do Exemplo 1	87,8	53,4
Bioprep 3000L (Novozymes)	44,0	35,5

*** Os resultados são calculados com base em uma conversão de 6,35 g de proteína/g de nitrogênio. Adicionalmente, os resultados são uma estimativa de proteína total.

Materiais. O substrato utilizado era Army Carded Cotton Sateen, tecido sem cola mas não alvejado da Testfabrics (Estilo N°. 428). Pectato liase de *B. subtilis* do Exemplo 1 e pectato liase Novozymes Bioprep 3000L foram utilizadas a 2 ppm de proteína total. Tampão BIS-TRIS propano 50 mM (BTP) em vários pH's foi analisado. O tampão foi ajustado usando HCl. Corante Vermelho de rutênio 0,005% em uma solução tampão de fosfato 50

mM (pH 6,0) foi usado.

Procedimentos. Para realizar os perfis de pH e temperatura, o que segue foi realizado. Perfis de pH e temperatura preliminares de remoção de pectina pelas enzimas foram obtidos através de incubação de pedaços de
5 15,88 mm (5/8 polegadas) de discos de tecido de algodão (Testfabrics style N°. 428) em uma placa de microtitulação de 12 poços. Volume total de 2 mL de tampão BTP/HCl e enzima foi adicionado a cada poço de placa de microtitulação de 12 poços junto com um disco de tecido. Após vedação da placa firmemente com um vedante de placa, a placa de 12 poços foi posta
10 no agitador de incubadora e incubada por 60 minutos sob temperaturas alvo a 250 rpm. Os discos foram enxaguados completamente com água deionizada. Após enxágue, 1,5 mL de corante Vermelho de rutênio 0,05% em tampão de fosfato de sódio 50 mM em pH 6 foi posto em cada poço contendo um disco de tecido. A placa foi então incubada novamente no
15 agitador de incubadora por 15 minutos a 250 rpm. Os discos de tecido foram então tirados da solução de corante Vermelho de rutênio e enxaguados com água deionizada e secos ao ar.

Para quantificar remoção de pectina pelas enzimas, valores CIE*L de cada disco de tecido tingido foram medidos suando um
20 espectrofotômetro (Minolta CR-200).

A pectato liase de *B. subtilis* do Exemplo 1 e Bioprep 3000L foram também testadas quanto à sua atividade de resposta de dose em remoção de pectina usando um Launder-Ometer. Para checar a eficácia de remoção de pectina, três retalhos de 10,16 cm por 7,62 cm (4 polegadas por
25 3 polegadas) de tecido Army Carded Cotton Sateen (estilo Testfabrics N° 428, sem cola mas não alvejado) foram tratados em um Launder-Ometer a 55°C por 20 minutos em pH 7,5 em tampão de BTH/HCl 50 mM para a pectato liase do Exemplo. Bioprep 3000L foi testada com retalhos equivalentes em BTH/HCl 50 mM em um pH 8,2.

30 Após incubação, todos os retalhos de tecido foram enxaguados completamente com água e então secos ao ar antes de tingimento com vermelho de rutênio. Três discos de tecido de 15,88 mm (5/8 polegadas)

foram cortados de cada um dos retalhos de tecido tratados. Esses discos foram então tingidos com corante Vermelho de rutênio 0,05%. Tingimento foi realizado em solução de fosfato de sódio 50 mM, em pH 6. Remoção de pectina de cada tratamento foi quantificada de acordo com os procedimentos descritos acima para os perfis de pH e temperatura.

Resultados. Remoção de pectina em perfis de pH e temperatura preliminares é provida na Figura 2. Remoção de pectina foi medida através de tingimento com corante vermelho de rutênio. Performance de remoção de pectina usando a pectato liase de *B. subtilis* demonstrou um perfil de temperatura amplo e faixa de pH ótimo de cerca de 6 a 8 conforme mostrado na Figura 1. O valor de CIE*L menor indica ligação de pectina maior. Ligação de pectina indica uma performance de remoção de pectina menor pela enzima. Outros ensaios de limpeza podem ser usados, tal como aquele descrito em Arne Solbak e outros, "Discovery of pectin-degrading enzymes and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric", 280, J. BIOL. CHEM. 9431-9438 (2005).

A pectato liase do Exemplo 1 foi também testada quanto à sua resposta de dose de remoção de pectina usando um Launder-Ometer. Os resultados são mostrados na Figura 3.

Para comparar eficácias de remoção de pectina da pectato liase de *B. subtilis* e pectato liase Novozymes Bioprep 3000L, experimentos foram realizados como segue. Três pedaços de 10,16 cm por 7,62 cm (4 polegadas por 3 polegadas) de tecido Army carded cotton sateen sem cola (Testfabrics, estilo N° 428) foram tratados com concentrações variadas de pectato liase a 55°C por 20 minutos em um Launder-Ometer. Para comparar as pectato liases sob seu pH ótimo, o pH de 7,5 foi usado para a pectato liase GCOR e um pH de 8,2 foi usado para a Bioprep 3000L. Após o tratamento de 20 minutos, os retalhos de tecido foram completamente enxaguados com água deionizada e secos ao ar. Os discos de 15,88 mm (5/8 polegadas) foram cortados de cada retalho de tecido, e os discos de tecido foram tingidos com corante Vermelho de rutênio 0,05% para quantificar remoção de pectina conforme previamente descrito.

A pectato liase do Exemplo 1 foi também avaliada quanto à estabilidade de peróxido a 25°C e 55°C. Atividade de pectato liase aumentou na temperatura menor de 25°C sobre sua atividade na temperatura maior e sobre a atividade de Bioprep 3000L. Atividade de pectato liase foi medida usando ácido poligalacturônico 0,2% (p/v) em tampão de Tris/HCl 25 mM, glicina/NaOH 25 mM, pH 9. Atividade foi determinada medindo um aumento linear em absorbância a 235 nm por 5 minutos usando um espectrofotômetro. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de proteína que produziu 1 μmol de oligogalacturonidas insaturadas/minuto, que é equivalente a 1 μmol de digalacturonida insaturada, usando um coeficiente de extinção molecular para o dímero de 4600 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ a 235 nm. Concentração de proteína foi determinada medindo absorbância a 280 nm, usando um coeficiente de extinção baseado na sequência de aminoácido da pectato liase do Exemplo 1. Atividade específica foi determinada como unidades/mg de pectato liase purificada. O ensaio de atividade de pectato liase é conforme descrito em Arne Solbak e outros, "Discovery of pectin-degrading enzymes and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric", 280, J. BIOL. CHEM., 9431-9438 (2005). Estabilidade de enzima na presença de quantidades grandes de peróxido foi avaliada usando o ensaio de atividade de pectato liase conforme descrito. Os resultados do teste são mostrados nas Figuras 4A e 4B.

A pectato liase do Exemplo 1 foi também testada quanto à sua estabilidade enzimática na presença do quelante, EDTA, usando o ensaio de atividade de pectato liase conforme descrito por Solbak e outros (2005). Composições de lavagem de preferência não têm cátions divalentes tal como cálcio. No entanto, a presença de cátions é frequentemente requerida para atividade enzimática ótima. A Figura 5 mostra que houve pouca perda de atividade enzimática da pectato liase do Exemplo 1 quando comparado entre amostras com e sem EDTA em temperatura ambiente. No entanto, houve perda significativa de função da enzima quando a temperatura foi levada para 55°C comparado com as outras enzimas testadas.

Com base nos resultados, outro aspecto compreende tomar a pectato liase purificada do Exemplo 1 e tratá-la com um peróxido, tal como peróxido de hidrogênio durante recuperação para produzir um produto de pectato liase com atividade significativamente maior do que a pectato liase não-tratada. Por exemplo, com tratamento de peróxido de hidrogênio a pectato liase pode obter um ganho de 10% em atividade específica. A pectato tratada pode então ser usada nas várias composições e processos de uma etapa descritos no pedido.

Exemplo 3

A pectato liase do Exemplo 1 foi formulada com propileno glicol (40%), Proxel (0,25%) (1,2-benzisotiazolin-3-ona) e em um pH de $6,25 \pm 0,1$ usando ácido acético. O ensaio foi realizado a 37°C para uma incubação de 20 minutos. A medição de ponto final foi realizada usando um tampão de glicina com CaCl_2 e um substrato de ácido poligalacturânico.

15

Pectato Liase Ferm.	Ensaio vol. (μL)	OD@235 nm em pH 10	Cego 210	OD@235 nm Final pH 10	APSU em pH 10	APSU/mL de amostra
20040772 UFC	500	0,712	0,124	0,588	0,137458362	91638,91
20040773 UFC	500	0,613	0,124	0,489	0,116094893	77396,6
20040772 Final	500	0,336	0,124	0,212	0,056320337	37546,89
20040773 Final	500	0,467	0,124	0,343	0,08458917	56392,78
20040396 caldo integral	500	0,415	0,124	0,291	0,073367954	24455,98
20040397 caldo integral	500	0,3055	0,124	0,1815	0,049738662	16579,55

A APSU/mL final é calculada usando a fórmula que segue:

$\text{APSU/mL em amostra} = \text{APSU/mL da curva padrão} \times K \times F/a,$

onde K é o fator de diluição pelo qual a amostra é diluída; F é 2; como

mistura 1:1 de mistura de enzima e substrato é usada; a é o volume pipetado de amostra de enzima antes da diluição em mL. Uma vez conhecida a densidade de amostras, as unidades de APSU/mL podem ser convertidas para APSU/g. Esses cálculos são baseados na amostra Bioprep 3000L tendo 3000 APSU/g e uma curva padrão foi gerada a partir desta amostra. A curva padrão da amostra de Bioprep 3000L tinha uma inclinação de 0,215793, uma interceptação de 0,010572 e um RSQ de 0,9982. Se a atividade for perdida durante longo armazenamento da enzima, diga-se 10 vezes, de modo que Bioprep 3000L tem apenas 300 APSU/g, então todos os números de atividade nas amostras contendo a pectato liase de *B. subtilis* vão também diminuir 10 vezes. Este ensaio de ponto final requer um padrão com atividade conhecida para medir atividade de amostras desconhecidas.

Exemplo 4

Composições de Limpeza Compreendendo Pectato Liase e Atividade

Pectato liase de *B. subtilis* exibiu limpeza de várias sujeiras contendo carboidrato em condições de lavagem Norte-americana. A pectato liase do Exemplo 1 foi testada em detergente líquido de limpeza pesada (HDL) padrão AATCC e detergente líquido Purex comercial da Dial em máquinas de lavar de carregamento por cima em escala integral e Tergotômetro de escala pequena em concentrações de subpartes por milhão. Performance de limpeza de pectato liase foi comparada contra amilases de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus sp. 707*.

Testes foram realizados em duas escalas de máquina, um Tergotômetro (United States Testing Co. Inc., Hoboken, NJ, USA) e uma máquina de lavar americana de carregamento por cima (modelo Kenmore Elite 110.26962503, Sears Roebuck e Co., Hoffman Estates, IL, USA). Retalhos manchados foram obtidos do Center for Testmaterials BV (CFT, Vlaardingen, Países Baixos), EMPA Testmaterials AG (St. Gallen-Winkeln, Suíça) e Warwick-Equest (Consett, Reino Unido). Manchas técnicas antigas adquiridas de CFT e EMPA eram Cacau CFT CS-2, Tomate CFT CS-20, Molho de Salada com Natural Black CFT CS-6, Sorvete de Chocolate EMPA 160, Amido em algodão EMPA 161, mingau EMPA 163 e Grama EMPA 164.

Tecido manchado fresco testado da Warwick-Equest foram grama esfregada e painéis multissujos 4 x 4 consistindo em várias manchas contendo carboidrato incluindo Bagas Misturadas, Sopa de Tomate, Molho de Pasta Tradicional Ragu, Mistura de Curry, Queijo C&G e Comida de Bebê de 5 Brócolis, Molho de Vegetal e Peru Heinz, Mostarda de Coleman, Molho de Carne da Coleman, Molho de Carne Bisto, Cereal de Cacau da Kellogg's, Banana Fresca, Azeitonas Pretas, Molho HP BBQ, Molho Marrom HP, Chilli com Carne Homeprime, Ketchup de Tomate, Sorvete de Morango, Pasta de Chocolate Nutella, Páprica Schwartz, Molho de Pimenta Econa Hot, 10 Cassarola de Linguiça da Coleman, Doplaza da Patak, Vindaloo da Patak, Madras da Uncle Bens, Milkshake de Chocolate Friij, Uvas do monte Pec, Suco de Groselha Preta JW, Geléia de Cereja Preta da Robertson, Comida para bebê de Maçã e Banana Heinz, Cassarola de Carne da Coleman, Comida para Bebê Pudim de Chocolate Heinz, Mousse de Chocolate da 15 Cadbury, Marmelada de Arando da St. Dalfour, Recheio de Torta de Cereja Vermelha da Morton, Ameixas Frescas, Ameixas Secas Asda, Ketchup de Curry Asda, Maçã, Laranja, Banana, Comida para Bebê Rusk, Molho de Tomate Seco ao Sol Heinz, Milkshake de Morango Friij, Suco de Vegetal V8, Chá, Café, Vinho Tingo Merlot, Raiz de beterraba da Baxter, Suco de Uva 20 Púrpuro da Welch, Amora Silvestre J. West, Tomate Cortado em Pequenos Pedaçõs Napolina, Tikka Homepride e Tinta QuinkBlue. Cada mancha foi medida antes e após tratamento através de refletância óptica usando um Reflectômetro Minolta CR-400 para a multimancha e CR-410 para as sujeiras técnicas. A diferença nos valores L, a, b foi convertida ara diferença 25 de cor total (dE), conforme definido pelo espaço de cor CIE-LAB. Limpeza das manchas são expressas como índice de remoção de mancha percentual (%SRI) tomando uma razão onde a diferença de cor entre a mancha inicial e mancha limpa é dividida pela diferença de cor entre a mancha inicial e o tecido não-manchado. Tipicamente 9 réplicas foram testadas em escala 30 tergotômetro, retalhos em triplicata foram administrados em potes em triplicata, enquanto 8 réplicas foram testadas em escala integral, retalhos em quadruplicata em máquinas em duplicata.

Experimentos de limpeza em pequena escala foram conduzidos em um Tergotômetro. Aproximadamente 1 L de água de osmose reversa Milli-Q foi adicionado a cada pote ao qual 1,5 g/L de detergente líquido AATCC HDL WOB 2003, HEPES 5 mM pH 8,0 e dureza da água de 6 grãos por galão (em uma razão de Ca:Mg 3:1) foi também adicionado e temperatura foi deixada equilibrar para 25°C (77°F). O volume da solução foi ocasionalmente ajustado para manter 40 g de tecido por litro de líquido de lavagem quando os 3 retalhos multimanha adicionados a cada pote excederam 40 g. Enzima e manchas foram adicionadas imediatamente antes do início da lavagem, que foi agitada a 100 rpm por 12 minutos a 25°C (77°F). Seguindo a limpeza, os retalhos foram enxaguados por 3 minutos em água da torneira, centrifugados para remover água em excesso e deixados secar ao ar da noite para o dia. Remoção de sujeira foi avaliada através de reflectometria conforme acima descrito e expressa como índice de remoção de sujeira percentual (%SRI). Dados são também representados em delta %SRI, onde a %SRI do tratamento controle, detergente sozinho, é subtraída dos tratamentos com enzimas.

Limpeza em escala integral foi conduzida em um estojo de lavagem Kenmore Elite Kinz size para Ultra Clean Cycle (15 min), carga pequena (48 L), Autotem Frio/Frio, um enxágue, agitação lenta e centrifugação rápida. Ou 1,5 g/L de detergente líquido de limpeza pesada AATCC WOB 2003 e HEPES 5 mM pH 8,0 ou 1,5 g/L de detergente líquido Purex foi adicionado junto com dureza de água de 6 grãos por galão (em uma razão de Ca:Mg de 3:1), enquanto a máquina de lavar enchia. A temperatura foi controlada para 21,11°C (70°F) através de adição de água quente ou gelo, conforme necessário, uma vez a máquina tendo terminado de encher. Enzimas, retalhos sujos e cascalho foram então adicionados à máquina e o ciclo foi deixado prosseguir. Após o ciclo de limpeza estar completo retalhos foram deixados secar ao ar da noite para o dia. Remoção de sujeira foi avaliada através de reflectometria e expressa como índice de remoção de sujeira percentual (%SRI) e %SRI delta, conforme acima descrito.

A pectato liase de *Bacillus subtilis* provou ser eficaz na limpeza de muitas sujeiras relevantes para o consumidor frescas bem como sujeiras técnicas envelhecidas (vide Figuras 7-12). A contribuição para limpeza pela pectato liase é muito mais pronunciada no HDL AATCC em pH 8,0 do que em detergente líquido Purex em pH 9,6. Ela mostrou limpeza significativa abaixo de 0,5 ppm, mostrou limpeza sozinha e exibiu sinergia com amilase em limpeza de algumas das sujeiras não atribuída a efeitos aditivos de combinação das enzimas.

Todas as referências descritas acima são aqui incluídas em sua totalidade para todos os propósitos.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de biolimpeza compreendendo uma pectato liase de *Bacillus subtilis* purificada em uma solução aquosa, onde a pectato liase tem a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ou 95% de identidade com ela.

2. Composição de biolimpeza da reivindicação 1, compreendendo ainda um sistema de alvejamento enzimático ou um agente de alvejamento químico.

3. Composição de biolimpeza da reivindicação 2, onde o agente de alvejamento químico é um alvejante oxidativo, peróxido de sódio, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, dicloroisocianurato de sódio ou combinação dos mesmos.

4. Composição de biolimpeza da reivindicação 1, compreendendo ainda um agente de retirada de cola.

5. Composição de biolimpeza da reivindicação 1, compreendendo ainda um agente de biopolimento.

6. Composição de biolimpeza da reivindicação 1, compreendendo ainda um corante.

7. Composição de biolimpeza da reivindicação 1, compreendendo ainda um agente de biopolimento e um corante.

8. Composição de biolimpeza da reivindicação 2, compreendendo ainda um agente de retirada de cola.

9. Composição de biolimpeza da reivindicação 2, onde o sistema de alvejamento enzimático compreende uma fonte de éster, uma perhidrolase e uma fonte de peróxido de hidrogênio.

10. Composição de biolimpeza da reivindicação 1, compreendendo ainda uma segunda enzima selecionada do grupo consistindo em pectinase, uma cutinase, uma celulase, uma hemicelulase, uma protease, uma lipase, uma amilase e combinações das mesmas.

11. Composição de tratamento de uma etapa para tratamento de têxteis compreendendo:

(a) uma pectato liase obtida de *Bacillus subtilis* tendo um peso molecular

de cerca de 43 kD, um pI de cerca de 7,3 sob condições de SDS-PAGE de redução e um pH ótimo de cerca de 5,0 a cerca de 11,0;

(b) uma ou mais enzimas de retirada de cola; e

(c) um ou mais agentes de alvejamento químicos e/ou sistema de alvejamento enzimático.

12. Composição de tratamento de uma etapa de acordo com a reivindicação 11, compreendendo uma segunda enzima selecionada do grupo consistindo em uma segunda pectinase, uma cutinase, uma celulase, uma hemicelulase, uma protease, uma lipase e uma combinação das mesmas.

13. Composição de tratamento de uma etapa de acordo com a reivindicação 11, compreendendo ainda um ou mais componentes auxiliares, onde o dito componente auxiliar é um tensoativo, um emulsificante, um agente de quelação e/ou um estabilizador ou uma combinação dos mesmos.

14. Composição de tratamento de uma etapa de acordo com a reivindicação 11, compreendendo ainda um ativador de alvejamento.

15. Composição de tratamento de uma etapa de acordo com a reivindicação 11, onde o agente de alvejamento químico é um alvejante oxidativo, peróxido de sódio, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, dicloroisocianurato de sódio ou uma combinação dos mesmos.

16. Composição de tratamento de uma etapa de acordo com a reivindicação 13, onde o dito tensoativo é um tensoativo não-iônico, um tensoativo aniônico, um tensoativo catiônico, um tensoativo zwitteriônico ou uma combinação dos mesmos.

17. Método para limpeza e alvejamento de um têxtil compreendendo contato do têxtil por uma duração de tempo e sob condições adequadas para permitir branqueamento do têxtil com uma solução aquosa compreendendo um agente de alvejamento químico ou sistema de alvejamento enzimático e uma pectato liase obtida de *Bacillus subtilis* tendo um peso molecular de cerca de 43 kD, um pI de cerca de 7,3 sob condições de SDS-PAGE de redução e um pH ótimo de cerca de 5,0 a 11,0.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, onde as condições adequadas compreendem um pH que é entre cerca de 6 e cerca de 8.

19. Método de acordo com a reivindicação 17, onde as ditas
5 condições adequadas compreendem uma duração de tempo entre cerca de 2 minutos e 24 horas.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, onde a duração de tempo está entre cerca de 15 minutos e 12 horas.

21. Método de acordo com a reivindicação 19, onde a duração
10 de tempo está entre cerca de 30 minutos e 6 horas.

22. Método de acordo com a reivindicação 17, onde as ditas condições adequadas compreendem uma temperatura entre cerca de 15°C e 95°C.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, onde a
15 temperatura está entre cerca de 20°C e 80°C.

24. Método de acordo com a reivindicação 22, onde a temperatura está entre cerca de 25°C e 60°C.

25. Método de acordo com a reivindicação 17, onde o agente de alveamento químico é peróxido de hidrogênio e está presente em uma
20 concentração entre cerca de 100 ppm a 5000 ppm.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, onde o agente de alveamento químico é peróxido de hidrogênio e está presente em uma concentração entre cerca de 500 ppm e 4000 ppm.

27. Método de acordo com a reivindicação 25, onde o agente de alveamento químico é peróxido de hidrogênio e está presente em uma
25 concentração entre cerca de 1000 ppm e 3000 ppm.

28. Método de acordo com a reivindicação 17, onde as condições adequadas compreendem um pH de cerca de 6 a 8, uma duração de tempo de cerca de 2 minutos a 24 horas, uma temperatura de cerca de
30 25°C a 60°C e onde o agente de alveamento químico é peróxido de hidrogênio e está presente em uma quantidade de cerca de 1000 ppm a 3000 ppm.

29. Método para processamento de uma etapa de têxteis compreendendo:

- (a) provisão de uma composição de processamento têxtil de uma etapa e um têxtil com necessidade de processamento, e onde a dita composição de processamento têxtil de uma etapa compreende uma pectato liase obtida de *Bacillus subtilis* tendo um peso molecular de cerca de 43 kD, um pI de cerca de 7,3 sob condições de SDS-PAGE de redução e um pH ótimo de cerca de 6,0 a 8,0;
- (b) contato do dito têxtil com a dita composição de processamento de têxtil de uma etapa por uma duração de tempo e sob condições suficientes para permitir retirada de cola, limpeza e alvejamento do têxtil.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, onde a composição de processamento de têxtil de uma etapa compreende ainda:

- (a) uma ou mais enzimas de biolimpeza;
- (b) um ou mais agentes de alvejamento químicos e/ou sistemas de alvejamento enzimático; e
- (c) um ou mais agentes de retirada de cola.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, onde a enzima de biolimpeza é uma pectinase, uma cutinase, uma protease, uma celulase, uma hemicelulase, uma lipase ou uma combinação das mesmas.

32. Método de acordo com a reivindicação 30, onde o agente de retirada de cola é uma amilase, uma celulase, uma mananase ou uma combinação das mesmas.

33. Método de acordo com a reivindicação 29, onde a composição de processamento de têxtil de uma etapa compreende ainda um componente auxiliar selecionado do grupo consistindo em um tensoativo, um emulsificante, um agente de quelação, um estabilizante ou uma combinação dos mesmos.

34. Método de acordo com a reivindicação 30, onde o agente de alvejamento químico é um alvejante oxidativo, peróxido de sódio, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, dicloroisocianurato de sódio ou combinações dos mesmos.

35. Método de acordo com a reivindicação 29, onde o dito têxtil compreende um material celulósico ou contendo celulósico.

36. Método de acordo com a reivindicação 35, onde o dito material celulósico ou contendo celulósico compreende algodão.

5 37. Método de acordo com a reivindicação 29, onde a composição de processamento de têxtil de uma etapa compreende ainda um corante.

38. Método de acordo com a reivindicação 29, onde as ditas condições suficientes para permitir biolimpeza, bioalveamento e retirada de cola estão em uma temperatura entre cerca de 15 e 65°C, um pH de cerca
10 de 6 a 8, por um tempo entre cerca de 2 minutos e 24 horas.

39. Método para preparação de têxtil compreendendo submeter o dito têxtil à biolimpeza e bioalveamento simultâneos ou sequenciais, onde a dita etapa de limpeza compreende contato do dito têxtil com uma
15 composição aquosa compreendendo uma pectato liase de *Bacillus subtilis* tendo um peso molecular de cerca de 43 kD, um pI de cerca de 7,3 sob condições de SDS-PAGE de redução, e um pH ótimo de cerca de 6,0 a 8,0, e onde o dito contato acontece sob condições adequadas para biolimpeza.

40. Método de acordo com a reivindicação 39, onde as etapas
20 de limpeza e alveamento acontecem simultaneamente.

41. Método de biolimpeza e tingimento de um têxtil compreendendo:

(a) preparação de uma solução aquosa compreendendo uma pectato liase de *B. subtilis* tendo um peso molecular de cerca de 43 kD, um pI de
25 cerca de 7,3 sob condições de SDS-PAGE de redução e um pH ótimo de cerca de 6,0 a 8,0, e onde a dita pectato liase está presente em uma quantidade de cerca de 10 a 500 mol/min/kg de têxtil em um pH de cerca de 6 a 8 e uma temperatura de cerca de 20°C a 40° e tendo menos do que 2 mM de cátions divalentes;

30 (b) incubação do têxtil na solução aquosa por um tempo suficiente para biolimpeza; e

(c) suplementação da solução aquosa com um sistema de tingimento e

incubação do têxtil por um tempo suficiente para obter têxtil tingido.

42. Composição detergente compreendendo:

- (a) um tensoativo;
- (b) uma pectato liase de *B. subtilis* tendo um peso molecular de cerca de 43 kD, um pI de cerca de 7,3 sob condições de SDS-PAGE de redução, e um pH ótimo de cerca de 6,0 a 8,0, e
- (c) opcionalmente um aditivo de detergente onde o dito candidato a detergente é um *builder*, um agente de alvejamento químico, um agente antiespumante, um abrasivo, um agente de suspensão, um agente de liberação de sujeira, um bactericida, um lubrificante ou uma combinação dos mesmos.

43. Composição detergente de acordo com a reivindicação 42, compreendendo ainda uma enzima hemicelulase selecionada do grupo consistindo em: xilanase, arabinofuranosidase, acetil xilano esterase, glucuronidase, esterase de ácido ferúlico, esterase de ácido coumárico, endo-galactanase, mananase, lichenase, endo-arabinase, exo-arabinase, exo-galactanase ou uma combinação das mesmas.

44. Composição detergente de acordo com a reivindicação 42, compreendendo ainda uma protease, uma celulase, uma lipase ou uma combinação das mesmas.

45. Método para limpeza de um têxtil compreendendo exposição de um têxtil com necessidade de limpeza a uma composição detergente compreendendo:

- (a) um tensoativo;
- (b) uma pectato liase de *B. subtilis* tendo um peso molecular de cerca de 43 kD, e um pI de cerca de 7,3 sob condições de SDS-PAGE de redução; e
- (c) opcionalmente um aditivo detergente onde o dito candidato a detergente é um *builder*, um agente de alvejamento químico, um agente antiespumante, um abrasivo, um agente de suspensão, um agente de liberação de sujeira, um bactericida, um lubrificante ou uma combinação dos mesmos.

46. Método de acordo com a reivindicação 45, onde a dita

composição detergente compreende ainda uma protease, uma celulase, uma lipase ou combinações das mesmas.

47. Método para limpeza de uma superfície dura compreendendo tratamento de uma superfície dura com uma solução de limpeza compreendendo uma pectato liase de *Bacillus subtilis* purificada.

48. Método de biolimpeza de um têxtil compreendendo:

- (a) preparação de uma solução aquosa compreendendo uma pectato liase de *Bacillus subtilis* em uma solução aquosa, onde a pectato liase tem a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ou 95% de identidade com ela; e
- 10 (b) incubação do têxtil na solução aquosa por um tempo suficiente para biolimpeza.

49. Método de biolimpeza de um têxtil compreendendo:

- (a) preparação de uma solução aquosa compreendendo uma pectato liase de *Bacillus subtilis* em uma solução aquosa, onde a pectato liase tem a
- 15 sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 ou 95% de identidade com ela;
- (b) e suplementação da solução aquosa com uma enzima de retirada de cola; e
- (c) incubação do têxtil na solução aquosa por um tempo suficiente para biolimpeza e retirada de cola.

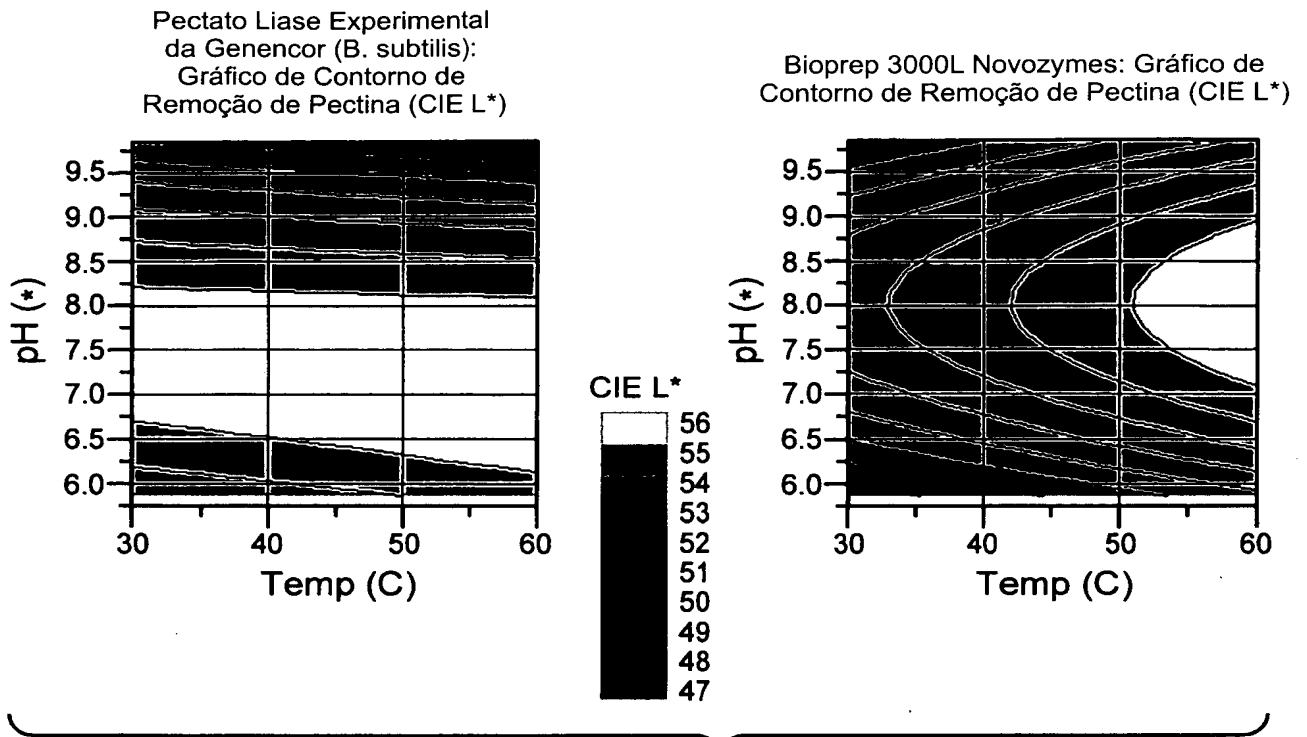


FIG. 1

Resposta de Dose de Remoção de Pectina
(Quantificada pelo Tingimento com vermelho de rutênio)

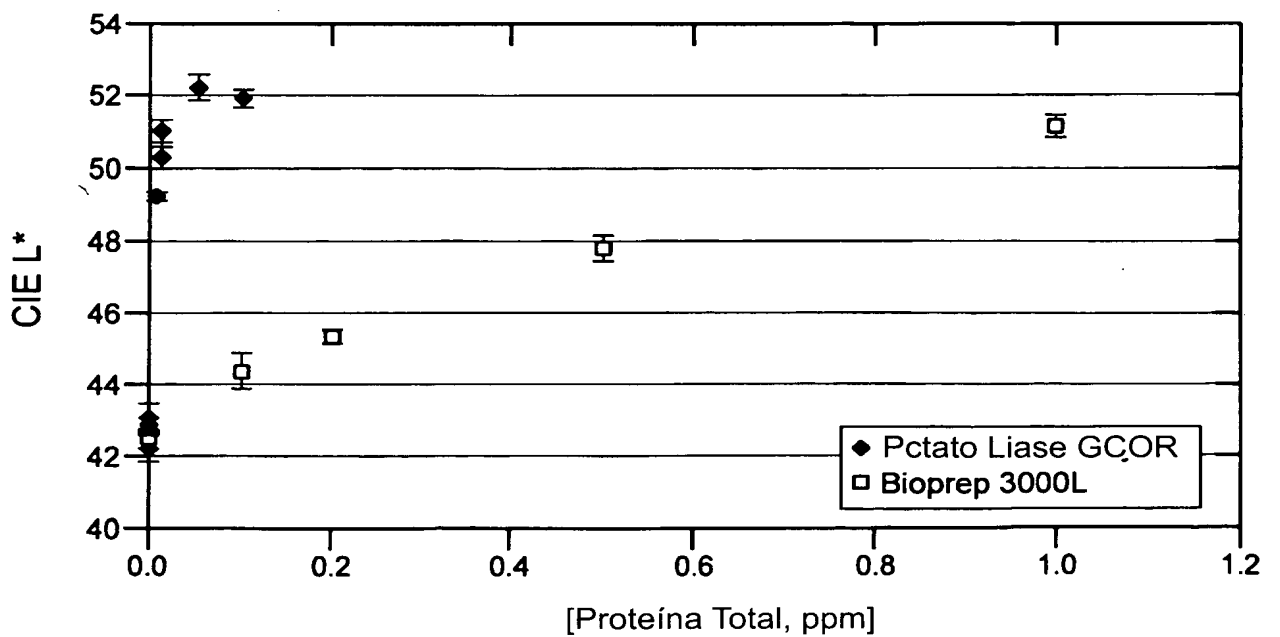
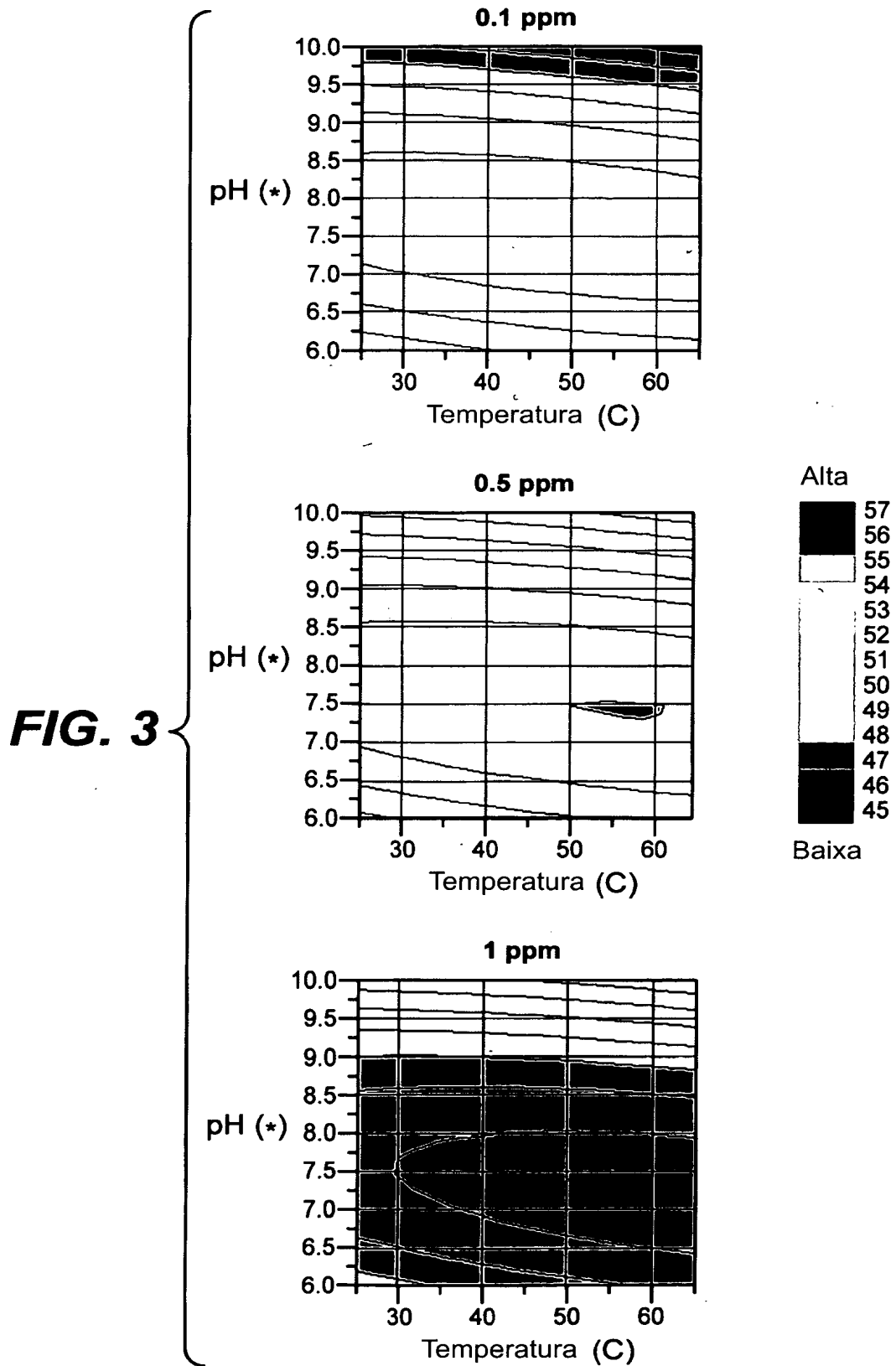


FIG. 2



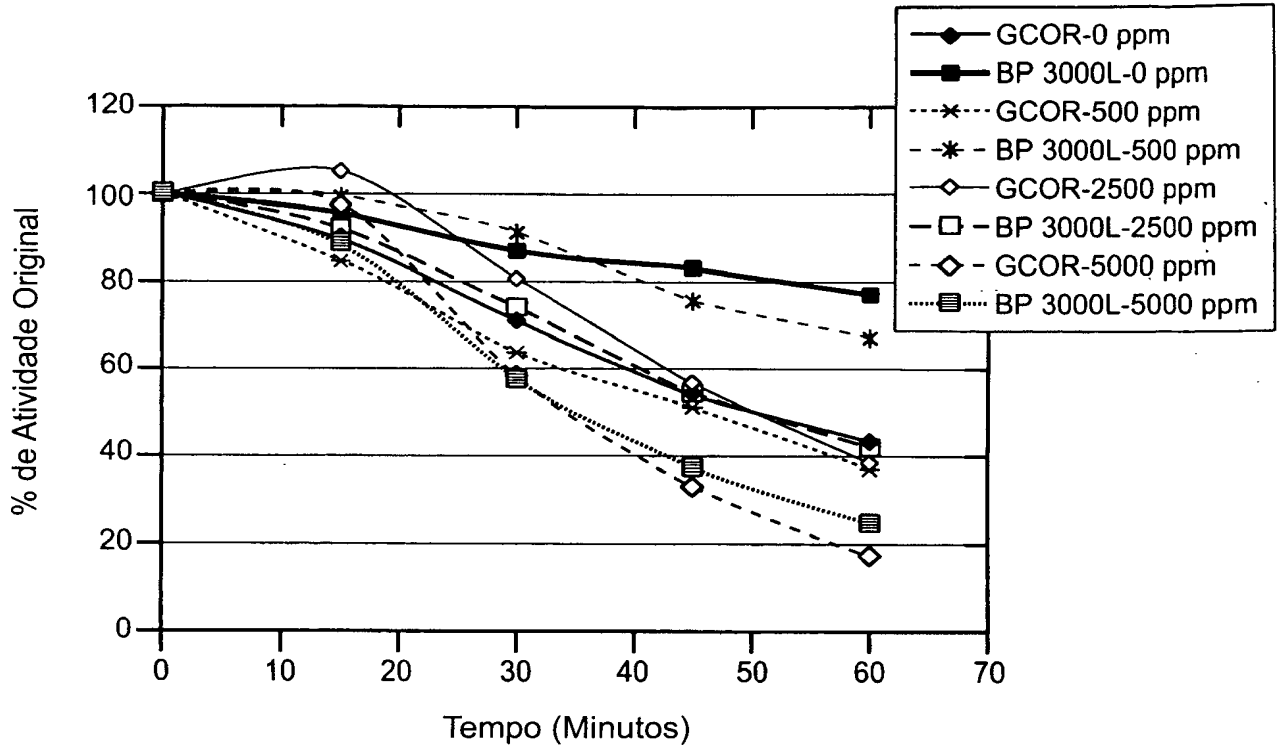


FIG. 4A

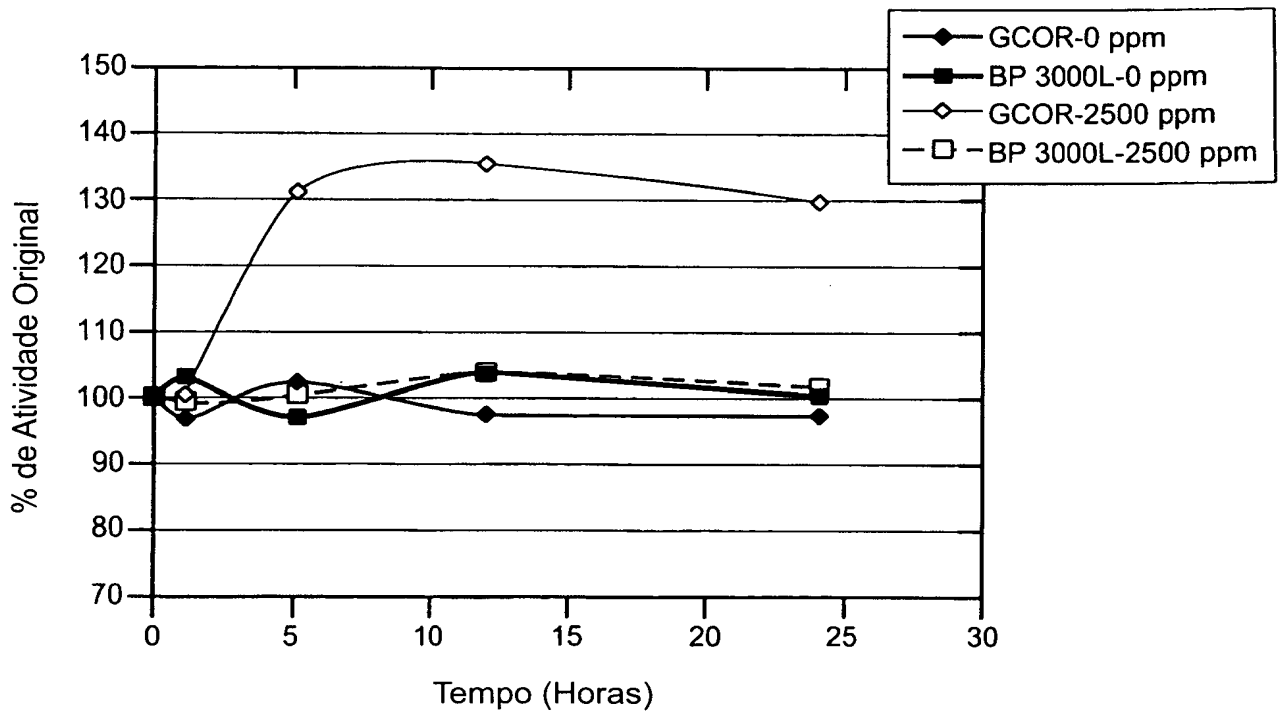


FIG. 4B

Estabilidade da Pectato Liase: Efeitos de EDTA

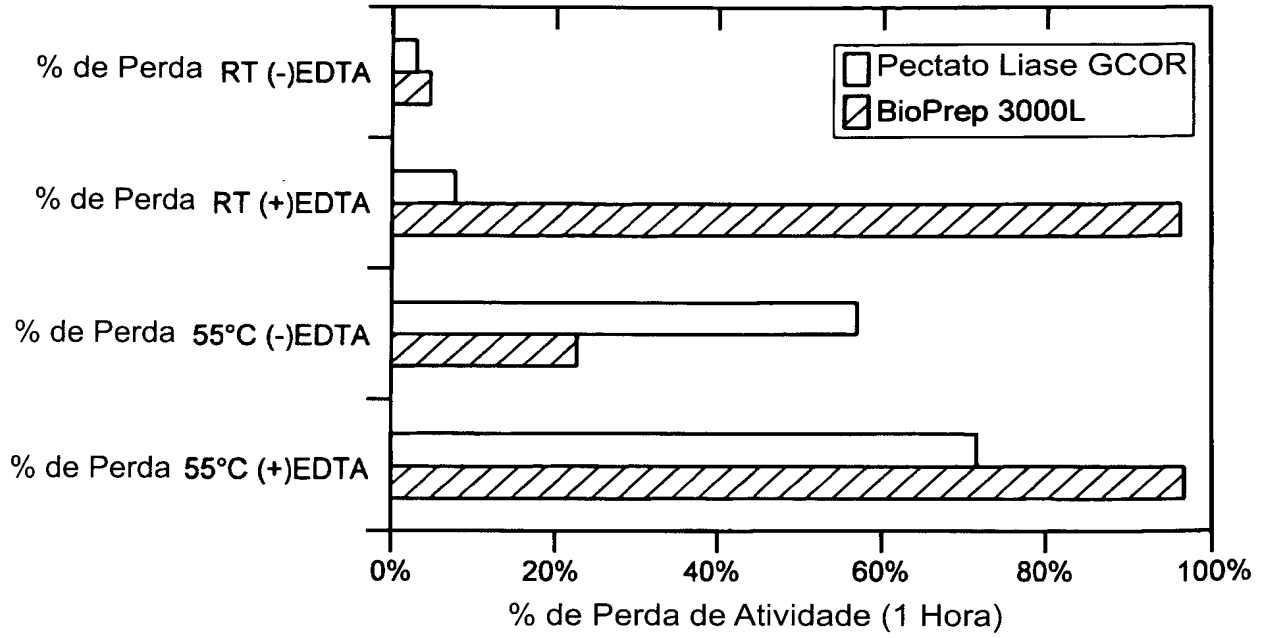


FIG. 5

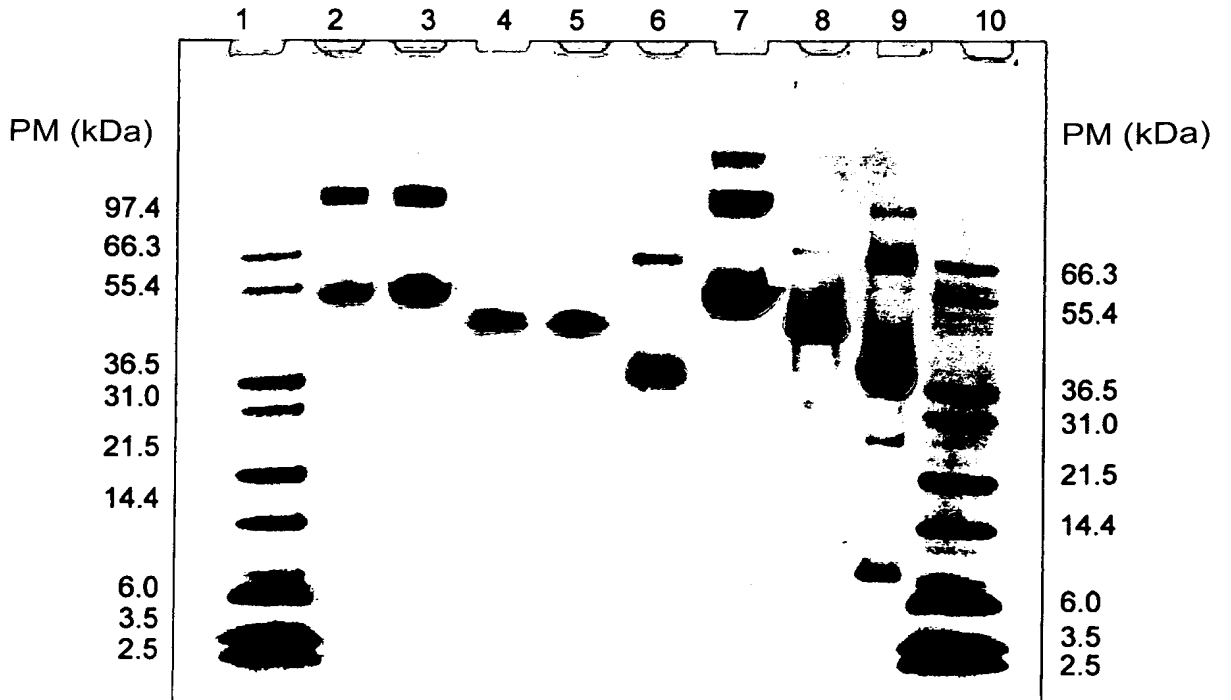


FIG. 6

Tergotômetro: HEPES 5 mM pH 8,0, HDL AATCC 0,15 g/L, Dureza 6 gpg, 25° C (7° F), 12 min, 10 ppm de Pectato Liase

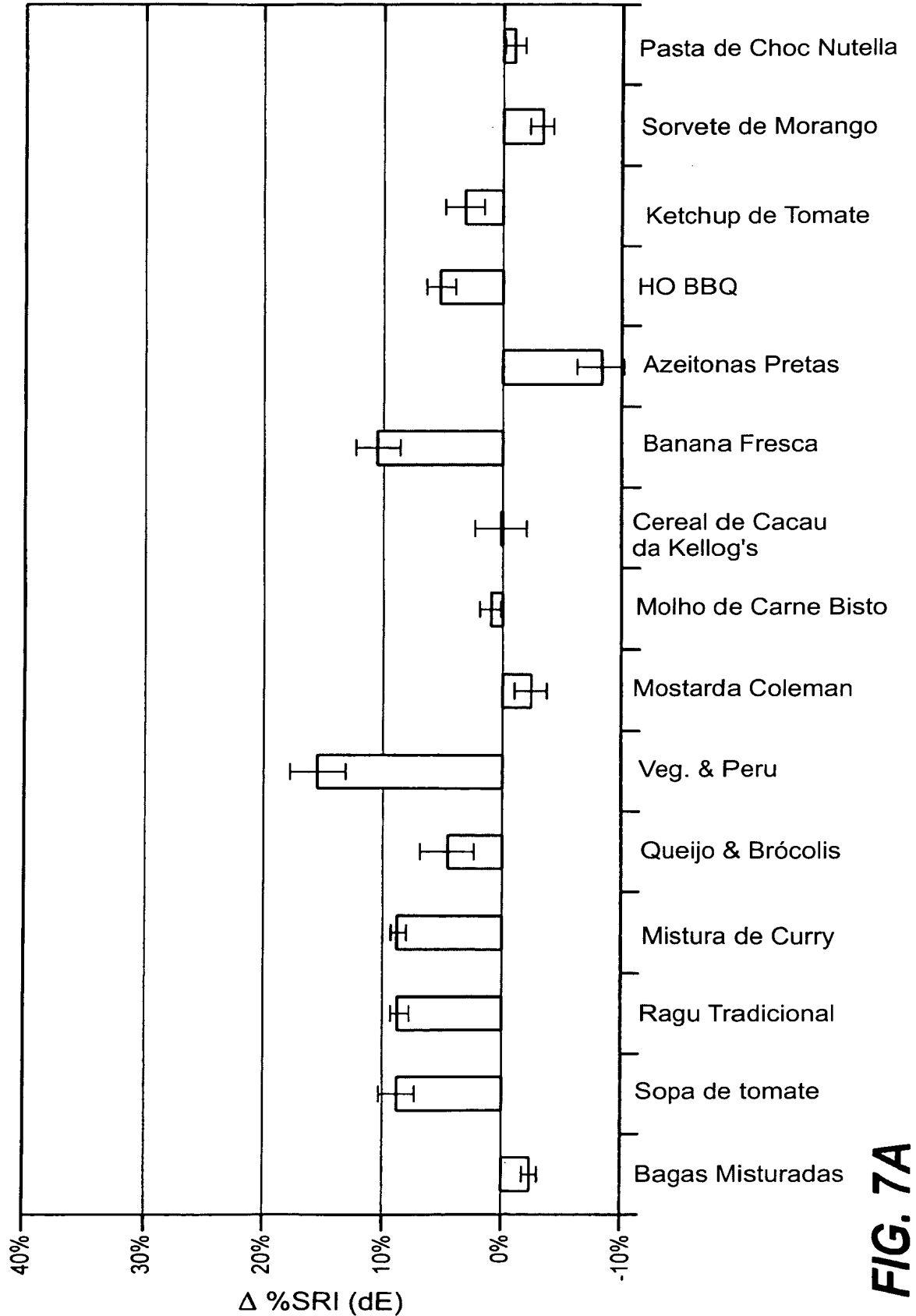


FIG. 7A

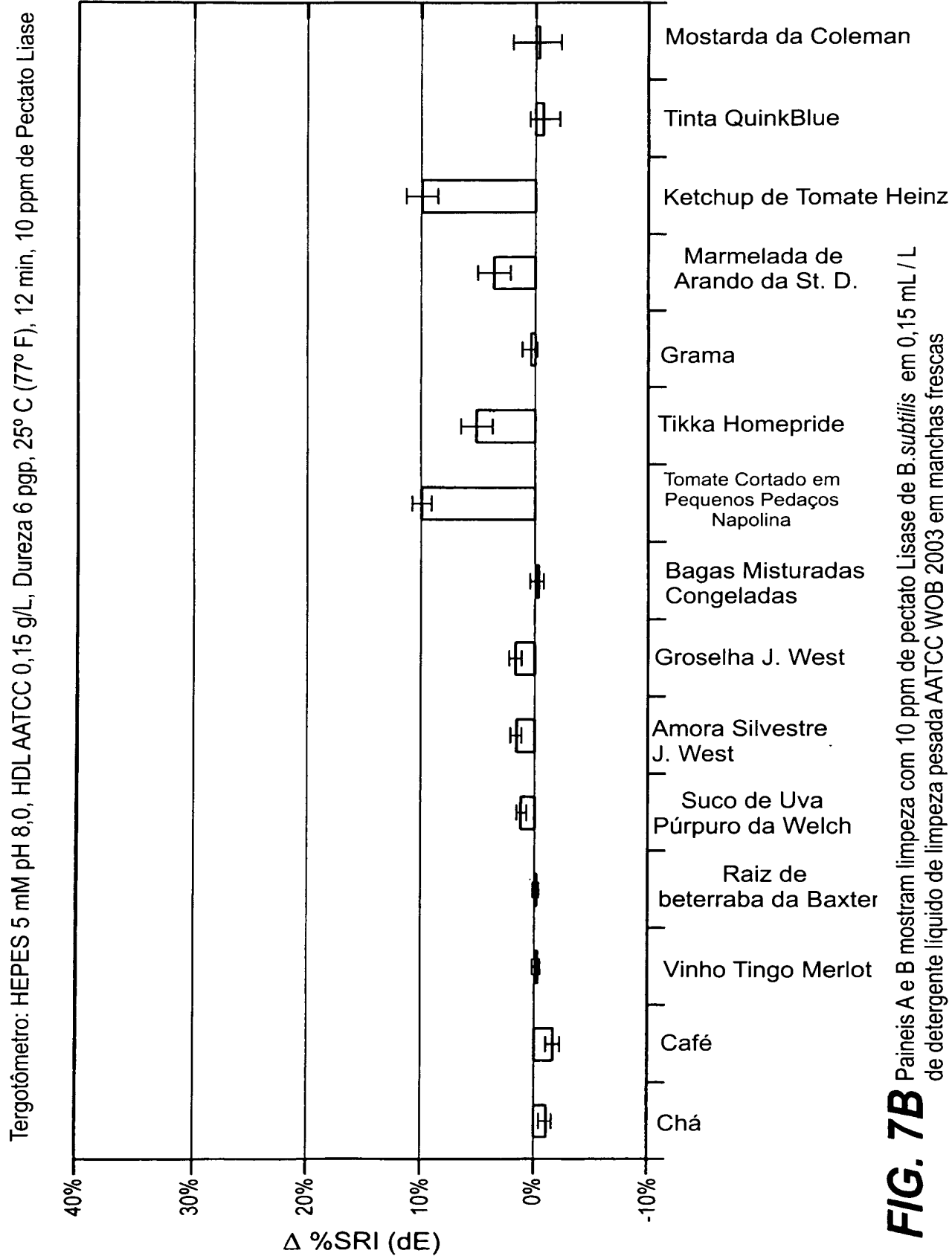


FIG. 7B Painéis A e B mostram limpeza com 10 ppm de pectato Liase de *B. subtilis* em 0,15 mL / L de detergente líquido de limpeza pesada AATCC WOB 2003 em manchas frescas

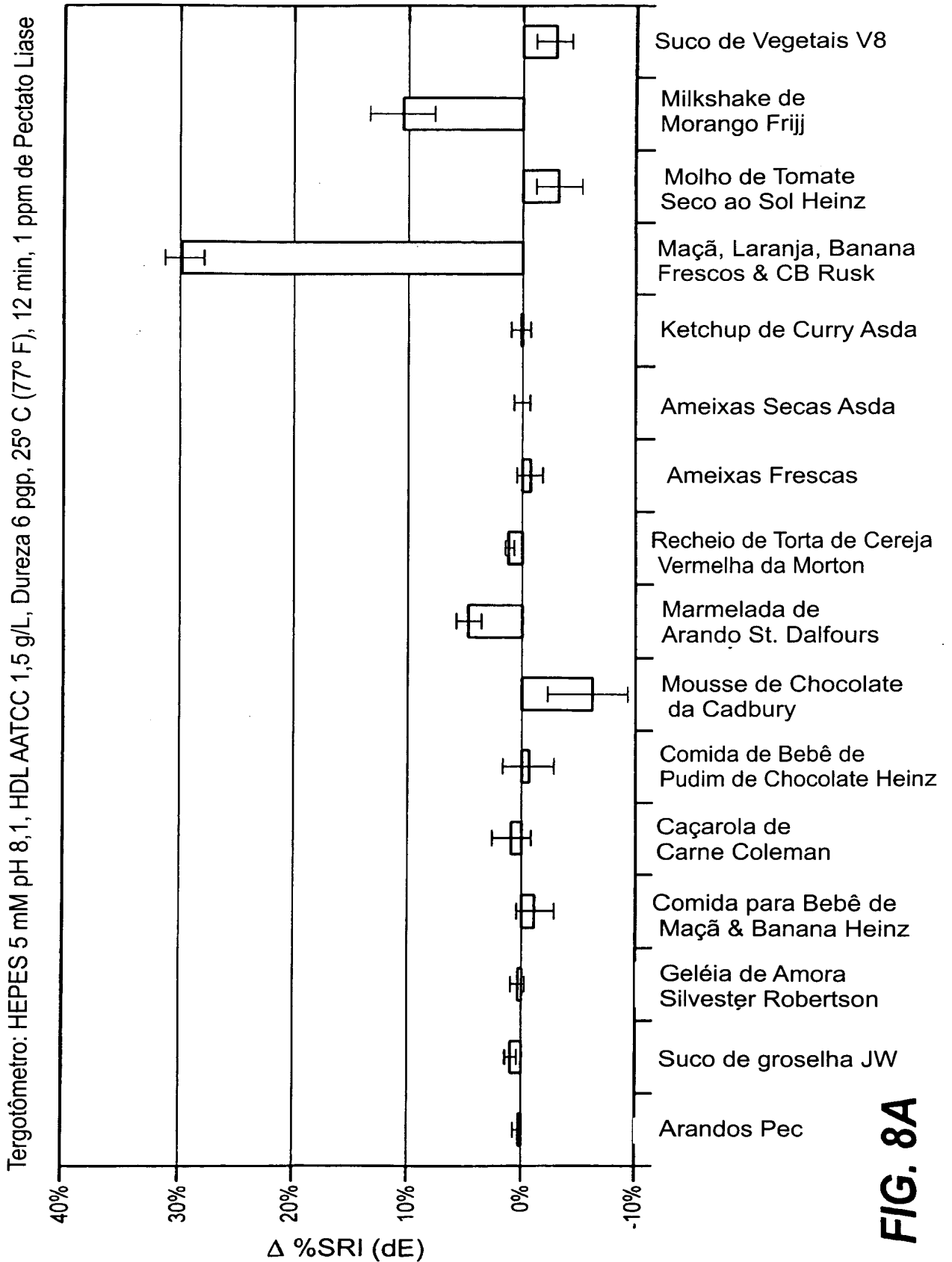


FIG. 8A

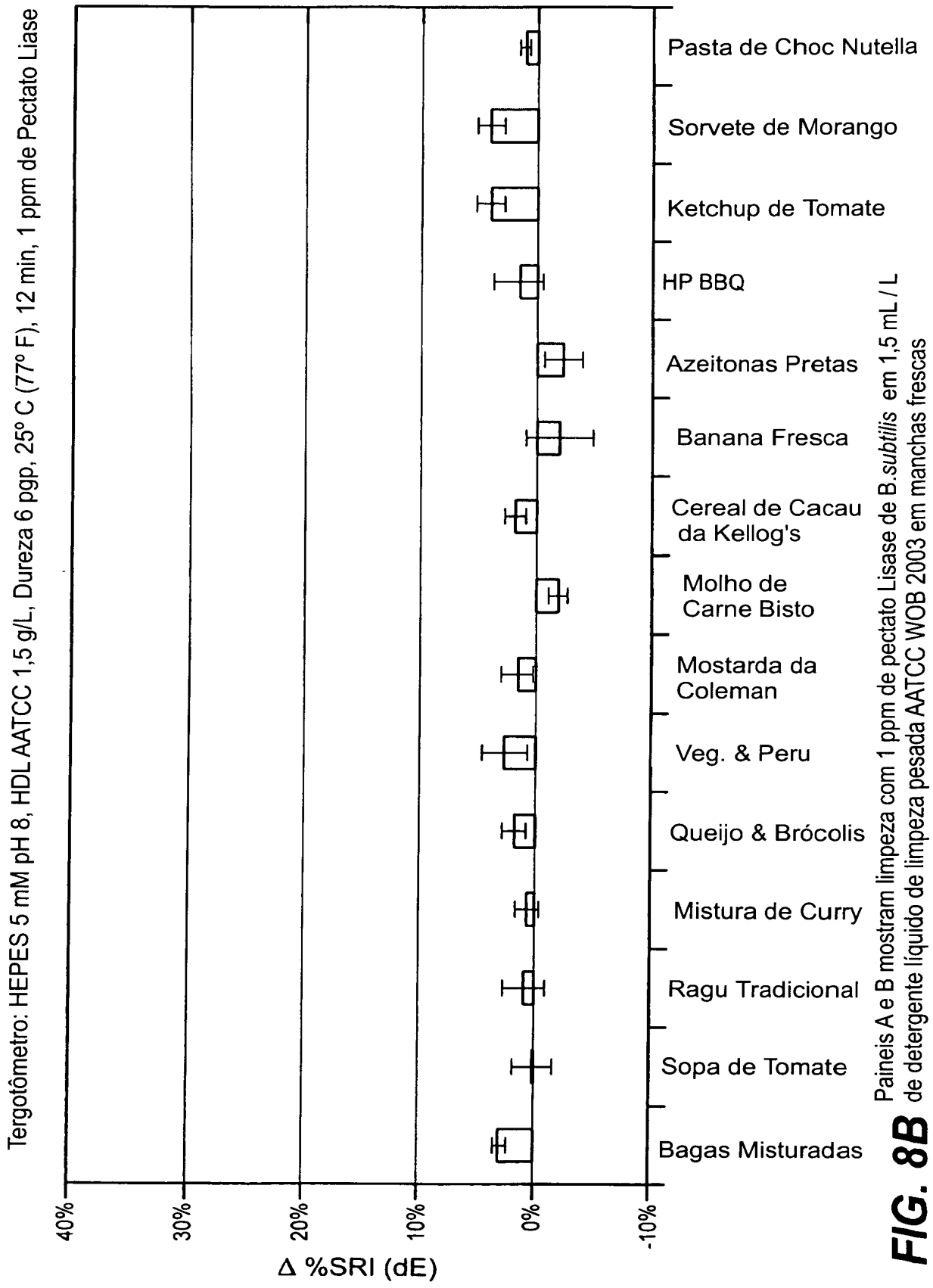


FIG. 8B Paineis A e B mostram limpeza com 1 ppm de pectato Lisase de *B.subtilis* em 1,5 mL / L de detergente líquido de limpeza pesada AATCC WOB 2003 em manchas frescas

Condições de NA de Escala Integral: HEPES 5 mM pH 8, HDL AATCC1,5 g/L, Dureza de 6 gpg, 21,11° C (70° F), 15 min

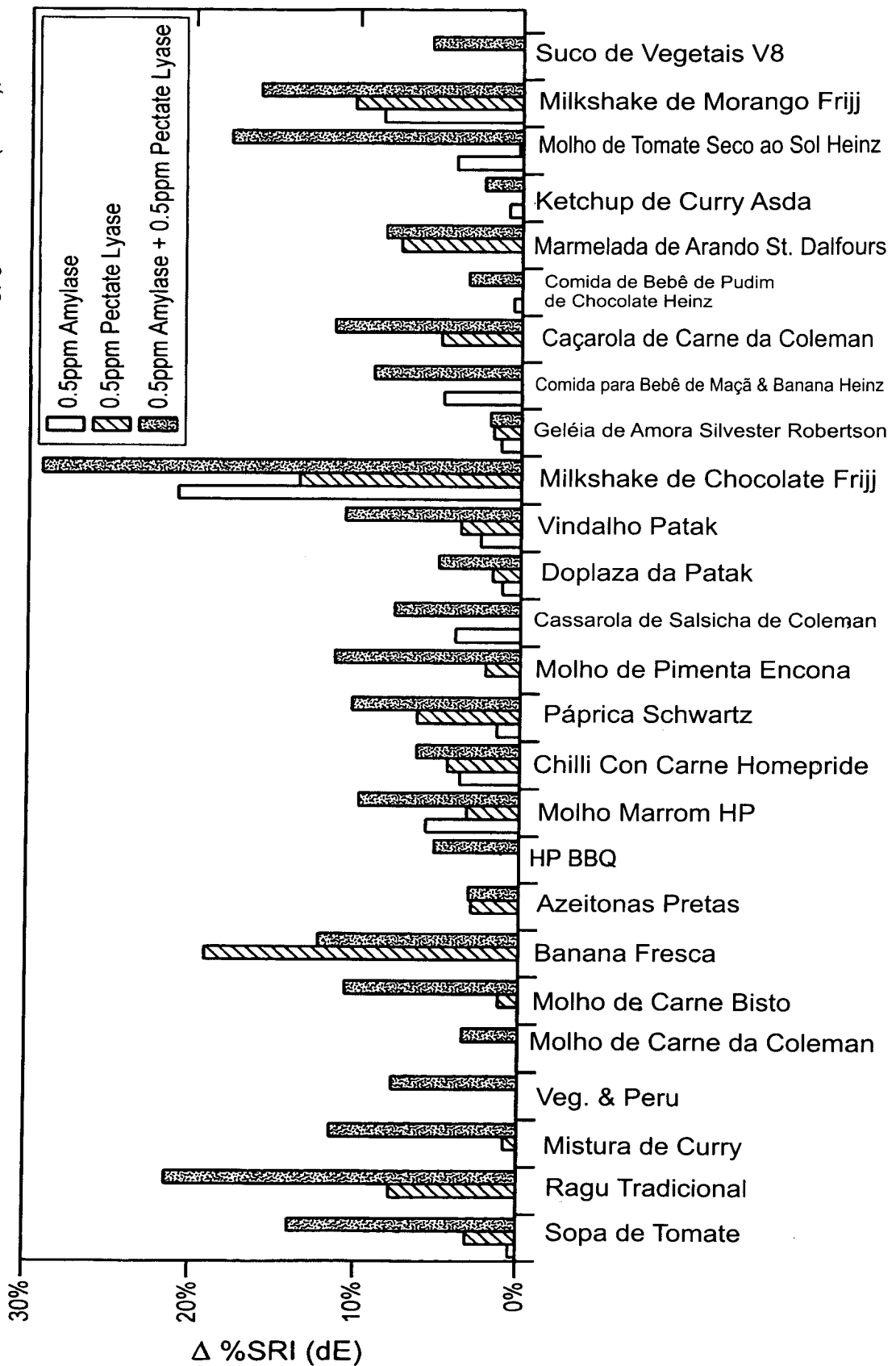
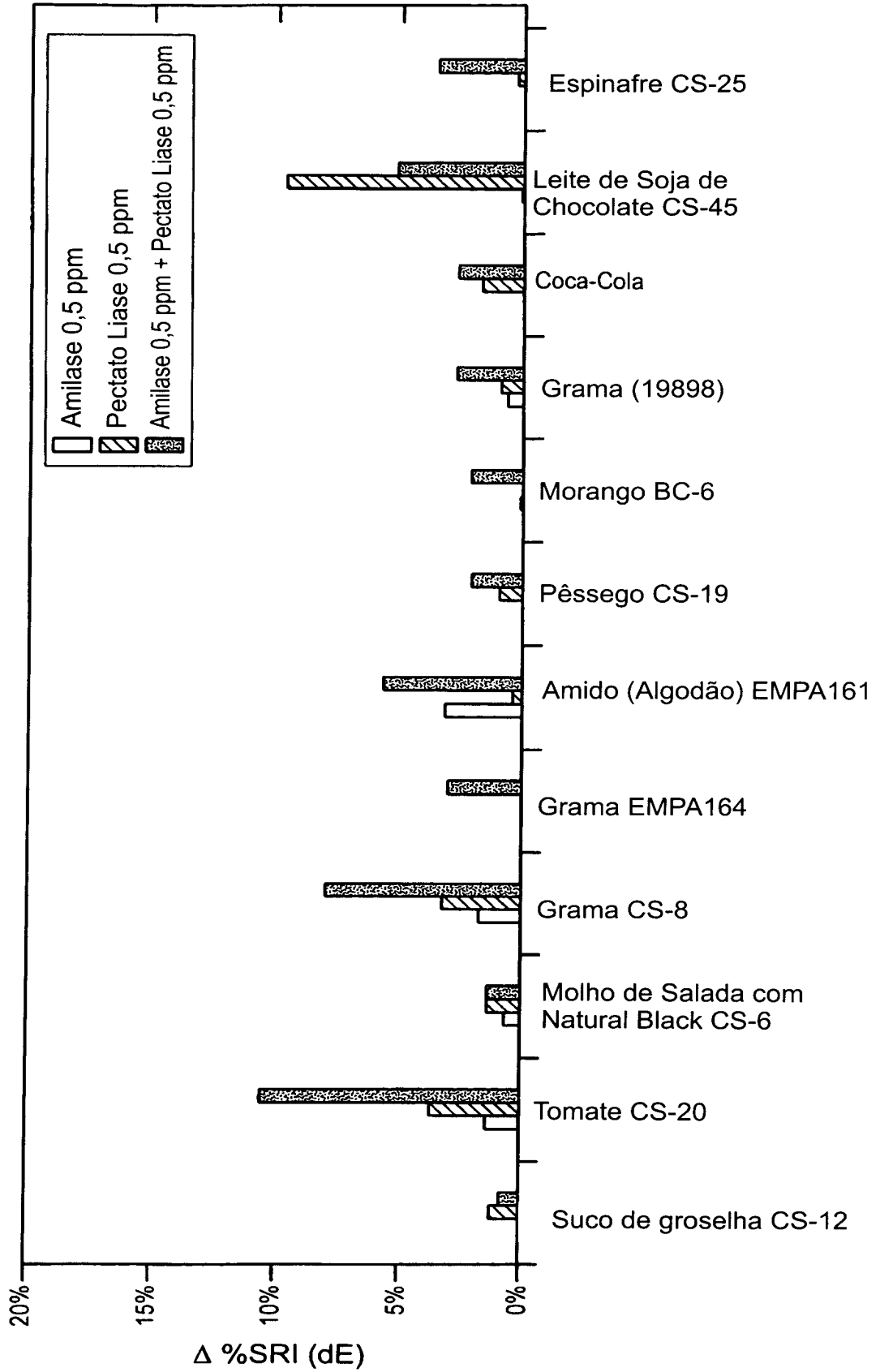


FIG. 9 Comparação de limpeza de pectato liase de *B. subtilis* com amilase de *B. licheniformis* em detergente líquido de limpeza pesada AATCC WOB 2003 sobre manchas frescas

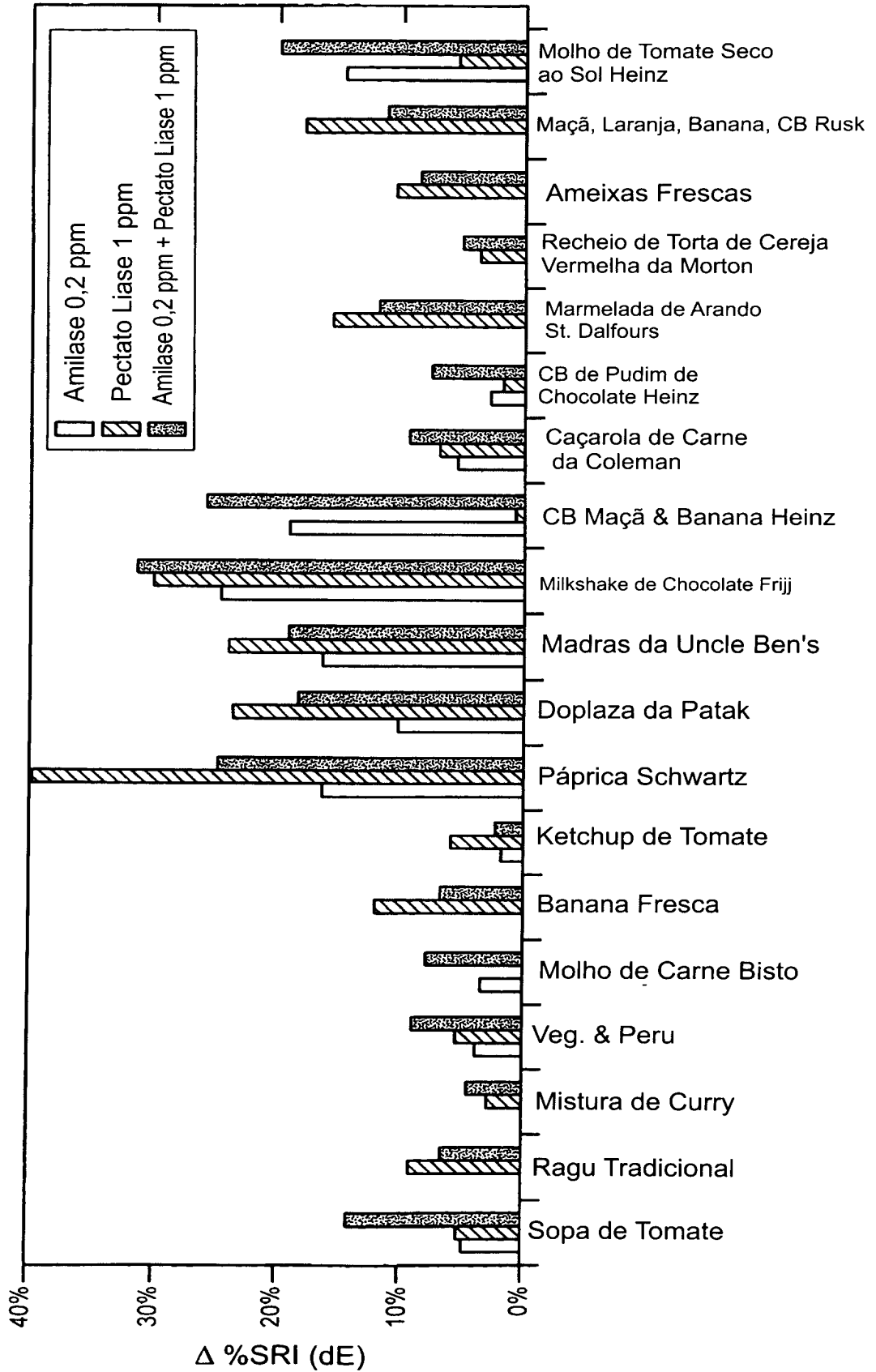
Condições de NA de Escala Integral: HEPES 5 mM pH 8, HDL AATCC de 1,5 g/L, Dureza 6 ppp, 21,22° C (70° F), 15 min



Comparação de limpeza de pectato liase de *B. subtilis* com amilase de *B. licheniformis* em detergente líquido de limpeza pesada AATCC WOB 2003 sobre manchas técnicas envelhecidas

FIG. 10

Condições de NA de Escala Integral: 1,5 g/L de Purex, Dureza de 6 ppp, 21,22° C (70° F), 15 min, pH ~9,64



Comparação de limpeza de pectato liase de *B. subtilis* com amilase de *Bacillus* sp. 707 em detergente líquido Purex comercial sobre manchas frescas

FIG. 11

Condições de NA de Escala Integral: 1,5 g/L de Purex, Dureza 6 ppp, 21,22° C (70° F), 15 min, pH ~9,64

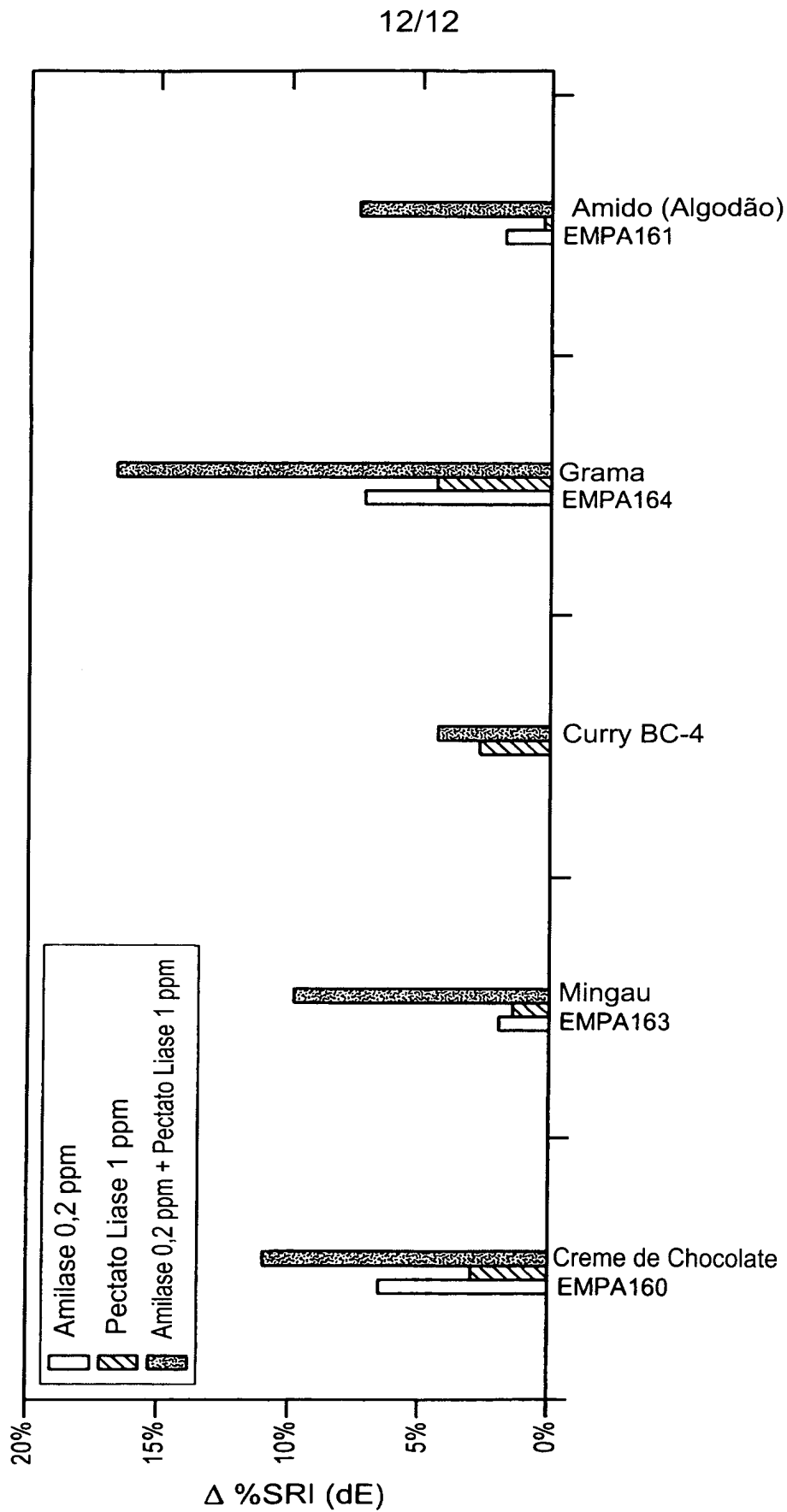


FIG. 12 Comparação de limpeza de pectato liase de *B. subtilis* com amilase de *Bacillus* sp. 707 em detergente líquido Purex comercial sobre manchas técnicas envelhecidas

RESUMO

Patente de Invenção: **"PECTATO LIASE E MÉTODO DE USO PARA BIOLIMPEZA"**.

5 A presente invenção refere-se aos compostos, composições e métodos para pré-tratamentos de uma etapa enzimáticos de têxteis celulósicos e contendo celulósico são revelados. Pré-tratamento compreende limpeza e alvejamento, e, opcionalmente, retirada de cola dos têxteis em várias combinações. O pré-tratamento de uma etapa pode ser também combinado com etapas de tingimento. São também reveladas composições
10 para limpeza e remoção de mancha, tal como composições detergente.