



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

(21) BR 112021006967-4 A2



(22) Data do Depósito: 14/10/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 13/07/2021

(54) Título: ALFA-AMILASES COM MUTAÇÕES QUE MELHORAM A ESTABILIDADE NA PRESENÇA DE QUELANTES

(51) Int. Cl.: C12N 9/28; C11D 3/386; C12P 19/14; C13K 1/06; D06L 1/14; (...).

(30) Prioridade Unionista: 12/10/2018 US 62/745,070.

(71) Depositante(es): DANISCO US INC..

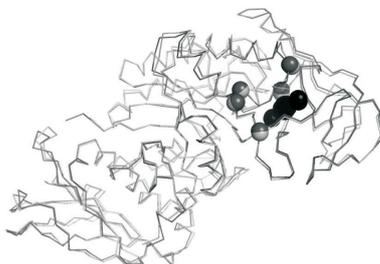
(72) Inventor(es): JONATHAN LASSILA.

(86) Pedido PCT: PCT US2019056067 de 14/10/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/077331 de 16/04/2020

(85) Data da Fase Nacional: 12/04/2021

(57) Resumo: ALFA-AMILASES COM MUTAÇÕES QUE MELHORAM A ESTABILIDADE NA PRESENÇA DE QUELANTES. Trata-se de a-amilases variantes que têm mutações que melhoram a estabilidade de enzima na presença de quelantes, métodos para projetar tais variantes e métodos para uso, das variantes resultantes. As a-amilases variantes são particularmente úteis, para uso em limpeza e composição de descolagem que inclui quantidades significativas de quelantes.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ALFA-AMILASES COM MUTAÇÕES QUE MELHORAM A ESTABILIDADE NA PRESENÇA DE QUELANTES**".

REFERÊNCIA CRUZADA

[001] O presente pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório número de série US 62/745070, depositado em 12 de outubro de 2018, que está aqui incorporado a título de referência em sua totalidade.

CAMPO DA TÉCNICA

[002] São reveladas α -amilases variantes com mutações que melhoram a estabilidade da enzima na presença de quelantes, métodos de concepção de tais variantes e métodos de uso das variantes resultantes. As α -amilases variantes são particularmente úteis para uso em composições de limpeza e desengomagem que incluem quantidades significativas de quelantes.

ANTECEDENTES

[003] O amido consiste em uma mistura de amilose (15 a 30% em p/p) e amilopectina (70 a 85% em p/p). A amilose consiste em cadeias lineares de unidades de glicose ligadas em α -1,4 tendo um peso molecular (MW) de cerca de 60.000 a cerca de 800.000. A amilopectina é um polímero ramificado contendo pontos de ramificação α -1,6 a cada 24-30 unidades de glicose; seu MW pode ser tão elevado quanto 100 milhões.

[004] α -Amilases hidrolisam amido, glicogênio e polissacarídeos relacionados por clivagem de ligações α -1,4-glicosídicas internas aleatoriamente. As α -amilases, particularmente de Bacilli, têm sido usadas para uma variedade de finalidades diferentes, incluindo liquefação e sacarificação de amido, desengomagem têxtil, modificação de amido na indústria de papel e celulose, cerveja, panificação, produção de xaropes para a indústria alimentícia, produção de

alimentos para os processos de fermentação e na alimentação animal para aumentar a digestibilidade. Estas enzimas podem ser também usadas para remover manchas de amido e sujeiras durante a lavagem de louças e a lavagem de roupas.

[005] Composições de detergente para lavagem de louça e lavanderia, outras composições de limpeza duras e licores de processamento de têxteis, em particular, mas não exclusivamente, muitas vezes contêm quantidades significativas de quelantes, principalmente para reduzir os depósitos de água dura causados pela interação de níveis imprevisíveis de cátions presentes na água local com componentes presentes nas composições de limpeza ou desengomagem. Infelizmente, muitas das α -amilases comercialmente disponíveis mais preferenciais dependem da ligação de cálcio para estabilidade e atividade. Conseqüentemente, existe a necessidade de desenvolver novas α -amilases e maneiras de projetar α -amilases que sejam capazes de um alto nível de desempenho e estabilidade no presente de quelantes.

SUMÁRIO

[006] As presentes composições e métodos referem-se a α -amilases variantes com mutações que melhoram a estabilidade da enzima na presença de quelantes, métodos de concepção de tais variantes e métodos de uso das variantes resultantes. Os aspectos e as modalidades das presentes composições e métodos são resumidos nos seguintes parágrafos separadamente numerados:

[007] 1. Em um aspecto, uma variante recombinante de uma família parental 13 α -amilase é fornecida, em que a variante tem uma mutação (i) na cadeia lateral de um resíduo de aminoácido que não é um ligante para um íon de cálcio ou sódio, (ii) em que a mutação é capaz de alterar a liberdade conformacional, as interações de ligação de hidrogênio, as interações de empilhamento pi ou as interações de van

der Waals da alça de estrutura principal que circunda o sítio Ca^{2+} - Na^{+} - Ca^{2+} , e (iii) em que a variante tem estabilidade aumentada na presença de uma quantidade predeterminada de quelante em comparação com uma α -amilase da Família 13 parental sem a mutação.

[008] 2. Em algumas modalidades da variante do parágrafo 1, a mutação está em uma posição de aminoácido selecionada a partir do grupo que consiste em:

(i) E190, V206, H210, S244 e F245 com o uso de SEQ ID NO: 1 para numeração, ou

(ii) E187, I203, H207, S241 e F242 com o uso de SEQ ID NO: 2 para numeração.

[009] 3. Em algumas modalidades da variante do parágrafo 2, a mutação é uma substituição selecionada do grupo que consiste em:

(i) E190P, V206T, V206Y, H210Q, S244C, S244D, S244H, S244N, S244E, S244F, S244V, S244L, S244Q e F245E com o uso de SEQ ID NO: 1 para numeração, ou

(ii) E187P, I203T, I203Y, H207Q, S241C, S241D, S241H, S241N, S241E, S241F, S241V, S241L, S241Q e F242E, com o uso de SEQ ID NO: 2 para numeração.

[0010] 4. Em algumas modalidades, a variante de qualquer um dos parágrafos 1-3 compreende ainda:

(i) uma deleção ou substituição em um ou mais resíduos correspondentes às posições 181, 182, 183 e/ou 184 na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;

(ii) uma deleção dos resíduos 181 e 182 ou 183 e 184 correspondendo à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;

(iii) uma deleção dos resíduos 178 e 179 ou 180 e 181 correspondendo à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(iv) qualquer mutação simples, múltipla ou combinatória previamente descrita em uma α -amilase da Família 13; e/ou

(v) um truncamento N-terminal e/ou C-terminal;

[0011] 5. Em algumas modalidades da variante de qualquer um dos parágrafos 1-4, a variante tem pelo menos 60%, 70%, 80% ou 90% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e/ou SEQ ID NO: 2.

[0012] 6. Em outro aspecto, é fornecida uma composição de detergente que compreende a amilase variante de qualquer um dos parágrafos 1-5, que compreende ainda um agente quelante.

[0013] 7. Em outro aspecto, é fornecida uma composição para liquefazer o amido que compreende a variante de qualquer um dos parágrafos 1-5, que compreende ainda um agente quelante.

[0014] 8. Em outro aspecto, é fornecida uma composição para desengomar têxteis que compreende a variante de qualquer um dos parágrafos 1-5, que compreende ainda um agente quelante.

[0015] 9. Em outro aspecto, é fornecida uma composição para fabricação de cerveja ou panificação que compreende a variante de qualquer um dos parágrafos 1-5, que compreende ainda um agente quelante.

[0016] 10. Em outro aspecto, é fornecido um método para aumentar a estabilidade de uma Família 13 α -amilase na presença de um quelante, que compreende introduzir a uma α -amilase de Família 13 parental uma mutação (i) na cadeia lateral de um resíduo de aminoácido que não é um ligante para um íon de cálcio ou sódio, (ii) em que a mutação é capaz de alterar a liberdade conformacional, as interações de ligação de hidrogênio, as interações de empilhamento pi ou as interações de van der Waals da alça de estrutura principal que circunda o sítio Ca^{2+} - Na^+ - Ca^{2+} , e (iii) em que a variante tem estabilidade aumentada na presença de uma quantidade predeterminada de quelante em comparação com uma α -amilase de Família 13 parental sem a mutação.

[0017] 11. Em algumas modalidades do método do parágrafo 10, a mutação está em uma posição de aminoácido selecionada a partir do grupo que consiste em:

(i) E190, V206, H210, S244 e F245 com o uso de SEQ ID NO: 1 para numeração, ou

(ii) E187, I203, H207, S241 e F242 com o uso de SEQ ID NO: 2 para numeração.

[0018] 12. Em algumas modalidades do método do parágrafo 11, a mutação é uma substituição selecionada do grupo que consiste em:

(i) E190P, V206T, V206Y, H210Q, S244C, S244D, S244H, S244N, S244E, S244F, S244V, S244L, S244Q e F245E com o uso de SEQ ID NO: 1 para numeração, ou

(ii) E187P, I203T, I203Y, H207Q, S241C, S241D, S241H, S241N, S241E, S241F, S241V, S241L, S241Q e F242E, com o uso de SEQ ID NO: 2 para numeração.

[0019] 13. Em algumas modalidades do método de qualquer um dos parágrafos 10-12, a variante compreende ainda:

(i) uma deleção ou substituição em um ou mais resíduos correspondentes às posições 181, 182, 183 e/ou 184 na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;

(ii) uma deleção dos resíduos 181 e 182 ou 183 e 184 correspondendo à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;

(iii) uma deleção dos resíduos 178 e 179 ou 180 e 181 correspondendo à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(iv) qualquer mutação simples, múltipla ou combinatória previamente descrita em uma α -amilase da Família 13; e/ou

(v) um truncamento N-terminal e/ou C-terminal;

[0020] 14. Em algumas modalidades do método de qualquer um dos parágrafos 10-13, a variante tem pelo menos 60%, 70%, 80% ou 90%

de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e/ou SEQ ID NO: 2.

[0021] 15. Em outro aspecto, é fornecido um método para converter amido em oligossacarídeos, que compreende colocar o amido em contato com a quantidade eficaz da variante α -amilase de qualquer um dos parágrafos 1-5.

[0022] 16. Em outro aspecto, é fornecido um método para remover uma mancha de amido ou sujeira de uma superfície, que compreende colocar a superfície em contato com uma quantidade eficaz da variante α -amilase de qualquer um dos parágrafos 1-5, ou a composição do parágrafo 7, permitindo que o polipeptídeo hidrolise componentes de amido presentes na coloração de amido para produzir moléculas derivadas de amido menores que se dissolvem na composição aquosa, removendo assim a coloração de amido da superfície.

[0023] Esses e outros aspectos e modalidades das composições e métodos serão evidentes a partir da presente descrição e desenhos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0024] A Figura 1 mostra modelos de duas α -amilases destacando com esferas as posições do carbono α para resíduos de aminoácidos que, quando mutados, fornecem um benefício na presença de quelante. O modelo BspAmy24 é mostrado em cinza claro. O modelo CspAmy2 é mostrado em cinza mais escuro. Ambas as moléculas têm uma deleção RG. Os íons cálcio e sódio são mostrados em preto.

[0025] A Figura 2 destaca a localização de uma alça que circunda o sítio de um íon metálico e de onde se originam a maioria dos ligantes metálicos. A alça é mostrada em uma representação de tubo mais grosso, enquanto o resto da estrutura é mostrado em uma representação de fio mais fino. Os aminoácidos na molécula de BspAmy24 são mostrados em cinza claro. Os aminoácidos na molécula CspAmy2 são mostrados em cinza mais escuro. Ambas as moléculas

têm uma deleção RG. Os íons cálcio e sódio são mostrados em esferas.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0026] São descritas composições e métodos relacionados a α -amilases variantes com mutações que melhoram a estabilidade da enzima na presença de quelantes, métodos de concepção de tais variantes e métodos de uso das variantes. Tais variantes são especialmente úteis para a limpeza de manchas de amido em roupas, lava-louças, processamento de têxteis (por exemplo, desengomagem) e outras aplicações, na presença de altos níveis de quelantes ou em um ambiente de água particularmente mole. Esses e outros aspectos das composições e métodos são descritos em detalhes, a seguir.

[0027] Antes da descrição dos vários aspectos e modalidades das presentes composições e métodos, as definições e abreviaturas a seguir são descritas.

1. Definições e abreviaturas

[0028] De acordo com esta descrição detalhada, as seguintes abreviaturas e definições se aplicam. Observa-se que as formas singulares "um/uma" e "o/a" incluem referentes plurais, a não ser que o contexto determine claramente de outro modo. Assim, por exemplo, a referência a "uma enzima" inclui uma pluralidade de tais enzimas, e a referência a "a dosagem" inclui referência a uma ou mais dosagens e seus equivalentes conhecidos por aqueles versados na técnica, e assim por diante.

[0029] O presente documento está organizado em diversas seções para facilidade de leitura; no entanto, o leitor entenderá que as afirmações feitas em uma seção podem se aplicar a outras seções. Desta forma, os títulos usados para diferentes seções da divulgação não devem ser interpretados como limitantes.

[0030] A não ser que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o mesmo

significado que o comumente entendido por uma pessoa de habilidade comum na técnica. Os seguintes termos são definidos, abaixo, para clareza.

1.1. Abreviaturas e acrônimos

[0031] As seguintes abreviaturas/acrônimos têm os seguintes significados, a menos que especificado de outra forma:

DNA	ácido desoxirribonucleico
EC	Comissão de Enzimas
GA	glucoamilase
GH	dureza geral
HDL	detergente líquido de elevada densidade
HDD	detergente em pó para tarefas pesadas
HSG	detergente granular que produz muitas bolhas
HFCS	xarope de milho com elevado teor de frutose
IRS	amido residual insolúvel
kDa	quilodalton
MW	peso molecular
MWU	unidade de Wohlgemuth modificada; $1,6 \times 10^{-5}$ mg/MWU = unidade de atividade
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PI	índice de desempenho
ppm	partes por milhão, por exemplo, μg de proteína por grama de sólido seco
RCF	força centrífuga/centrípeta relativa (isto é, x gravidade)
sp.	espécies
p/v	peso/volume
p/p	peso/peso
v/v	volume/volume
% em p	percentual em peso
°C	graus Centígrados

H ₂ O	água
dH ₂ O ou DI	água desionizada
dIH ₂ O	água desionizada, filtração Milli-Q
g ou gm	gramas
µg	microgramas
mg	miligramas
kg	quilogramas
µL e µl	microlitros
mL e ml	mililitros
mm	milímetros
µm	micrômetro
M	molar
mM	milimolar
µM	micromolar
U	unidades
s	segundos
min	minuto/minutos
h	hora/horas
ETOH	etanol
N	normal
MWCO	valor de corte de peso molecular
CAZy	base de dados de Enzimas Carboidrato Ativas
WT	tipo selvagem

1.2. Definições

[0032] Os termos "amilase" ou "enzima amilolítica" se referem a uma enzima que tem, dentre outras coisas, a capacidade de catalisar a degradação de amido. As α -amilases são hidrolases que clivam as ligações α -D- (1 \rightarrow 4) O-glicosídicas no amido. Geralmente, as α -amilases (EC 3.2.1.1; α -D-(1 \rightarrow 4)-glucana glucano-hidrolase) são definidas como enzimas endoatuantes clivando as ligações α -D-(1 \rightarrow 4)

O-glicosídicas dentro da molécula de amido de um modo aleatório, originando polissacarídeos contendo três ou mais unidades de D-glicose ligadas em (1-4)- α . Em contrapartida, as enzimas amilolíticas exoatuantes, como β -amilases (EC 3.2.1.2; α -D- (1 \rightarrow 4) -glucano malto-hidrolase) e algumas amilases específicas do produto como α -amilase maltogênica (EC 3.2.1.133) clivam a molécula de polissacarídeo da extremidade não redutora do substrato. β -Amilases, α -glucosidases (EC 3.2.1.20; α -D-glicosídeo glico-hidrolase), glucoamilase (EC 3.2.1.3; α -D- (1 \rightarrow 4) -glucano glico-hidrolase) e amilases específicas do produto como as maltotetraosidases (EC 3.2.1.60) e as malto-hexaosidases (EC 3.2.1.98) podem produzir malto-oligossacarídeos de um comprimento específico ou xaropes enriquecidos de malto-oligossacarídeos específicos.

[0033] O termo "amido" refere-se a qualquer material composto pelos carboidratos polissacarídeos complexos de plantas, compostos por amilose e amilopectina com a Fórmula $(C_6H_{10}O_5)_x$, em que X pode ser qualquer número.

[0034] Os termos, "tipo selvagem", "parental" ou "referência", em relação a um polipeptídeo, se referem a um polipeptídeo de ocorrência natural que não inclui uma substituição, inserção ou deleção feita pelo homem em uma ou mais posições de aminoácido. Similarmente, os termos "tipo selvagem", "parental" ou "referência", em relação a um polinucleotídeo, referem-se a um polinucleotídeo de ocorrência natural que não inclui uma alteração de nucleosídeo feita pelo homem. Entretanto, note que um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo do tipo selvagem, parental ou de referência não se limita a um polinucleotídeo de ocorrência natural e abrange qualquer polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo do tipo selvagem, parental ou de referência.

[0035] O termo "variante", em relação a um polipeptídeo, refere-se

a um polipeptídeo que se diferencia de um polipeptídeo de tipo selvagem, parental ou de referência especificado pelo fato de que o mesmo inclui uma ou mais substituições, inserções ou deleções de um aminoácido de ocorrência natural ou feitas pelo homem. Similarmente, o termo "variante", em relação a um polinucleotídeo, refere-se a um polinucleotídeo que difere em sequência de nucleotídeos de um polinucleotídeo do tipo selvagem, parental ou de referência especificado. A identidade do polipeptídeo ou polinucleotídeo de tipo selvagem, parental ou de referência será evidente a partir do contexto.

[0036] No caso das presentes α -amilases, "atividade" refere-se à atividade da α -amilase, que pode ser medida conforme descrito no presente documento.

[0037] O termo "benefício de desempenho" refere-se a uma melhora em uma propriedade desejável de uma molécula. Os benefícios de desempenho exemplificadores incluem, sem limitação, hidrólise aumentada de um substrato de amido, desempenho aumentado de grãos, cereais ou outro substrato de amido, desempenho de limpeza aumentado, estabilidade térmica aumentada, estabilidade de detergente aumentada, estabilidade de armazenamento aumentada, solubilidade aumentada, perfil de pH, dependência diminuída de cálcio, estabilidade aumentada na presença de quelantes, atividade específica aumentada, especificidade do substrato modificado, ligação do substrato modificado, atividade dependente do pH modificada, estabilidade dependente do pH modificada, estabilidade oxidativa aumentada e expressão aumentada. Em alguns casos, o benefício de desempenho é realizado a uma temperatura relativamente baixa. Em alguns casos, o benefício de desempenho é realizado a uma temperatura relativamente elevada.

[0038] Os termos "quelante" e "agente quelante" são usados de forma intercambiável para se referir a um composto químico capaz de

coordenar um íon metálico, evitando ou reduzindo assim a possibilidade de o íon metálico interagir com outros componentes em uma solução ou suspensão. Quelantes exemplificadores são descritos no presente documento.

[0039] Os termos "ligante de metal" referem-se a átomos de uma cadeia lateral de aminoácido, ou cadeia principal, que se ligam ao metal, que podem ser encontrados, por exemplo, no imidazol de histidina, tiol de cisteína, carboxilato de aspartato ou glutamato, etc.

[0040] Os termos "variantes combinatórias" são variantes que compreendem duas ou mais mutações, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais, substituições, deleções e/ou inserções.

[0041] O termo "recombinante", quando usado em referência a uma célula, ácido nucleico, proteína ou vetor em questão, indica que o indivíduo foi modificado de seu estado nativo. Assim, por exemplo, as células recombinantes expressam genes que não são encontrados dentro da forma nativa (não recombinante) da célula ou expressam genes nativos a níveis diferentes ou sob condições diferentes do que é encontrado na natureza. Os ácidos nucleicos recombinantes diferem-se de uma sequência nativa por um ou mais nucleotídeos e/ou são ligados de maneira funcional a sequências heterólogas, por exemplo, um promotor heterólogo em um vetor de expressão. As proteínas recombinantes podem se diferir de uma sequência nativa por um ou mais aminoácidos e/ou são fundidas a sequências heterólogas. Um vetor que compreende um ácido nucleico que codifica uma amilase é um vetor recombinante.

[0042] Os termos "recuperado", "isolado" e "separado" referem-se a um composto, proteína (polipeptídeos), célula, ácido nucleico, aminoácido ou outro material ou componente especificado que é removido de pelo menos um outro material ou componente com o qual está naturalmente associado como encontrado na natureza. Um

polipeptídeo "isolado" do mesmo, inclui, sem limitação, um caldo de cultura contendo polipeptídeo secretado expresso em uma célula hospedeira heteróloga.

[0043] O termo "purificado" se refere ao material (por exemplo, um polipeptídeo ou polinucleotídeo isolado) que está em um estado relativamente puro, por exemplo, pelo menos cerca de 90% puro, pelo menos cerca de 95% puro, pelo menos cerca de 98% puro, ou mesmo pelo menos cerca de 99% puro.

[0044] O termo "enriquecido" refere-se ao material (por exemplo, um polipeptídeo ou polinucleotídeo isolado) que é cerca de 50% puro, pelo menos cerca de 60% puro, pelo menos cerca de 70% puro ou mesmo pelo menos cerca de 70% puro.

[0045] Os termos "termoestável" e "termoestabilidade", em referência a uma enzima, referem-se à capacidade da enzima de manter atividade após a exposição a uma temperatura elevada. A termoestabilidade de uma enzima, tal como uma enzima amilase, é medida por sua meia-vida ($t_{1/2}$) dada em minutos, horas ou dias, durante a qual metade da atividade de enzima é perdida sob condições definidas. A meia-vida pode ser calculada por medição da atividade residual de α -amilase após exposição a (*i.e.*, desafio por) uma temperatura elevada.

[0046] Uma "faixa de pH", em referência a uma enzima, se refere à faixa de valores de pH sob os quais a enzima exibe atividade catalítica.

[0047] Os termos "estável em pH" e "estabilidade de pH", em referência a uma enzima, referem-se à capacidade da enzima de reter atividade ao longo de uma ampla faixa de valores de pH por um período de tempo predeterminado (por exemplo, 15 min, 30 min, 1 hora).

[0048] O termo "sequência de aminoácidos" é sinônimo dos termos "polipeptídeo", "proteína" e "peptídeo" e são usados de forma intercambiável. Quando tais sequências de aminoácidos exibirem

atividade, as mesmas podem ser denominadas "enzima". Os códigos de uma letra ou três letras convencionais para resíduos de aminoácido são usados, com as sequências de aminoácidos sendo apresentadas na orientação terminal de amino para carbóxi padrão (isto é, N→C).

[0049] O termo "ácido nucleico" abrange DNA, RNA, heteroduplexes e moléculas sintéticas com a capacidade de codificar um polipeptídeo. Os ácidos nucleicos podem ter fita simples ou fita dupla e podem conter modificações químicas. Os termos "ácido nucleico" e "polinucleotídeo" são usados de forma intercambiável. Devido ao fato de que o código genético é degenerado, pode ser usado mais do que um códon para codificar um aminoácido particular, e as presentes composições e métodos abrangem sequências de nucleotídeos que codificam uma sequência de aminoácidos particular. A menos que indicado de outro modo, sequências de ácidos nucleicos são apresentadas na orientação 5' a 3'.

[0050] "Hibridização" refere-se ao processo pelo qual uma fita de ácido nucleico forma um duplex com, isto é, pares de bases com, uma fita complementar, como ocorre durante as técnicas de hibridização de blot e técnicas de PCR. As condições de hibridização restritivas são exemplificadas por hibridização nas seguintes condições: 65 °C e 0,1X SSC (onde 1X SSC = NaCl a 0,15 M, citrato de Na₃ a 0,015 M, pH 7,0). Os ácidos nucleicos em duplex, hibridados são caracterizados por uma temperatura de fusão (T_m), onde uma metade dos ácidos nucleicos hibridados está desemparelhada com a fita complementar.

[0051] Uma molécula "sintética" é produzida por síntese química ou enzimática *in vitro*, em vez de por um organismo.

[0052] Uma "cepa hospedeira" ou "célula hospedeira" é um organismo no qual um vetor de expressão, fago, vírus ou outro construto de DNA, incluindo um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de interesse (por exemplo, uma amilase), foi introduzido. As cepas

hospedeiras exemplificativas são células de micro-organismo (por exemplo, bactérias, fungos filamentosos e levedura) com a capacidade de expressar o polipeptídeo de interesse e/ou sacarídeos de fermentação. O termo "célula hospedeira" inclui protoplastos criados a partir de células.

[0053] O termo "heterólogo", em referência a um polinucleotídeo ou proteína, refere-se a um polinucleotídeo ou proteína que não ocorre naturalmente em uma célula hospedeira.

[0054] O termo "endógeno", em referência a um polinucleotídeo ou proteína, refere-se a um polinucleotídeo ou proteína que ocorre naturalmente na célula hospedeira.

[0055] O termo "expressão" refere-se ao processo pelo qual um polipeptídeo é produzido com base em uma sequência de ácidos nucleicos. O processo inclui tanto transcrição como tradução.

[0056] O termo "atividade específica" refere-se ao número de moles do substrato que pode ser convertido em produto por uma enzima ou preparação enzimática por unidade de tempo sob condições específicas. A atividade específica é geralmente expressa como unidades (U)/mg de proteína.

[0057] Conforme usado no presente documento, "dureza da água" é uma medida dos minerais (*por exemplo*, cálcio e magnésio) presentes na água. O U.S. Geological Survey usa as seguintes faixas de medições para classificar a água em água dura e mole (Tabela 1):

Tabela 1. Faixas de medições do U.S. Geological Survey para classificar a água.

Descrição	Dureza (mg/l)	Dureza (mmol/l)
Macia	0-60	0-0,60
Moderadamente dura	61-120	0,61-1,20
Dura	121-180	1,21-1,80
Muito dura	>181	>1,81

[0058] Uma "amostra" é um pedaço de material, como um tecido, que tem uma mancha aplicada nele. O material pode ser, por exemplo, tecidos produzidos a partir de algodão, poliéster ou misturas de fibras naturais e sintéticas. A amostra pode ser ainda papel, tal como papel de filtro ou nitrocelulose, ou um pedaço de um material duro tal como cerâmica, metal ou vidro. Para α -amilases, a mancha é baseada em amido, mas pode incluir sangue, leite, tinta, grama, chá, vinho, espinafre, molho, chocolate, ovo, queijo, argila, pigmento, óleo ou misturas desses compostos.

[0059] Uma "amostra menor" ou "micro amostra" é uma seção da amostra que foi cortada com um único dispositivo de perfuração de orifício ou foi cortada com um dispositivo de perfuração de múltiplos orifícios de fabricação personalizada, em que o padrão do orifício de perfuração é compatível com placas de microtitulação multipoços padrão ou a seção foi removida da amostra. A amostra pode ser de têxtil, papel, metal ou outro material adequado. A amostra menor pode ter a mancha afixada antes de ou após ser colocada no poço de uma placa de microtitulação de 24, 48 ou 96 poços. A amostra menor pode ser também produzida por aplicação de uma mancha a um pequeno pedaço de material. Por exemplo, a amostra menor pode ser um pedaço de tecido manchado de 5/8" ou 0,25" ou 5,5 mm de diâmetro. A perfuração personalizada é desenhada de uma tal maneira que entregue 96 amostras simultaneamente a todos os poços de uma placa de 96 poços. O dispositivo permite entrega de mais do que uma amostra por poço por carga simples da mesma placa de 96 poços múltiplas vezes. Os dispositivos de perfuração de múltiplos orifícios podem ser concebidos para entregar simultaneamente amostras a qualquer placa de formato, incluindo, mas não se limitando a placas de 24 poços, 48 poços e 96 poços. Em outro método concebível, a plataforma de teste suja pode ser um grânulo ou azulejo fabricado de metal, plástico, vidro,

cerâmica ou outro material adequado que é revestido com o substrato de solo. O um ou mais grânulos ou ladrilhos revestidos são, então, colocados em poços de placas de 96, 48 ou 24 poços ou formatos maiores, contendo tampão adequado e enzima. Em outros métodos concebíveis, o tecido manchado é exposto à enzima manchando a solução de enzima no tecido, molhando a amostra fixada a um dispositivo de retenção ou imergindo a amostra em uma solução maior contendo enzima.

[0060] "Porcentagem de identidade de sequência" significa que uma sequência particular tem pelo menos uma determinada porcentagem de resíduos de aminoácido idênticos àqueles em uma sequência de referência especificada, quando alinhadas com o uso do algoritmo CLUSTAL W com parâmetros padrão. Ver Thompson *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680. Os parâmetros padrão para o algoritmo CLUSTAL W são:

Penalidade de abertura de lacuna:	10,0
Penalidade de extensão de lacuna:	0,05
Matriz de peso de proteína:	Série BLOSUM
Matriz de peso de DNA:	IUB
% de atraso de sequências divergentes:	40
Distância de separação da lacuna:	8
Peso de transições de DNA:	0,50
Listar resíduos hidrofílicos:	GPSNDQEKR
Usar matriz negativa:	DESLIGADO
Alternar penalidades específicas para resíduos:	LIGADO
Alternar penalidades hidrofílicas:	LIGADO
Alternar penalidade de separação de lacuna final	DESLIGADO

[0061] As deleções são contadas como resíduos não idênticos, em comparação com uma sequência de referência.

[0062] O termo "cerca de" refere-se a $\pm 15\%$ do valor referido.

2. Aspectos e modalidades das presentes composições e métodos

[0063] Os parágrafos a seguir descrevem em detalhes vários aspectos e modalidades das presentes composições e métodos.

2.1. Variantes de α -amilase com resistência melhorada a quelantes

[0064] A triagem foi realizada em dois modelos α -amilases de Família 13 CAZy para identificar variantes com estabilidade melhorada na presença de quelante de ácido etidrônico 5 mM (HEDP). As substituições de aminoácidos com estabilidade melhorada do quelante foram encontradas em uma região estrutural particular de ambas as proteínas, região essa que está intimamente associada ao sítio de ligação de cálcio.

[0065] Sem estar limitado a uma teoria, é postulado que a alça formada pelos resíduos 185-210, correspondendo à sequência de aminoácidos de BspAmy24 α -amilase (SEQ ID NO: 1), e a 182-207, correspondendo à sequência de aminoácidos de CspAmy2 α -amilase (SEQ ID NO: 2), forma um berço para o sítio de ligação de Ca^{2+} - Na^{+} - Ca^{2+} (Figura 2). Essa alça 185-210, da qual a maioria dos ligantes metálicos se originam, circunda o sítio de ligação de íon metálico e pode ser manipulada para modular a estabilidade na presença de quelantes. É argumentado que, na presença de quelante, a remoção dos íons metálicos torna a alça 185-210 sujeita à deformação, reduzindo assim a barreira de ativação para o desdobraimento geral da proteína. As interações intramoleculares que estabilizam a conformação dobrada dos resíduos 185-210 e o posicionamento dessa alça em relação às regiões de estrutura secundária espacialmente adjacentes (isto é, resíduos 104-184, 211-230, 236-257, e 272-284) podem estabilizar a enzima dobrada após a perda de íons para o quelante.

[0066] Na verdade, verificou-se que várias substituições que alteram a liberdade conformacional da alça 185-210 ou as interações da

alça 185-210 no contexto das regiões adjacentes da estrutura da proteína fornecem grandes aumentos na estabilidade de um quelante detergente comum. Verificou-se que essas interações promovem estabilidade ao quelante em duas α -amilases diferentes que compartilham identidade de sequência de aminoácidos de menos de 70%, indicando que a estratégia é amplamente aplicável a α -amilases de família 13 CAZy.

[0067] Especificamente, as presentes composições e métodos abrangem mutações de aminoácidos que resultam em uma alteração na cadeia lateral de um resíduo de aminoácido que não é um ligante de um íon de cálcio ou sódio, mas está perto do sítio de cálcio (isto é, tem pelo menos um átomo dentro de 12 Å de um átomo do sítio de metal Ca^{2+} - Na^+ - Ca^{2+}) e os mesmos são capazes de alterar a liberdade conformacional ou a ligação de hidrogênio, empilhamento pi ou interações de van der Waals que estabilizam a conformação dobrada da referida alça estrutural que circunda o sítio de Ca^{2+} - Na^+ - Ca^{2+} .

[0068] Um modelo de α -amilase usado para exemplificar as presentes composições e métodos é uma α -amilase de *Bacillus* sp., aqui referida como "BspAmy24 α -amilase" ou simplesmente "BspAmy24". A sequência de aminoácidos de BspAmy24 α -amilase é mostrada, abaixo, como SEQ ID NO: 1:

```
HHNGTNGTMM QYFEWHL PND GQHWNR LRND AANLKN LGIT AVWIPPAWK G
TSQNDVGYGA YDLYDLGEFN QKGTIRTKYG TRSQLQSAIA SLQNNGIQVY
GDVVMNHKGG ADGTEWVQAV EVNPSNRNQE VTGEYTIEAW TKFDFPGRGN
THSSFKWRWY HFDGTDWDQS RQLNNRIYKF RGTGKAWDWE VDTENGNYDY
LMYADVDM DH PEVINELRRW GWYTNLNL DGFRIDAVKH IKYSFTRDWL
NHVRSTTGKN NMFVAEFWK NDLGAIENYL HKTWNHHSVF DVPLHYNLYN
ASKSGGNYDM RQILNGTVVS KHPIHAVTFV DNHDSQPAEA LESFVEAWFK
PLAYALILTR EQGYPSV FYG DYYGIPT HGV AAMK GKIDPI LEARQKYAYG
TQHDYLDHHN IIGWTREGNS AHPNSGLATI MSDGPGGSKW MYVGRHKAGQ
VWRDITGNRT GTVTINADGW GNFSVNGGSV SIWVNK
```

[0069] Um segundo modelo de α -amilase usado para exemplificar

as presentes composições e métodos é uma α -amilase de *Cytophaga* sp., aqui referida como "CspAmy2 α -amilase" ou simplesmente "CspAmy2". A sequência de aminoácidos de CspAmy2 α -amilase é mostrada, abaixo, como SEQ ID NO: 2:

```
AATNGTMMQY FEWYVPNDGQ QWNRLRTDAP YLSSVGITAV WTPPAYKGTS
QADVGYPYD LYDLGEFNQK GTVRTKYGTK GELKSAVNLT HSNGIQVYGD
VVMNHKAGAD YTENVTAVEV NPSNRNQETS GEYNIQAWTG FNFPGRGTTY
SNFKWQWFHF DGTDWDQSRS LSRIFKFRGT GKAWDWEVSS ENGNYDYLMY
ADIDYDHPDV VNEMKKWGVW YANVGLDGY RLDVAVKHIF SFLKDWVDNA
RAATGKEMFT VGEYWQNDLG ALNNYLAKVN YNQSLFDAPL HYNFYAASTG
GGYYDMRNIL NNTLVASNPT KAVTLVENHD TQPGQSLEST VQPWFKPLAY
AFILTRSGGY PSVFGDMYG TKGTTTREIP ALKSKIEPLL KARKDYAYGT
QRDYIDNPDV IGWTREGDST KAKSGLATVI TDGPGGSKRM YVGTSNAGEI
WYDLTGNRTD KITIGSDGYA TFPVNGGSVS VVVQQ
```

[0070] Em algumas modalidades, a α -amilase variante tem pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou mesmo pelo menos 99% de identidade de sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO: 1 e/ou SEQ ID NO: 2, excluindo as enzimas BspAmy24 e CspAmy2 de tipo selvagem, e variantes conhecidas das mesmas.

[0071] Sabe-se que muitas α -amilases bacterianas (e outras) compartilham a mesma dobra e frequentemente se beneficiam das mesmas mutações. No presente caso, as posições de aminoácidos correspondentes em outras α -amilases podem ser facilmente identificadas pelo alinhamento da sequência de aminoácidos com BspAmy24 e CspAmy2, com o uso de Clustal W com parâmetros padrão. As α -amilases nas quais as mutações anteriores são susceptíveis de produzir um benefício de desempenho, incluem aquelas com uma dobra similar e/ou com 60% ou mais de identidade de sequência de aminoácidos com qualquer uma das bem conhecidas α -

amilases de *Bacillus* (por exemplo, de *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquifaciens*, *Bacillus* sp. SP722 e similares), banco de dados de enzimas carboidrato ativas (CAZy) α -amilases de Família 13, ou qualquer amilase que tenha sido até agora referida pelo termo descritivo, "tipo Termamil". O leitor apreciará que, quando uma α -amilase naturalmente tem uma mutação listada acima (isto é, quando a α -amilase de tipo selvagem já compreendia um resíduo identificado como uma mutação), então, essa mutação particular não se aplica a essa α -amilase. Entretanto, outras mutações descritas podem funcionar em combinação com o resíduo ocorrendo naturalmente nessa posição.

2.2 Mutações adicionais

[0072] Em algumas modalidades, além de uma ou mais das mutações descritas acima (por exemplo, na Seção 2.1), as presentes α -amilases incluem ainda uma ou mais mutações que fornecem um desempenho adicional ou benefício de estabilidade. Benefícios de desempenho exemplares incluem, sem limitação, hidrólise aumentada de um substrato de amido, desempenho de liquefação de grãos, cereais ou outro substrato de amido, desempenho de limpeza aumentado, estabilidade térmica aumentada, estabilidade de armazenamento aumentada, solubilidade aumentada, perfil de pH alterado, dependência de cálcio diminuída, atividade específica aumentada, especificidade de substrato modificada, ligação de substrato modificada, atividade dependente de pH modificada, estabilidade dependente de pH modificada, estabilidade oxidativa aumentada e expressão aumentada. Em alguns casos, o benefício de desempenho é realizado a uma temperatura relativamente baixa. Em alguns casos, o benefício de desempenho é realizado a uma temperatura relativamente elevada.

[0073] Em algumas modalidades, as presentes variantes de α -amilase ainda têm pelo menos uma mutação na alça de ligação de

cálcio com base no trabalho de Suzuki *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264:18933-938. Mutações exemplificadoras incluem uma deleção ou substituição em um ou mais resíduos correspondentes às posições 181, 182, 183 e/ou 184 na SEQ ID NO: 1 e/ou 2. Em modalidades particulares, a mutação corresponde à deleção de 181 e 182 ou 183 e 184 (com o uso de SEQ ID NO: 1 e/ou 2 para numeração). Os resíduos homólogos em outras α -amilases podem ser determinados por alinhamento estrutural ou por alinhamento da estrutura primária.

[0074] Em algumas modalidades, as presentes variantes de α -amilase ainda têm pelo menos uma mutação conhecida por produzir um benefício de desempenho, estabilidade ou solubilidade em outras α -amilases microbianas, incluindo, sem limitação, àquelas com uma dobra similar e/ou que têm 60% ou maior identidade de sequência de aminoácidos com SEQ ID NO: 1 e/ou 2, banco de dados de enzimas ativas de carboidratos (CAZy) amilases de família 13, ou qualquer amilase que até agora foi referida pelo termo descritivo, "tipo Termamil". A identidade da sequência de aminoácidos pode ser determinada com o uso de Clustal W com parâmetros padrão.

[0075] As presentes α -amilases podem incluir qualquer número de substituições conservativas de aminoácidos. Substituições de aminoácidos conservativas são listadas na Tabela 2:

Tabela 2. Substituições conservativas de aminoácidos

Aminoácido	Código	Substituir por qualquer um dentre:
Alanina	A	D-Ala, Gly, β -Ala, L-Cys, D-Cys
Arginina	R	D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Asparagina	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Ácido Aspártico	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Cisteína	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Glutamina	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Ácido Glutâmico	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln

Aminoácido	Código	Substituir por qualquer um dentre:
Glicina	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, β -Ala, Acp
Isoleucina	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Leucina	L	D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Lisina	K	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Metionina	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Fenilalanina	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4, ou 5-fenilprolina, <i>cis</i> -3,4, ou 5-fenilprolina
Prolina	P	D-Pro, ácido L-I-tioazolidina-4-carboxílico, ácido D- ou L-1-oxazolidina-4-carboxílico
Serina	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Treonina	T	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Tirosina	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Valina	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

[0076] Será apreciado que algumas das mutações conservativas mencionadas acima podem ser produzidas por manipulação genética, enquanto outras são produzidas por introdução de aminoácidos sintéticos em um polipeptídeo por genética ou outro meio.

[0077] A presente amilase pode ser também derivada de qualquer uma das variantes de amilase descritas acima por substituição, deleção ou adição de um ou vários aminoácidos na sequência de aminoácidos, por exemplo menos do que 10, menos do que 9, menos do que 8, menos do que 7, menos do que 6, menos do que 5, menos do que 4, menos do que 3 ou mesmo menos do que 2 substituições, deleções ou adições. Tais variantes devem ter a mesma atividade que a amilase a partir da qual foram derivadas. Deleções particulares incluem truncamentos N-terminal e/ou C-terminal de um ou alguns resíduos de aminoácidos, por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5 resíduos de aminoácidos.

[0078] A presente amilase pode ser "precursora", "imatura" ou "de comprimento total", caso em que incluem uma sequência de sinal ou "madura", caso em que falta uma sequência de sinal. As formas maduras dos polipeptídeos são geralmente as mais úteis. Salvo indicação em contrário, a numeração de resíduos de aminoácidos aqui utilizada se refere às formas maduras dos respectivos polipeptídeos de amilase. Os presentes polipeptídeos de amilase podem ser também truncados para se removerem aos terminais N ou C, desde que os polipeptídeos resultantes retenham atividade de amilase.

[0079] A presente amilase pode ser um polipeptídeo "quimérico", "híbrido" ou "troca de domínio", em que inclui pelo menos uma porção de um primeiro polipeptídeo de amilase, e pelo menos uma porção de um segundo polipeptídeo de amilase. As presentes α -amilases podem ainda incluir sequência de sinal heteróloga, um epítopo para permitir rastreamento ou purificação, ou similares. Sequências de sinal heterólogas exemplificadoras são de amilase de *B. licheniformis* (LAT), *B. subtilis* (AmyE ou AprE), e *Streptomyces* Cella.

2.3. Nucleotídeos codificando polipeptídeos de amilase variantes

[0080] Em outro aspecto são proporcionados ácidos nucleicos codificando um polipeptídeo de amilase variante. O ácido nucleico pode codificar um polipeptídeo de amilase particular ou uma amilase tendo um grau especificado de identidade de sequências de aminoácidos com a amilase particular.

[0081] Em algumas modalidades, o ácido nucleico codifica uma amilase tendo pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou mesmo pelo menos 99% de identidade de sequências de aminoácidos com SEQ ID NO: 1 e/ou 2. Será apreciado que, devido à degeneração do código genético, uma pluralidade de ácidos nucleicos pode codificar o mesmo polipeptídeo.

3. Agentes quelantes exemplificadores

[0082] Uma questão importante na formulação e uso de compostos de limpeza é a dureza da água, principalmente devido à presença de íons metálicos cálcio, magnésio, ferro e manganês. Esses íons metálicos interferem na capacidade de limpeza dos tensoativos e podem resultar em quantidades significativas de precipitado com os tensoativos. Agentes quelantes (também chamados de quelantes) combinam-se com íons metálicos para impedir a precipitação com tensoativos. Infelizmente, os íons metálicos são frequentemente necessários para a atividade enzimática, tornando a formulação de composições detergentes um compromisso inevitável.

[0083] Trainda, o tipo mais comum de agentes quelantes usados em compostos de limpeza industrial são os fosfatos. Os fosfatos foram proibidos nos Estados Unidos e Europa devido ao fato de que reentram no meio ambiente sem alterações, mesmo após o tratamento de esgoto, e causam esgotamento do oxigênio nos cursos de água. No entanto, os fosfatos ainda são usados em muitos países e as presentes composições e métodos são totalmente compatíveis com quelantes à base de fosfato.

[0084] Quelantes mais ecológicos, com os quais as presentes composições e métodos são compatíveis, incluem, sem limitação, ácido etileno-diamina-tetra-acético (EDTA), ácido dietileno triamina penta metileno fosfônico (DTPMP), ácido hidroxietano difosfônico (HEDP), ácido etilendiamina N,N'-dissuccínico (EDDS), ácido metil glicina diacético (MGDA), ácido glutâmico ácido N, N-diacético (ácido N, N-dicarboximetil glutâmico, sal tetrassódico (GLDA), ácido dietilenotriamina penta acético (DTPA), ácido propilenodiaminotetracético (PDTA), 2-hidroxipiridina-N-óxido (HPNO), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido 4,5-di-hidroxi-m-benzenossulfônico, ácido N-hidroxietilendiaminotriacético (HEDTA), ácido

trietilenotetramina-hexa-acético (TTHA), ácido N-hidroxi-etiliminodiacético (HEIDA), di-hidroxi-etilglicina (DHEG), ácido etilenodiaminotetrapropiônico (EDTP), citrato e gluconato (e quaisquer sais dos mesmos) e derivados dos compostos mencionados acima.

4. Produção de α -amilases variantes

[0085] As presentes α -amilases variantes podem ser produzidas em células hospedeiras, por exemplo, por secreção ou expressão intracelular, usando métodos bem conhecidos na técnica. Técnicas de fermentação, separação e concentração são bem conhecidas na técnica e métodos convencionais podem ser usados para preparar uma solução concentrada contendo polipeptídeo variante- α -amilase.

[0086] Para recuperação à escala da produção, os polipeptídeos de α -amilase variantes podem ser enriquecidos ou parcialmente purificados como geralmente descrito acima por remoção de células através de floculação com polímeros. Alternativamente, a enzima pode ser enriquecida ou purificada por microfiltração seguida por concentração por ultrafiltração usando membranas e equipamentos disponíveis. No entanto, para algumas aplicações, a enzima não necessita de ser enriquecida ou purificada e a cultura de caldo inteira pode ser lisada e usada sem tratamento adicional. A enzima pode ser depois processada, por exemplo, em grânulos.

5. Composições de processamento de carboidratos e usos envolvendo α -amilases variantes

[0087] As presentes α -amilases variantes são úteis para uma variedade de aplicações de processamento de carboidratos que são bem conhecidas na técnica. Tal aplicação pode envolver o uso de quelantes, incluindo, sem limitação àqueles listados no presente documento, especialmente quando o abastecimento de água disponível local é particularmente difícil. Aplicações exemplificadoras incluem a produção de etanol combustível, produção de xarope e a produção de

outros produtos bioquímicos valiosos.

5.1. Preparação de substratos de amido

[0088] Métodos para preparação de substratos de amido para uso nos processos divulgados aqui são bem conhecidos. Substratos de amido úteis podem ser obtidos a partir de, por exemplo, tubérculos, raízes, caules, leguminosas, cereais ou grão inteiro. Mais especificamente, o amido granular pode ser obtido a partir de milho, espiga, trigo, cevada, centeio, triticale, milho, sagu, milheto, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, ervilha, feijão, banana ou batata. Substratos de amido especificamente contemplados são amido de milho e amido de trigo. O amido de um grão pode ser triturado ou inteiro e inclui sólidos do milho, tais como miolos, farelo e/ou sabugos. O amido pode também ser amido bruto altamente refinado ou matéria-prima de processos de refinaria de amido.

5.2. Gelatinização e liquefação de amido

[0089] A gelatinização é geralmente realizada simultaneamente com, ou seguida por, contato de um substrato de amido com uma α -amilase, embora possam ser adicionadas opcionalmente enzimas indutoras da liquefação. Em algumas modalidades, o substrato de amido preparado conforme descrito acima é misturado com água. A liquefação também pode ser realizada em ou abaixo das temperaturas de liquefação, como em um "cozimento a frio" ou "nenhum processo de cozimento".

5.3. Sacarificação

[0090] O amido liquefeito pode ser sacarificado em um xarope que é rico em sacarídeos de DP inferior (*por exemplo*, DP1 + DP2), com o uso de α -amilases variantes, opcionalmente na presença de outra enzima (ou enzimas). A composição exata dos produtos de sacarificação depende da combinação de enzimas usada, bem como do tipo de amido granular processado. A sacarificação e fermentação

podem ser realizadas simultaneamente ou de forma sobreposta (consulte abaixo).

5.4. Isomerização

[0091] O hidrolisado de amido solúvel produzido por tratamento com amilase pode ser convertido em xarope à base de amido com elevado teor de frutose (HFSS), tal como xarope de milho com elevado teor de frutose (HFCS). Esta conversão pode ser alcançada usando uma glicose isomerase, particularmente uma glicose isomerase imobilizada em um suporte sólido.

5.5. Fermentação

[0092] O hidrolisado de amido solúvel, particularmente um xarope rico em glicose, pode ser fermentado pelo contato do hidrolisado de amido com um organismo em fermentação. Os produtos de EOF incluem metabolitos, tais como ácido cítrico, ácido láctico, ácido succínico, glutamato monossódico, ácido glucônico, gluconato de sódio, gluconato de cálcio, gluconato de potássio, ácido itacônico e outros ácidos carboxílicos, glucono delta-lactona, eritorbato de sódio, lisina e outros aminoácidos, ácido graxo de ômega 3, butanol, isopreno, 1,3-propanodiol e outros biomateriais.

[0093] Os micro-organismos etanologênicos incluem leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* e bactérias, como *Zymomonas mobilis*, que expressam álcool desidrogenase e piruvato descarboxilase. As cepas melhoradas de microrganismos etanologênicos são conhecidas na técnica. Fontes comerciais de levedura incluem ETHANOL RED® (LeSaffre); FERMAX™ (Martrex), THERMOSACC®, TRANSFERM® Yield+ e YP3™ (Lallemand); RED STAR® (Red Star); FERMIOL® (DSM Specialties); SUPERSTART® (Alltech); e SYNERXIA® e SYNERXIA® Thrive (DuPont Industrial Biosciences). Micro-organismos que produzem outros metabólitos, como ácido cítrico e ácido láctico, por fermentação, também são conhecidos na técnica.

5.6. Composições de processamento de carboidratos que compreendem α -amilases variantes e enzimas adicionais

[0094] As presentes α -amilases variantes podem ser combinadas com uma glucoamilase (EC 3.2.1.3), de *por exemplo*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Clostridium*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Thermomyces*, *Athelia*, *Humicola*, *Penicillium*, *Artomyces*, *Gloeophyllum*, *Pycnoporus*, *Steccherinum*, *Trametes* etc. Glucoamilases comerciais adequadas incluem AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER e AMG™ E (Novozymes); OPTIDEX® 300 e OPTIDEX L-400 (DuPont Industrial Biosciences); AMIGASE™ e AMIGASE™ PLUS (DSM); G-ZYME® G900 (Enzyme Bio-Systems); e G-ZYME® G990 ZR.

[0095] Outras enzimas adequadas que podem ser usadas com amilase incluem fitase, protease, pululanase, β -amilase, isoamilase, α -glucosidase, celulase, xilanase, outras hemicelulases, β -glucosidase, transferase, pectinase, lipase, cutinase, esterase, mananase, enzimas redox, uma α -amilase diferente ou uma combinação das mesmas.

[0096] As composições que compreendem as presentes α -amilases podem ser formulações aquosas ou não aquosas, grânulos, pós, géis, pastas fluidas, pastas, etc., que podem compreender ainda qualquer uma ou mais das enzimas adicionais listadas, neste documento, juntamente com tampões, sais, conservantes, água, cossolventes, tensoativos e similares. Tais composições podem funcionar em combinação com enzimas endógenas ou outros ingredientes já presentes em uma pasta semifluida, banho de água, máquina de lavar, produto alimentar ou de bebida, etc., por exemplo, enzimas vegetais endógenas (incluindo de alga), enzimas residuais de um passo de processamento prévio e similares.

6. Composições e métodos para preparação de alimentos e rações

[0097] As presentes composições e métodos variantes também são compatíveis com aplicações de alimentos e rações envolvendo o uso de quelantes, incluindo, sem limitação, aqueles listados no presente documento. Essas aplicações incluem a preparação de produtos alimentares, rações para animais e/ou aditivos alimentares/alimentares. Uma aplicação exemplificadora, principalmente para o benefício dos humanos, é a panificação.

7. Composições de fabricação de cerveja

[0098] As presentes composições e métodos também são aplicáveis a aplicações de fabricação de cerveja envolvendo o uso de quelantes, incluindo, sem limitação, aqueles listados no presente documento. Embora a água dura seja frequentemente desejável para produzir certos estilos e variedades de cerveja (ou produtos destilados dos mesmos), pode ser desejável reduzir a dureza da água local para permitir a produção local de outros tipos e variedades de cerveja.

8. Composições de desengomagem de têxteis

[0099] Também estão contemplados o uso das presentes composições e métodos para o tratamento de tecidos (por exemplo, para remover o tamanho de um têxtil) em aplicações envolvendo o uso de quelantes, incluindo, sem limitação, aqueles listados no presente documento, especialmente quando os suprimentos de água disponíveis locais são particularmente difíceis. Métodos de tratamento de tecidos são bem conhecidos na técnica (consulte, por exemplo, Patente nº US 6.077.316). O tecido pode ser tratado com a solução sob pressão.

9. Composições de limpeza

[00100] Um aspecto das presentes composições e métodos é uma composição de limpeza que inclui quelantes, incluindo, sem limitação, aqueles listados no presente documento como componentes. Tais aplicações incluem, por exemplo, lavagem das mãos, lavagem de roupa, lavagem de louça e outras limpezas de superfícies duras. As

composições correspondentes incluem líquido pesado (HDL), seco pesado (HDD), composições de detergente para a roupa e manuais (manuais), incluindo composições de detergente para a roupa em formato de dose unitária, composições para lavagem automática de louça (ADW) e manual (manual), incluindo a unidade composições para lavagem de louça em formato de dose.

9.1. Visão geral

[00101] Os presentes polipeptídeos de amilase podem ser um componente de uma composição de detergente que compreende quelantes, como a única enzima ou com outras enzimas incluindo outras enzimas amilolíticas. O mesmo pode ser incluído na composição de detergente na forma de um granulado que não forma pó, um líquido estabilizado ou uma enzima protegida.

[00102] A composição de detergente pode estar em qualquer forma útil, por exemplo, como pós, grânulos, pastas, barras ou líquido. Um detergente líquido pode ser aquoso, tipicamente contendo até cerca de 70% de água e 0% a cerca de 30% de solvente orgânico. Pode estar também na forma de um tipo de gel compacto contendo somente cerca de 30% de água. A composição de detergente compreende um ou mais tensoativos, cada um dos quais pode ser aniônico, não iônico, catiônico ou zwitteriônico. A composição de detergente pode compreender ainda uma ou mais outras enzimas, como proteases, outra enzima amilolítica, mananase, cutinase, lipase, celulase, pectato liase, peridrolase, xilanase, peroxidase e/ou lacase em qualquer combinação.

[00103] Formas particulares de composições de detergente para inclusão da presente α -amilase são descritas, em baixo. Muitas destas composições podem ser proporcionadas em formato de dose unitária para facilidade de uso. As formulações de dose unitária e embalagem são descritas, por exemplo, nos documentos US20090209445A1, US20100081598A1, US7001878B2, EP1504994B1,

WO2001085888A2, WO2003089562A1, WO2009098659A1,
WO2009098660A1, WO2009112992A1, WO2009124160A1,
WO2009152031A1, WO2010059483A1, WO2010088112A1,
WO2010090915A1, WO2010135238A1, WO2011094687A1,
WO2011094690A1, WO2011127102A1, WO2011163428A1,
WO2008000567A1, WO2006045391A1, WO2006007911A1,
WO2012027404A1, EP1740690B1, WO2012059336A1,
US6730646B1, WO2008087426A1, WO2010116139A1 e
WO2012104613A1.

9.2. Composição de detergente para lavanderia líquido pesado (HDL)

[00104] Composições de detergente de lavanderia HDL exemplificadoras incluem um tensoativo detergente (10% a 40% em p/p), incluindo um tensoativo detergente aniônico (selecionado a partir de um grupo de cadeia linear ou ramificada ou aleatória, sulfatos de alquila substituídos ou não substituídos, sulfonatos de alquila, sulfato de alquila alcoxilado, fosfatos de alquila, fosfonatos de alquila, carboxilatos de alquila e/ou misturas dos mesmos), e opcionalmente tensoativo não iônico (selecionado de um grupo de cadeia linear ou ramificada ou aleatória, álcool alquila alcoxilado substituído ou não substituído, por exemplo, um álcool C8-C18 alquila etoxilado e/ou alcoxilatos de C6-C12 alquil fenol), em que a razão em peso entre tensoativo detergente aniônico (com um índice hidrofílico (Hlc) de 6,0 a 9) e tensoativo detergente não iônico é maior que 1:1. Tensoativos detergentes adequados incluem também tensoativos detergentes catiônicos (selecionados de um grupo de compostos de piridínio de alquila, compostos de amônio quaternário de alquila, compostos de sulfônio quaternário de alquila, compostos de sulfônio terciário de alquila e/ou misturas dos mesmos); tensoativos detergentes zwitteriônicos e/ou anfotéricos (selecionados de um grupo de sulfobetaínas de alcanolamina); tensoativos anfotéricos;

tensoativos não iônicos semipolares e misturas dos mesmos.

[00105] A composição pode incluir opcionalmente um polímero de reforço de característica tensoativa consistindo em polímeros anfifílicos de limpeza de graxa alcoxilados (selecionados a partir de um grupo de polímeros alcoxilados com propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas ramificadas, como polialquileniminas alcoxiladas na faixa de 0,05% em peso a 10% em peso) e/ou polímeros de enxerto aleatório (tipicamente que compreende de estrutura hidrofílica que compreende monômeros selecionados do grupo que consiste em: ácidos carboxílicos C1-C6 insaturados, éteres, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, unidades de açúcar, unidades de alcóxi, anidrido maleico, poliálcoois saturados, como glicerol e misturas dos mesmos; e cadeia (ou cadeias) lateral hidrofóbica selecionada do grupo que consiste em: grupo alquila C4-C25, polipropileno, polibutileno, éster de vinila de um ácido monocarboxílico C1-C6 saturado, éster de alquila C1-C6 de ácido acrílico ou metacrílico e misturas dos mesmos.

[00106] A composição pode incluir polímeros adicionais, como polímeros de liberação de sujeira (incluem poliésteres terminados anionicamente, por exemplo SRP1, polímeros que compreendem pelo menos uma unidade monomérica selecionada de sacarídeo, ácido dicarboxílico, polioliol e combinações dos mesmos, em configuração aleatória ou em bloco, tereftalato de etileno polímeros à base de e copolímeros dos mesmos em configuração aleatória ou em bloco, por exemplo, Repel-o-tex SF, SF-2 e SRP6, Texcare SRA100, SRA300, SRN100, SRN170, SRN240, SRN300 e SRN325, Marloquest SL), polímeros antirredeposição (0,1% em peso a 10% em peso, incluem polímeros de carboxilato, como polímeros que compreendem pelo menos um monômero selecionado de ácido acrílico, ácido maleico (ou anidrido maleico), ácido fumárico, ácido itacônico, ácido aconítico, ácido mesacônico, ácido citracônico, ácido metilenomalônico e qualquer

mistura dos mesmos, homopolímero de vinilpirrolidona e/ou polietileno glicol, peso molecular na faixa de 500 a 100.000 Da); polímero celulósico (incluindo aqueles selecionados a partir de alquil celulose, alquil alcoialquil celulose, carboxialquil celulose, alquil carboxialquil celulose exemplos dos quais incluem carboximetil celulose, metil celulose, metil hidroxietil celulose, metil carboximetil celulose e misturas dos mesmos) e carboxilato polimérico (como copolímero aleatório de maleato/acrilato ou homopolímero de poliacrilato).

[00107] A composição pode incluir ainda ácido graxo saturado ou insaturado, preferencialmente ácido graxo C12-C24 saturado ou insaturado (0% em peso a 10% em peso); auxiliares da deposição (exemplos para os quais incluem polissacarídeos, preferencialmente polímeros celulósicos, haletos de amônio de polidialildimetila (DADMAC) e copolímeros de DAD MAC com pirrolidona de vinila, acrilamidas, imidazóis, haletos de imidazólio e misturas dos mesmos, em configuração em blocos ou aleatória, goma-guar catiônica, celulose catiônica tal como celulose de hidroxietila catiônica, amido catiônico, poliacilamidas catiônicas e misturas dos mesmos.

[00108] A composição pode ainda incluir agentes inibidores de transferência de corante, exemplos dos quais incluem manganês ftalocianina, peroxidases, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona e N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas e polivinilimidazóis e/ou misturas dos mesmos.

[00109] A composição inclui preferencialmente enzimas (geralmente cerca de 0,01% em peso de enzima ativa a 0,03% em peso de enzima ativa) selecionadas a partir de α -amilases (incluindo as presentes α -amilases e opcionalmente outras α -amilases), proteases, lipases, celulasas, colina oxidases, peroxidases/oxidases, pectato liases, mananases, cutinases, lacases, fosfolipases, lisofosfolipases,

aciltransferases, peridrolases, arilesterases e qualquer mistura das mesmas. A composição pode incluir um estabilizante de enzima (exemplos dos quais incluem polióis como propilenoglicol ou glicerol, açúcar ou álcool de açúcar, ácido láctico, inibidor de protease reversível, ácido bórico ou um derivado de ácido bórico, por exemplo, um éster de borato aromático ou um derivado de ácido fenilborônico, como ácido 4-formilfenilborônico).

[00110] A composição inclui opcionalmente supressores de bolhas à base de ácidos graxos ou silicone; corantes de matização, cátions de cálcio e magnésio, ingredientes de sinalização visual, antiespumante (0,001% em peso a cerca de 4,0% em peso) e/ou estruturante/espessante (0,01% em peso a 5% em peso, selecionados do grupo consistindo em diglicerídeos e triglicerídeos, diestearato de etilenoglicol, celulose microcristalina, materiais à base de celulose, celulose de microfibras, biopolímeros, goma-xantana, goma-gelana e misturas dos mesmos).

[00111] A composição pode ser qualquer forma líquida, por exemplo uma forma em líquido ou gel ou qualquer combinação dos mesmos. A composição pode estar em qualquer forma de dose unitária, por exemplo uma bolsa.

9.3. Composição de detergente para lavanderia seco/sólido (HDD) de serviço pesado

[00112] Composições de detergente de lavanderia de HDD exemplificadores incluem um tensoativo detergente, incluindo tensoativos detergentes aniônicos (*por exemplo*, cadeia linear ou ramificada ou aleatória, sulfatos de alquila substituídos ou não substituídos, sulfonatos de alquila, sulfato de alquila alcoxilado, fosfatos de alquila, fosfonatos de alquila, carboxilatos de alquila e/ou misturas dos mesmos), tensoativo detergente não iônico (*por exemplo*, cadeia linear ou ramificada ou aleatória, etoxilatos de C8-C18 alquila substituídos ou não

substituídos e/ou alcoxilatos de fenol C6-C12 alquila), tensoativos deterativos catiônicos (*por exemplo*, compostos de alquil piridínio, compostos de alquil amônio quaternário, compostos de alquil fosfônio quaternário, compostos de alquil sulfônio ternário e misturas dos mesmos), tensoativos deterativos zwitteriônicos e/ou anfotéricos (*por exemplo*, alcanolamina sulfobetaínas), tensoativos anfólicos, tensoativos semipolares não iônicos e misturas dos mesmos; construtores incluindo construtores sem fosfato (por exemplo, exemplos de construtores de zeólito que incluem zeólito A, zeólito X, zeólito P e zeólito MAP na faixa de 0% em peso a menos de 10% em peso), construtores de fosfato (por exemplo tri-polifosfato de sódio na faixa de 0% em peso a menos de 10% em peso), ácido cítrico, sais de citrato e ácido nitrilotriacético, sal de silicato (*por exemplo*, silicato de sódio ou potássio ou metassilicato de sódio na faixa de 0% em peso a menos de 10% em peso, ou silicato em camadas (SKS-6)); sal carbonato (*por exemplo*, carbonato de sódio e/ou bicarbonato de sódio na faixa de 0% em peso a menos de 80% em peso); e agentes de branqueamento, incluindo fotobranqueadores (*por exemplo*, ftalocianinas de zinco sulfonadas, ftalocianinas de alumínio sulfonadas, corantes de xantenos e misturas dos mesmos) ativadores de branqueamento hidrofóbicos ou hidrofílicos (*por exemplo*, sulfonato de dodecanoil oxibenzeno, sulfonato de decanoil oxibenzeno, ácido decanoil oxibenzeno ou sais dos mesmos, sulfonato de 3,5,5-trimetil hexanoil oxibenzeno, tetra-acetil etileno diamina-TAED, sulfonato de nonanoiloxibenzeno -NOBS, fontes de nitrila peróxido, e misturas dos mesmos(*por exemplo*, exemplos de sais de peridrato inorgânico dos quais incluem sal de sódio mono ou tetra-hidrato de perborato, percarbonato, persulfato, perfosfato ou persilicato), perácidos hidrofílicos e/ou hidrofóbicos pré-formados (*por exemplo*, ácidos percarboxílicos e sais, ácidos percarbônicos e sais, ácidos pirimídicos e sais, ácidos peroximonossulfúricos e sais e

misturas dos mesmos) e/ou catalisadores de branqueamento (*por exemplo*, intensificadores de branqueamento de imina (exemplos dos quais incluem cátions e aniões de imínio), zwitteríons de imínio, aminas modificadas, óxidos de amina modificados, N-sulfonil iminas, N-fosfonil iminas, N-acil iminas, dióxidos de tiadiazol, perfluoroiminas, cetonas de açúcar cíclicas e misturas dos mesmos, e catalisadores de branqueamento contendo metal (*por exemplo*, cobre, ferro, titânio, rutênio, tungstênio, molibdênio ou cátions de manganês junto com cátions de metal auxiliar, como zinco ou alumínio).

[00113] A composição inclui preferencialmente enzimas, por exemplo proteases, amilases, lipases, celulases, colina oxidases, peroxidases/oxidases, pectato liases, mananases, cutinases, lacases, fosfolipases, lisofosfolipases, aciltransferase, peridrolase, arilesterase e qualquer mistura das mesmas.

[00114] A composição pode incluir opcionalmente ingredientes de detergente adicionais incluindo microcápsulas de perfume, aroma de perfume encapsulado com amido, agentes de matiz, polímeros adicionais, incluindo polímeros de integridade de tecidos e catiônicos, ingredientes *dye-lock*, agentes de maciez de tecidos, abrilhantadores (por exemplo abrilhantadores fluorescentes C.I.), agentes floculantes, agentes quelantes, poliaminas alcoxiladas, auxiliares de deposição de tecidos e/ou ciclodextrina.

9.4. Composição de detergente para lavagem de louças automática (ADW)

[00115] A composição detergente ADW exemplificadora inclui tensoativos não iônicos, incluindo tensoativos não iônicos etoxilados, tensoativos alcoxilados de álcool, álcoois poli (oxialquilados) capeados com epóxi ou tensoativos de óxido de amina presentes em quantidades de 0 a 10% em peso; construtores na faixa de 5-60%, homopolímeros e copolímeros de ácidos policarboxílicos e sais dos mesmos parcial ou

completamente neutralizados, ácidos policarboxílicos monoméricos e ácidos hidroxicarboxílicos e sais dos mesmos na faixa de 0,5% a 50% em peso; polímeros sulfonados/carboxilados na faixa de cerca de 0,1% a cerca de 50% em peso para fornecer estabilidade dimensional; auxiliares de secagem na faixa de cerca de 0,1% a cerca de 10% em peso (por exemplo, poliésteres, especialmente poliésteres aniônicos, opcionalmente em conjunto com outros monômeros com 3 a 6 funcionalidades - tipicamente funcionalidades de ácido, álcool ou éster que conduzem à policondensação, compostos de policarbonato-, poliuretano- e/ou poliureia-poliorganossiloxano ou compostos precursores, particularmente do tipo carbonato cíclico reativo e ureia); silicatos na gama de cerca de 1% a cerca de 20% em peso (incluindo silicatos de sódio ou potássio, por exemplo dissilicato de sódio, metassilicato de sódio e filossilicatos cristalinos); alvejante inorgânico (por exemplo, sais de peridrato, como perborato, percarbonato, perfosfato, persulfato e sais de persilicato) e alvejante orgânico (por exemplo, peroxiácidos orgânicos, incluindo diacil e tetra-acilperóxidos, especialmente ácido diperoxidodecanodioico, ácido diperoxitetradecanodioico e ácido diperoxi-hexadecanodioico); ativadores de branqueamento (isto é, precursores de perácido orgânico na faixa de cerca de 0,1% a cerca de 10% em peso); catalisadores de branqueamento (por exemplo, triazaciclonoano de manganês e complexos relacionados, bispíridilamina Co, Cu, Mn e Fe e complexos relacionados, e acetato de pentamina cobalto (III) e complexos relacionados); agentes de tratamento de metais na faixa de cerca de 0,1% a 5% em peso (por exemplo, benzotriazóis, sais e complexos de metal e/ou silicatos); enzimas na faixa de cerca de 0,01 a 5,0 mg de enzima ativa por grama de composição de detergente para lava-louças automática (por exemplo, proteases, amilases, lipases, celulases, colina oxidases, peroxidases/oxidases, pectato-liases, mananases, cutinases,

lacases, fosfolipases, lisofosfolipases, aciltransferase, peridrolase, arilesterase e misturas dos mesmos); e componentes do estabilizador de enzima (por exemplo, oligossacarídeos, polissacarídeos e sais de metais divalentes inorgânicos).

9.5. Enzimas adicionais

[00116] Qualquer uma das composições de limpeza contendo quelante descritas no presente documento pode incluir qualquer número de enzimas adicionais. Em geral, a(s) enzima(s) deve(m) ser compatível(eis) com o detergente selecionado (por exemplo, no que diz respeito ao pH ótimo, compatibilidade com outros ingredientes enzimáticos e não enzimáticos e similares), e a(s) enzima(s) deve(m) estar presente(s) em quantidades eficazes. As seguintes enzimas são proporcionadas como exemplos.

[00117] Proteases adequadas incluem aquelas de origem animal, vegetal ou microbiana. São incluídos mutantes quimicamente modificados ou com manipulação de proteínas, bem como proteínas naturalmente processadas. A protease pode ser uma serina protease ou uma metaloprotease, uma protease microbiana alcalina, uma protease tipo tripsina ou uma protease tipo quimotripsina. Exemplos de proteases alcalinas são subtilisinas, especialmente aquelas derivadas de *Bacillus*, por exemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 e subtilisina 168 (consulte, por exemplo, WO 89/06279). Proteases exemplificadoras incluem, sem limitação, aquelas descritas nos documentos WO199523221, WO199221760, WO2008010925, WO20100566356, WO2011072099, WO201113022, WO2011140364, WO2012151534, WO2015038792, WO2015089441, WO2015089447, WO2015143360, WO2016001449, WO2016001450, WO2016061438, WO2016069544, WO2016069548, WO2016069552, WO 2016069557, WO2016069563, WO2016069569, WO2016087617, WO2016087619, WO2016145428, WO2016174234, WO2016183509,

WO2016202835, WO2016205755, US 2008/0090747, US 5.801.039, US 5.340.735, US 5.500.364, US 5.855.625, RE 34.606, US 5.955.340, US 5.700.676, US 6.312.936, US 6.482.628, US 8.530.219, Pedidos Provisórios US 62/331.282, 62/343.618, 62/351.649, 62/437.171, 62/437.174 e 62/437.509, e Pedidos PCT PCT/CN2017/076749 e, bem como metaloproteases descritas nos documentos WO 2007/044.993, WO 2009/058.303, WO 2009/058.661, WO 2014/071.410, WO 2014/194.032, WO 2014/194.034, WO 2014/194.054 e WO 2014/194.117.

[00118] Proteases comerciais exemplificadoras incluem, sem limitação, MAXATASE, MAXACAL, MAXAPEM, OPTICLEAN®, OPTIMASE®, PROPERASE®, PURAFECT®, PURAFECT® OXP, PURAMAX®, EXCELLASE®, proteases PREFERENZ™ (por exemplo, P100, P110, P280), proteases EFFECTENZ™ (por exemplo, P1000, P1050, P2000), proteases EXCELLENZ™ (por exemplo, P1000), ULTIMASE® e PURAFAST (DuPont Industrial Biosciences); ALCALASE®, ALCALASE® ULTRA, BLAZE®, BLAZE® EVITY®, BLAZE® EVITY® 16L, CORONASE®, SAVINASE®, SAVINASE® ULTRA, SAVINASE® EVITY®, SAVINASE® EVERIS®, PRIMASE, DURAZYM, POLARZYME®, OVOZYME®, KANNASE®, LIQUANASE®, EVERIS®, NEUTRASE®, PROGRESS UNO®, RELEASE® e ESPERASE® (Novozymes); variantes BLAP™ e BLAP™ (Henkel); LAVERGY™ PRO 104 L (BASF), e KAP® (B. alkalophilus subtilisin) (Kao). As proteases adequadas incluem proteases de ocorrência natural ou variantes projetadas especificamente selecionadas ou projetadas para trabalhar a temperaturas relativamente baixas.

[00119] Lipases adequadas incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica. São incluídos mutantes quimicamente modificados, proteoliticamente modificados ou com manipulação de proteínas.

Exemplos de lipases úteis incluem, mas não estão limitados a lipases de *Humicola* (sinônimo *Thermomyces*), por exemplo, de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) (consulte, por exemplo, EP 258068 e EP 305216), de *H. insolens* (consulte, por exemplo, WO 96/13580); uma lipase de *Pseudomonas* (por exemplo, de *P. alcaligenes* ou *P. pseudoalcaligenes*; consulte, por exemplo, EP 218 272), *P. cepacia* (consulte, por exemplo EP 331 376), *P. stutzeri* (consulte, por exemplo, GB 1,372,034), *P. fluorescens*, estirpe de *Pseudomonas sp.* SD 705 (consulte, por exemplo, WO 95/06720 e WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (consulte, por exemplo, WO 96/12012); uma lipase de *Bacillus* (por exemplo, de *B. subtilis*; consulte, por exemplo, Dartois *et al.* (1993) *Biochemica et Biophysica Acta* 1131: 253-360), *B. stearothermophilus* (consulte, por exemplo, JP 64/744992) ou *B. pumilus* (consulte, por exemplo, WO 91/16422). Variantes de lipase adicionais contempladas para uso nas formulações incluem aquelas descritas por exemplo em: WO 92/05249, WO 94/01541, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079, WO 97/07202, EP 407225 e EP 260105.

[00120] Lipases comerciais exemplificadoras incluem, sem limitação, M1 LIPASE, LUMA FAST, e LIPOMAX (DuPont Industrial Biosciences); LIPEX®, LIPOCLEAN®, LIPOLASE® e LIPOLASE® ULTRA (Novozymes); e LIPASE P (Amano Pharmaceutical Co. Ltd).

[00121] Poliesterasas: Poliesterasas adequadas podem ser incluídas na composição, tais como aquelas descritas em, por exemplo, WO 01/34899, WO 01/14629 e US6933140.

[00122] As presentes composições podem ser combinadas com outras amilases, incluindo outras α -amilases. Uma tal combinação é particularmente desejável quando diferentes α -amilases demonstram diferentes características de desempenho, e a combinação de uma pluralidade de diferentes α -amilases resulta em uma composição que

proporciona os benefícios das diferentes α -amilases. Outras α -amilases incluem α -amilases comercialmente disponíveis, como, sem limitação, STAINZYME®, NATALASE®, DURAMYL®, TERMAMYL®, FUNGAMYL® e BAN™ (Novo Nordisk A/S e Novozymes A/S); RAPIDASE®, POWERASE®, PURASTAR® e PREFERENZ™ (junto à DuPont Industrial Biosciences). α -Amilases exemplificativas são descritas em WO9418314A1, US20080293607, WO2013063460, WO10115028, WO2009061380A2, WO2014099523, WO2015077126A1, WO2013184577, WO2014164777, W09510603, WO9526397, WO9623874, WO9623873, WO9741213, WO9919467, WO0060060, WO0029560, WO9923211, WO9946399, WO0060058, WO0060059, WO9942567, WO0114532, WO02092797, WO0166712, WO0188107, WO0196537, WO0210355, WO2006002643, WO2004055178 e WO9813481.

[00123] Celulases adequadas incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica. São incluídos mutantes quimicamente modificados ou com manipulação de proteínas. Celulases adequadas incluem celulases dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por exemplo, as celulases fúngicas produzidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* e *Fusarium oxysporum* divulgadas por exemplo nas Patentes nº 4.435.307; 5.648.263; 5.691.178; 5.776.757; e WO 89/09259. Celulases exemplificativas contempladas para uso são aquelas tendo benefício de cuidados da cor para o têxtil. Exemplos de tais celulases são as celulases descritas, por exemplo, nos documentos EP 0495257, EP 0531372, WO 96/11262, WO 96/29397 e WO 98/08940. Outros exemplos são variantes de celulase, tais como aquelas descritas nos documentos WO 94/07998; WO 98/12307; WO 95/24471; PCT/DK98/00299; EP 531315; Patentes nº US 5.457.046; 5.686.593; e 5.763.254. Celulases exemplificativas incluem aquelas descritas nos documentos WO2005054475,

WO2005056787, US 7.449.318, US 7.833.773, US 4.435.307; EP 0495257; e Pedidos Provisórios nº US 62/296.678 e 62/435340. Celulases comerciais exemplificadoras incluem, sem limitação, CELLUCLEAN®, CELLUZIME®, CAREZYME®, CAREZYME® PREMIUM, ENDOLASE®, e RENOZYME® (Novozymes); REVITALENZ®100, REVITALENZ® 200/220 e REVITALENZ® 2000 (DuPont Industrial Biosciences); e KAC-500(B) (Kao Corporation).

[00124] Mananases exemplificadoras incluem, sem limitação, aquelas de origem bacteriana ou fúngica, como, por exemplo, descrito nos documentos WO2016007929; USPNs 6.566.114, 6.602.842 e 6.440.991; e Pedidos Internacionais PCT/US2016/060850 e PCT/US2016/060844. Mananases exemplificadoras incluem, sem limitação, aquelas de origem bacteriana ou fúngica, como, por exemplo, como é descrito nos documentos WO2016007929; USPNs 6566114, 6.602.842 e 6.440.991; e Pedidos Internacionais PCT/US2016/060850 e PCT/US2016/060844.

[00125] Peroxidases/oxidases adequadas contempladas para uso nas composições incluem aquelas de origem vegetal, bacteriana ou fúngica. São incluídos mutantes quimicamente modificados ou com manipulação de proteínas. Exemplos de peroxidases úteis incluem peroxidases de *Coprinus*, por exemplo, de *C. cinereus* e suas variantes como aquelas descritas em WO 93/24618, WO 95/10602 e WO 98/15257. Peroxidases comercialmente disponíveis incluem por exemplo GUARDZYME™ (Novo Nordisk A/S e Novozymes A/S).

[00126] A composição de detergente pode também compreender 2,6-β-D-frutana hidrolase, que é eficaz para remoção/limpeza do biofilme presente em têxtil/roupa doméstico e/ou industrial.

[00127] A(s) enzima(s) de detergente pode(m) ser incluída(s) em uma composição de detergente por adição de aditivos separados contendo uma ou mais enzimas ou por adição de um aditivo combinado

compreendendo todas estas enzimas. Um aditivo de detergente, isto é, um aditivo separado ou um aditivo combinado, pode ser formulado, por exemplo, como um granulado, um líquido, uma pasta semifluida e similares. Formulações de aditivo de detergente exemplificativas incluem, mas não estão limitados a granulados, em particular granulados sem pulverização, líquidos, em particular líquidos ou pastas semifluidas estabilizadas.

[00128] A composição de detergente pode estar em qualquer forma conveniente, por exemplo, uma barra, um comprimido, um pó, um grânulo, uma pasta ou um líquido. Um detergente líquido pode ser aquoso, tipicamente contendo até cerca de 70% de água e 0% a cerca de 30% de solvente orgânico. Géis de detergente compactos contendo cerca de 30% ou menos de água são também contemplados.

[00129] Inúmeras formulações de detergentes exemplificadoras às quais as presentes α -amilases podem ser adicionadas (ou são, em alguns casos, são identificadas como um componente de) são descritas no documento WO2013063460. Estas incluem formulações/embalagens de detergente de dose unitária comercialmente disponíveis tais como PUREX[®] UltraPacks (Henkel), FINISH[®] Quantum (Reckitt Benckiser), CLOROX[™] 2 Packs (Clorox), OxiClean Max Force Power Paks (Church & Dwight), TIDE[®] Stain Release, CASCADE[®] ActionPacs e TIDE[®] Pods (Procter & Gamble), PS.

9.6. Métodos de avaliação da atividade da amilase em composições detergentes

[00130] Numerosos ensaios de limpeza de α -amilase são conhecidos na técnica, incluindo ensaios de amostra e microamostra. Os Exemplos anexos descrevem somente alguns tais ensaios.

[00131] A fim de ilustrar ainda mais as composições e métodos, e vantagens dos mesmos, os seguintes exemplos específicos são dados

com o entendimento de que os mesmos são ilustrativos em vez de limitantes.

[00132] Todas as referências citadas no presente documento estão aqui incorporadas a título de referência em sua totalidade para todos os fins. A fim de ilustrar ainda as composições e métodos, e vantagens dos mesmos, os exemplos específicos a seguir são dados com o entendimento de que os mesmos são ilustrativos em vez de limitantes.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Separação de cepa e amostra

[00133] As sequências de DNA que codificam as proteínas de interesse foram obtidas com o uso de métodos convencionais de síntese de genes. Um peptídeo sinal para secreção e sequências 5' e 3' adicionais para amplificação e subclonagem foram introduzidos com o uso de técnicas de amplificação de PCR padrão. Alternativamente, genes sintéticos inteiros podem ser produzidos comercialmente. Procedimentos padrão foram usados para inserir essas sequências de DNA em vetores bacterianos para integração e secreção em células de *Bacillus subtilis* ou *Bacillus licheniformis*. Os construtos foram verificados por sequenciamento de DNA. As células transformadas foram cultivadas por 68 horas em meio de expressão adequado.

[00134] As células foram separadas do sobrenadante contendo proteína por centrifugação seguida por filtração através de membranas de 0,45 µm (EMD Millipore). Em alguns casos, a purificação adicional foi obtida por meio de cromatografia de troca iônica com o uso de uma resina Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare). A concentração das proteínas foi determinada por cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC) e absorvância a 280 nm.

Exemplo 2: Estabilidade de variantes

[00135] A estabilidade quelante relativa das variantes manipuladas descritas foi avaliada por medições com base na perda relativa de

atividade após a incubação em uma solução quelante a temperaturas elevadas. Em resumo, as enzimas foram diluídas em uma solução quelante a uma concentração de aproximadamente 1-5 ppm. A solução quelante consistia em CAPS 50 mM, Tween-80 0,005% e ácido etidrônico 5 mM (HEDP) ajustado para pH 10,5. As soluções contendo enzimas foram submetidas a estresse por aquecimento em um termociclador por 4 a 10 minutos entre 65 e 85°C. Amostras da enzima em soluções de teste foram coletadas antes e depois de aplicar estresse à solução em temperatura elevada. A atividade da amilase presente nas amostras foi avaliada pelo ensaio Amylase HR (Megazyme). Todas as variantes incluíram a bem conhecida "deleção RG" (isto é, " Δ RG"), referindo-se aos resíduos R181 e G182 de BspAmy24 e R178 e G179 de CspAmy2. As mutações que mostraram melhora nas duas α -amilases são mostradas na Tabela 4, com as posições alinhadas por linha nas duas moléculas. Várias mutações foram encontradas para melhorar a estabilidade do quelante em ambas as moléculas, apesar de as duas α -amilases terem identidade de sequência de aminoácidos de menos de 70%.

Tabela 4. Mutações que melhoraram a estabilidade do quelante das variantes BspAmy24 e CspAmy2.

Mutações em BspAmy24 Δ RG do tipo selvagem		Atividade Residual (%)	Mutações em CspAmy2 Δ RG do tipo selvagem		Atividade Residual (%)
numeração Δ RG	numeração Pdr		numeração Δ RG	numeração Pdr	
nenhuma	-	41	nenhuma	-	30
E188P	E190P	<i>nd</i>	E185P	E187P	65
V204T	V206T	71	I201T	I203T	<i>nd</i>
V204Y	V206Y	74	I201Y	I203Y	59
H208Q	H210Q	68	H205Q	H207Q	<i>nd</i>
S242C	S244C	97	S239C	S241C	55
S242D	S244D	71	S239D	S241D	91

S242H	S244H	77	S239H	S241H	64
S242N	S244N	67	S239N	S241N	56
S242E	S244E	100	S239E	S241E	78
S242F	S244F	95	S239F	S241F	58
S242V	S244V	65	S239V	S241V	56
S242L	S244L	84	S239L	S241L	55
S242Q	S244Q	84	S239Q	S241Q	65
F243E	F245E	93	F240E	F242E	63

Exemplo 3: Análise estrutural de variantes

[00136] Modelos de homologia de BspAmy24 e CspAmy2 α -amilase foram construídos como segue. A sequência de aminoácidos de BspAmy24 (SEQ ID NO: 1) ou CspAmy2 (SEQ ID NO: 2) foi usada como uma consulta no MOE (Chemical Computing Group, Montreal, CA) para pesquisar o banco de dados de proteínas (consulte, por exemplo, Berman, H.E. *et al.* (2000) *Nuc. Acids Res.* 28:235-42). A α -amilase de *Bacillus licheniformis* (1BLI) foi o maior sucesso público em ambas as pesquisas. A função "modelo de homologia", com todos os parâmetros padrão, foi usada para criar um modelo para cada enzima. Uma estrutura de cristal de difração de raios-X também foi determinada para uma α -amilase variante BspAmy24 e uma α -amilase variante CspAmy2. Essas estruturas experimentais corresponderam intimamente aos modelos de homologia e apoiaram a análise realizada com os modelos de homologia.

[00137] As posições dos aminoácidos da Tabela 4 são mostradas no alinhamento estrutural dos modelos de α -amilase na Figura 1. Os α carbonos para essas cinco posições são mostrados para cada amilase como esferas. Os aminoácidos na molécula de α -amilase BspAmy24 (com a deleção RG descrita no presente documento) são mostrados em cinza claro. Os aminoácidos na molécula de α -amilase CspAmy2 (novamente com a deleção RG) são mostrados em cinza mais escuro.

Os íons cálcio e sódio são mostrados em preto. Como pode ser visto na Figura, as posições da Tabela 4 mostram um alinhamento estrutural próximo nas duas moléculas.

[00138] A modelagem estrutural também indica que as mutações nessas posições podem alterar as interações que estabilizam a conformação da alça 185-210 e seu posicionamento dentro da estrutura da proteína dobrada. A alça nas posições 185-210 (numeração BspAmy24) circunda o sítio de metal Ca^{2+} - Na^+ - Ca^{2+} e contém a maioria dos ligantes a esses íons metálicos (Figura 2). As mutações de aminoácidos listadas na Tabela 4 podem alterar as interações que estabilizam a alça 185-210 como resultado de estar dentro da alça ou como resultado de ser capaz de interagir com a alça conforme indicado na Tabela 5.

Tabela 5. Localizações de posições de aminoácidos dentro da estrutura

Posição em BspAmy24	Posição em CspAmy2	Local na estrutura
E190	E187	Na alça 185-210
V206	I203	Na alça 185-210
H210	H207	Na alça 185-210
S244	S241	Capaz de interagir com a alça 185-210
F245	F242	Capaz de interagir com a alça 185-210

[00139] Outras observações de modelagem estrutural sugerem tipos específicos de interações da alça 185-210, que podem ser alterados após a mutação dadas as localizações e conformações dos aminoácidos da Tabela 4 e seus ambientes estruturais circundantes. A mutação E190P/E187P estabilizaria a estrutura dobrada da alça restringindo a liberdade conformacional da alça aos ângulos phi e psi mais limitados disponíveis para a cadeia lateral da prolina. Mutações na posição 206/203 irão alterar as interações de van der Waals e de empacotamento hidrofóbico com regiões próximas da estrutura da

proteína. Mudanças estéricas podem mover a estrutura que o hidrogênio se liga a uma fita adjacente naquela posição (BspAmy24-Asn106). A mutação em tirosina pode criar uma nova ligação de hidrogênio e/ou empilhamento pi com resíduos adjacentes. As mutações H210Q/H207Q podem criar novas ligações de hidrogênio com a estrutura principal em BspAmy24-Glu212 ou BspAmy24-Tyr160 ou com a cadeia lateral de BspAmy24-Lys185. Mutações na posição 244/241 podem gerar novas interações de ligação de hidrogênio com a alça 185-210 e também alterar as interações de van der Waals que Ser faz com BspAmy24-Lys242, que está dentro da geometria de ligação de hidrogênio viável de três posições na alça 185-210. Espera-se que as mutações de Phe na posição 245/242 alterem as interações de empilhamento de van der Waals e pi com resíduos na alça 185-210, BspAmy24-Met208/CspAmy24-Tyr205. A mutação para Glu também pode alterar ligações de hidrogênio potenciais nos resíduos de alça BspAmy24-Asp209, BspAmy24-Asp188 e BspAmy24-Met208. Observe que qualquer uma dessas interações pode resultar em pequenos ajustes locais da conformação da alça 185-210, enquanto ao mesmo tempo estabiliza a estrutura geral dobrada da alça e, assim, aumenta a estabilidade geral da proteína na presença de quelante.

REIVINDICAÇÕES

1. Variante recombinante de uma α -amilase de Família 13 parental, caracterizada pelo fato de que tem uma mutação (i) na cadeia lateral de um resíduo de aminoácido que não é um ligante a um íon cálcio ou sódio, (ii) em que a mutação tem capacidade para alterar a liberdade conformacional, as interações de ligação de hidrogênio, as interações de empilhamento pi, ou as interações van der Waals da alça de cadeia principal que circunda o sítio Ca^{2+} - Na^+ - Ca^{2+} , e (iii) em que a variante tem estabilidade aumentada na presença de uma quantidade predeterminada de quelante em comparação com a α -amilase de Família 13 parental que não tem a mutação.

2. Variante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a mutação está em uma posição de aminoácido selecionada dentre o grupo que consiste em:

(i) E190, V206, H210, S244 e F245 com o uso da SEQ ID NO: 1 para numeração ou

(ii) E187, 1203, H207, S241 e F242 com o uso da SEQ ID NO: 2 para numeração.

3. Variante, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a mutação é uma substituição selecionada dentre o grupo que consiste em:

(i) E190P, V206T, V206Y, H210Q, S244C, S244D, S244H, S244N, S244E, S244F, S244V, S244L, S244Q e F245E, com o uso da SEQ ID NO: 1 para numeração ou

(ii) E187P, 1203 T, I203Y, H207Q, S241C, S241D, S241H, S241N, S241E, S241F, S241V, S241L, S241Q e F242E, com o uso da SEQ ID NO: 2 para numeração.

4. Variante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que compreende ainda:

(i) uma deleção ou substituição em um ou mais resíduos

correspondentes às posições 181, 182, 183 e/ou 184 na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1;

(ii) uma deleção de resíduos 181 e 182 ou 183 e 184 correspondentes à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1;

(iii) uma deleção de resíduos 178 e 179 ou 180 e 181 correspondentes à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2;

(iv) qualquer mutação única, múltipla ou combinatória (ou mutações únicas, múltiplas ou combinatórias) anteriormente descrita em uma α -amilase de Família 13; e/ou

(v) um truncamento N-terminal e/ou C-terminal;

5. Variante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que tem pelo menos 60%, 70%, 80% ou 90% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 e/ou SEQ ID NO: 2.

6. Composição detergente, caracterizada pelo fato de que compreende a variante amilase, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, que compreende ainda um agente quelante.

7. Composição para liquefazer amido, caracterizada pelo fato de que compreende a variante, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, que compreende ainda um agente quelante.

8. Composição para descolagem de têxteis, caracterizada pelo fato de que compreende uma variante, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, que compreende ainda um agente quelante.

9. Composição para fabricação de cerveja ou panificação, caracterizada pelo fato de que compreende a variante, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, que compreende ainda um agente quelante.

10. Método para aumentar a estabilidade de uma α -amilase de Família 13 na presença de um quelante, caracterizado pelo fato de

que compreende introduzir a uma α -amilase de Família 13 parental uma mutação (i) na cadeia lateral de um resíduo de aminoácido que não é um ligante a um íon cálcio ou sódio, (ii) em que a mutação tem capacidade para alterar a liberdade conformacional, as interações de ligação de hidrogênio, as interações de empilhamento pi, ou as interações van der Waals da alça de cadeia principal que circunda o sítio $\text{Ca}^{2+}\text{-Na}^+\text{-Ca}^{2+}$, e (iii) em que a variante tem estabilidade aumentada na presença de uma quantidade predeterminada de quelante em comparação com a α -amilase de Família 13 parental que não tem a mutação.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a mutação está em uma posição de aminoácido selecionada dentre o grupo que consiste em:

(i) E190, V206, H210, S244 e F245 com o uso da SEQ ID NO: 1 para numeração ou

(ii) E187, 1203, H207, S241 e F242 com o uso da SEQ ID NO: 2 para numeração.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a mutação é uma substituição selecionada dentre o grupo que consiste em:

(i) E190P, V206T, V206Y, H210Q, S244C, S244D, S244H, S244N, S244E, S244F, S244V, S244L, S244Q e F245E, com o uso da SEQ ID NO: 1 para numeração ou

(ii) E187P, 1203T, 1203Y, H207Q, S241C, S241D, S241H, S241N, S241E, S241F, S241V, S241L, S241Q e F242E, com o uso da SEQ ID NO: 2 para numeração.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 12, caracterizado pelo fato de que a variante compreende ainda:

(i) uma deleção ou substituição em um ou mais resíduos correspondentes às posições 181, 182, 183 e/ou 184 na sequência de

aminoácidos da SEQ ID NO: 1;

(ii) uma deleção de resíduos 181 e 182 ou 183 e 184 correspondentes à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1;

(iii) uma deleção de resíduos 178 e 179 ou 180 e 181 correspondentes à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2;

(iv) qualquer mutação única, múltipla ou combinatória (ou mutações únicas, múltiplas ou combinatórias) anteriormente descrita em uma α -amilase de Família 13; e/ou

(v) um truncamento N-terminal e/ou C-terminal;

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 13, caracterizado pelo fato de que a variante tem pelo menos 60%, 70%, 80%, ou 90% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 e/ou SEQ ID NO: 2.

15. Método para converter amido em oligossacarídeos, caracterizado pelo fato de que compreende contatar amido com quantidade eficaz da variante α -amilase, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5.

16. Método para remover uma mancha de amido ou solo de uma superfície, caracterizado pelo fato de que compreende colocar a superfície em contato com uma quantidade eficaz da variante α -amilase, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, ou a composição, como definida na reivindicação 7, e permitir que o polipeptídeo hidrolise componentes de amido presentes na mancha de amido para produzir moléculas derivadas de amido menores que dissolvem na composição aquosa, assim removendo a mancha de amido da superfície.

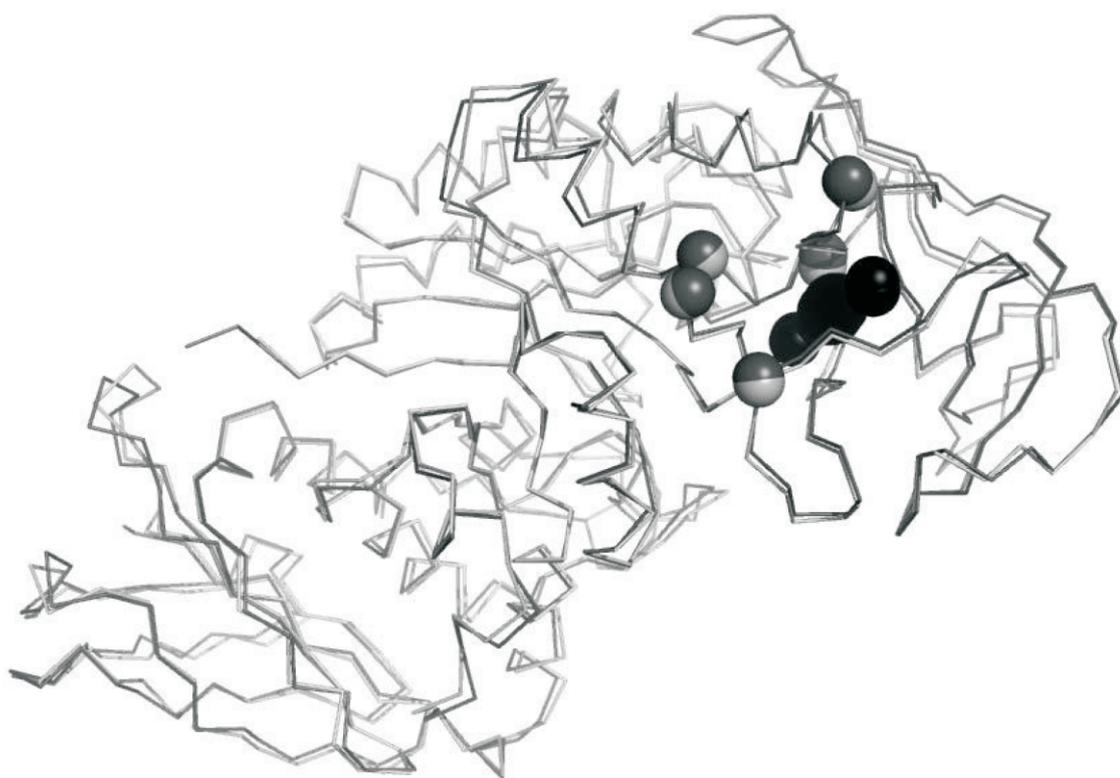


Fig. 1

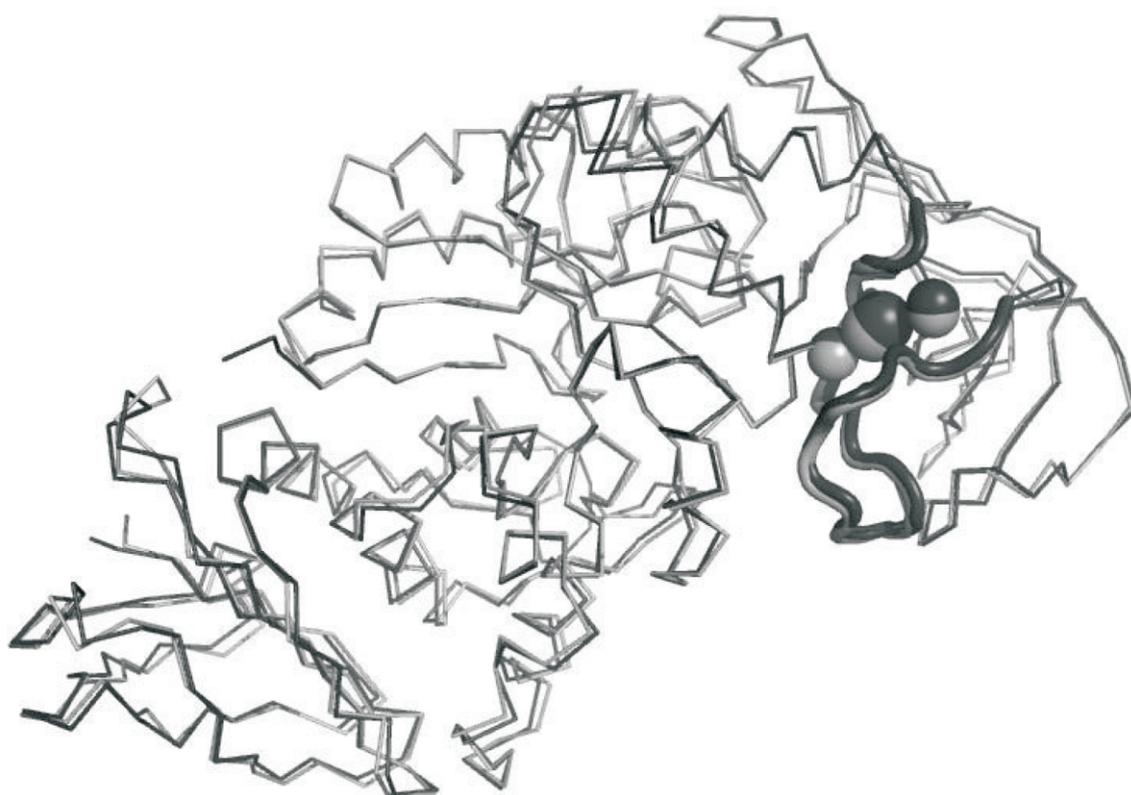


Fig. 2

RESUMO

Patente de Invenção: **"ALFA-AMILASES COM MUTAÇÕES QUE MELHORAM A ESTABILIDADE NA PRESENÇA DE QUELANTES"**.

Trata-se de α -amilases variantes que têm mutações que melhoram a estabilidade de enzima na presença de quelantes, métodos para projetar tais variantes e métodos para uso, das variantes resultantes. As α -amilases variantes são particularmente úteis, para uso em limpeza e composição de descolagem que inclui quantidades significativas de quelantes.