



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

(11) (21) **PI 0401026-4 A**



(22) Data de Depósito: 07/04/2004
(43) Data de Publicação: 22/11/2005
(RPI 1820)

(51) Int. Cl⁷.:
C12N 9/54
C11D 3/386

(54) Título: **PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PROTEASE E COMPOSIÇÕES PARA LIMPEZA**

(71) Depositante(s): Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS (BR/RS)

(72) Inventor(es): Sydney Mitidieri Silveira, Marilene Henning /aintein, Augusto Schrank

(74) Procurador: Alves, Vieira, Lopes & Atem Advogados

(57) Resumo: "PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PROTEASE E COMPOSIÇÕES PARA LIMPEZA". A presente invenção descreve um processo de produção de uma protease alcalina S64 a partir da utilização de um Bacillus sp, linhagem 02IM; o crescimento é feito em processo submerso utilizando como meio de cultura um composto contendo uma ou mais fontes de nitrogênio, carbono sais minerais e complementos nutricionais, sendo o processo realizado em temperatura mesófila e com fornecimento de oxigênio em quantidade acima da concentração inibitória mínima durante todo o processo; são também descritas composições de limpeza compreendendo as referidas proteases.

SEQUÊNCIA DE NÚMEROS DE SEQÜÊNCIA : 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

Relatório descritivo
PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PROTEASE E
COMPOSIÇÕES PARA LIMPEZA

5 **Campo da Invenção**

A presente invenção refere-se genericamente a enzimas industriais e a processos para sua produção. Mais especificamente, refere-se à produção de uma protease alcalina produzida a partir de uma espécie de *Bacillus sp.* da linhagem 02IM com crescimento em processo submerso em batelada, batelada alimentada ou contínuo, utilizando como meio de produção composto contendo uma ou mais fonte de nitrogênio e carbono, além de sais minerais e complementos nutricionais. O processo é realizado em biorreator com temperatura mesófila e com fornecimento de oxigênio ao sistema de produção acima da concentração inibitória mínima durante todo o processo, com o mosto em pH próximo a neutralidade. O produto após separação das células e concentrado é estável em surfactantes e outros produtos utilizados em formulações para uso industrial em detergentes e outras aplicações industriais.

Antecedentes da Invenção

20 As enzimas são biocatalizadores orgânicos de natureza protéica presentes em todos os sistemas biológicos. Essas moléculas quando degradadas são reaproveitadas como aminoácidos para construção de outras proteínas. Os estudos envolvendo enzimas levaram a um agrupamento das mesmas em classes que se distinguem conforme a natureza dos substratos que atuam. Para efeitos da presente invenção, será destacada a classe das proteases.

Historicamente a classificação das proteases foi bastante dificultada devido à falta de especificidade por substratos definidos, não sendo inicialmente possível realizá-la de modo sistemático. As denominações foram primeiramente baseadas na origem de extração, por exemplo: papaína, extraída do *Carica papaya*, pancreatina, extraído do pâncreas, pepsina,

extraída de estômago de animais (do grego *depsisis*: digestão), bromelina, extraída do *Ananás comosus*, da família *Bromeliaceae*, ficina, extraído do *Ficus glabrata*, e subtilisina, produzido a partir do *Bacilo 02IM*. Também foram utilizadas as denominações "exo" ou "endoproteases", de acordo com
5 localização na célula produtora.

O termo peptidase é sinônimo de peptídeo hidrolase e protease, o que inclui todas enzimas que clivam ligações peptídicas. Segundo a Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica, elas são classificadas como E.C. 3.4. As proteases podem ser exopeptidases (E.C. 3.4.11-19), cuja ação é
10 dirigida para a porção amino ou carboxi terminal do peptídeo ou endopeptidases (E.C. 3.4.21-24), também denominadas proteinases, que clivam ligações peptídicas internamente, resultando em peptídeos.

A partir de Hartley em 1960, foi proposto um sistema prático de classificação para as proteases. Nesta classificação, as carboxipeptidases e as
15 endopeptidases são divididas em subclasses, tendo como base o seu mecanismo catalítico. As carboxipeptidases foram subdivididas em serino, metalo e cisteíno carboxipeptidases e as endopeptidases em serino endopeptidases (E.C. 3.4.21), cisteíno endopeptidases (E.C. 3.4.22), aspártico endopeptidases (E.C. 3.4.23) e metaloendopeptidases (E.C. 3.4.24). Serino
20 peptidases possuem um resíduo de serina em seu centro ativo, enquanto as aspártico peptidases têm duas unidades de ácido aspártico no centro catalítico. As cisteíno peptidases apresentam um resíduo de cisteína no centro ativo e as metaloproteases usam um íon metal no seu mecanismo catalítico.

A região de atuação das exopeptidases se restringe às extremidades
25 das cadeias polipeptídicas nas regiões (N) ou (C)-terminal. Aquelas que atuam na região amino terminal livre liberam um único resíduo de aminoácido (aminopeptidases), um dipeptídeo (dipeptidil-peptidases) ou um tripeptídeo (tripeptidil-peptidases). As exopeptidases que atuam na região C terminal livre liberam um único aminoácido (carboxipeptidases) ou um dipeptídeo (peptidil-
30 dipeptidases). Algumas exopeptidases são específicas para dipeptídeos (dipeptidases) ou removem resíduos terminais que são substituídos, ciclizados

ou ligados por ligações isopeptídicas.

Já as endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal. A presença de grupos amino terminal ou carboxi terminal próximos têm um efeito negativo na
5 atividade da enzima. As enzimas cujo mecanismo de ação não está completamente elucidado são classificadas em uma subclasse específica (E.C. 3.4.99).

As proteases de serina, cisteína e aspartato recebem estes nomes devido aos aminoácidos presentes no sítio catalítico, os quais atuam como
10 nucleófilos na hidrólise protéica. As metaloproteases também atuam de maneira semelhante, mas o íon (Zn^{2+} , Ca^{2+} e Mn^{2+}) é necessário para ativar uma determinada carbonila de uma amida presente no sítio ativo. As aspartato proteases, por possuírem grupos carboxílicos em seus centros ativos, são
15 ativas apenas em pH inferior a 5, sendo por isto também denominadas proteases ácidas.

As estruturas moleculares de proteases representativas de cada grupo já foram determinadas por análise de seqüência de aminoácidos, cristalografia de raios-X e ressonância nuclear magnética (NMR). A caracterização dos sítios catalíticos de várias proteases evidenciou uma fenda presente na superfície
20 destas moléculas. O substrato polipeptídico se posiciona ao longo da fenda do sítio ativo, sendo estabilizado em ambos os lados por subsítios que comportam as cadeias laterais dos seus resíduos de aminoácidos, ou as suas próprias ligações peptídicas. As similaridades estruturais levaram à proposição de que grupos de proteases evoluíram a partir de uma única proteína, ou seja,
25 pertencem a uma superfamília.

As famílias de serina proteases I e II são encontradas em organismos superiores e microrganismos, respectivamente. Os centros ativos das duas famílias apresentam os mesmos aminoácidos, que são asparagina, serina e histidina. A diferença encontra-se nas seqüências de aminoácidos e arranjo
30 terciário nas regiões ao redor do centro catalítico. As proteases desta subclasse possuem uma serina como nucleófilo em seu centro ativo, mas

precisam utilizar um segundo aminoácido (anel imidazol da histidina) para ativar a hidroxila de seu resíduo de serina. Isto ocorre devido a menor acidez e nucleofilia do átomo de oxigênio em relação ao de enxofre, pois na subclasse das cisteíno endopeptidases, não é necessário auxílio na ativação.

5 Devido a sua excepcional capacidade catalítica, as enzimas têm atraído a atenção daqueles que atuam na indústria. Dentre as funções das enzimas na indústria destaca-se a atuação em matérias-primas renováveis, como frutos, cereais, leite, gorduras, carne, algodão, couro, madeira e inúmeros outros. Sendo originalmente produzidas para atuar em células vivas, a atividade das
10 enzimas normalmente ocorre em pressão atmosférica e em condições moderadas de temperatura e pH. A maioria delas possui uma atividade máxima a temperaturas de 30 a 70°C em pH próximo ao neutro.

 Para efeitos industriais, as enzimas de origem microbiana são preferidas às enzimas de plantas e animais, uma vez que possuem a maioria das
15 características desejadas para aplicação em biotecnologia, não apresentando limitação de produção, tampouco sazonalidade, além de contornar o problema de limitação do uso de enzimas de origem animal, devido a barreiras de caráter sanitário. A utilização de enzimas na indústria está em grande crescimento, sendo empregadas cada vez mais em diversos segmentos.

20 Dessa forma, quase todas as enzimas industriais originam-se de microrganismos. Entretanto, enzimas produzidas por diferentes microrganismos, com ação idêntica, variam significativamente nas condições ótimas de suas reações. Por isto, é necessário encontrar microrganismos que produzam enzimas para substratos específicos, com variação no espectro de
25 temperatura e pH de diferentes processos de produção. Dessa forma, a etapa de isolamento do melhor microrganismo produtor de um tipo particular de enzima exige um período longo de experimentação laboratorial.

 Quando este microrganismo adequado é encontrado, inicia-se a segunda etapa de pesquisa. O microrganismo deve ser “domesticado” de forma
30 a produzir a enzima desejada com alto rendimento. A técnica de bioprocessos tornou possível a produção de enzimas por microrganismos, de forma

economicamente viável e em quantidades virtualmente ilimitadas. O produto final de um bioprocessamento é uma mistura contendo uma série de enzimas.

Essas enzimas de origem microbiana são normalmente utilizadas no processamento de alimentos, manufatura de detergentes, têxteis, indústria farmacêutica e terapêutica.

Dentre os tipos enzimáticos microbianos de maior interesse biotecnológico, destacam-se as enzimas secretadas (exoenzimas), pois a sua extração e purificação são menos complexas e onerosas. É comum a sua utilização sob a forma de extratos, ou mesmo a adição do microrganismo produtor da protease diretamente no produto a ser transformado. Além de microrganismos, como bactérias, protozoários, leveduras e fungos essas enzimas também são encontradas nos vírus.

A classe enzimática das proteases, cujas funções em sistemas biológicos são de digestão e regulação, no ramo industrial, possui uma enorme variedade de aplicações principalmente na indústria de detergentes e de alimentos. Com a tendência mundial no uso de tecnologias não poluentes, as proteases também começaram a serem usadas em larga escala no tratamento do couro, em substituição aos compostos tóxicos e poluentes até então usados, principalmente os sulfetos. Na indústria farmacêutica, as proteases são usadas em pomadas cicatrizantes e têm um uso potencial para outros medicamentos. Os microrganismos representam uma excelente fonte de proteases devido a sua grande diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética. As proteínas são hidrolisadas por microrganismos, que utilizam os produtos de degradação como nutrientes para sua multiplicação celular. A degradação é iniciada por endopeptidases secretadas pelos microrganismos, seguida de hidrólise posterior por exopeptidases em um sítio extra ou intracelular. Numerosas proteinases são produzidas por microrganismos distintos, dependendo da espécie, ou mesmo por diferentes cepas de uma mesma espécie. Proteinases diferentes também podem ser produzidas pela mesma cepa, em resposta à variação nas condições de cultura. A maioria das serina proteinases comerciais, principalmente as

alcalinas e neutras, são produzidas por organismos que pertencem ao gênero *Bacillus*. As subtilisinas são as representantes deste grupo. Enzimas similares também são produzidas por outras bactérias, como por exemplo, bactérias do gênero *Clostridium*, *Haemophilus*, *Aeromonas*, *Lactobacillus* e *Serratia*. Os

5 fungos também produzem serina proteinases; principalmente por várias linhagens de *Aspergillus oryzae*. As cisteíno endopeptidases não são encontradas tão amplamente como as serino e as aspártico endopeptidases. As proteases microbianas representam cerca de 40% da venda total mundial de enzimas.

10 A indústria de detergentes é atualmente a maior consumidora deste biocatalizador, já a indústria de alimentos situa-se entre aquelas que apresentam maior demanda por enzimas em seus processos. Nas áreas de panificação e biscoitaria, de produção de laticínios e de processamento de carnes e couros também são utilizadas diversas enzimas, sendo as proteases,

15 lipases e amilases as principais. Isto constitui por si só em demanda suficiente por pesquisas que visem o desenvolvimento de processos em que a moderna tecnologia enzimática seja implementada e aperfeiçoada.

As proteases ocupam um papel de destaque nas enzimas utilizadas industrialmente. Representam 60% do total de venda de enzimas no mundo.

20 Elas possuem um grande histórico de aplicação na indústria de alimentos e no mercado de peles. Várias indústrias se destacam na comercialização de proteases, entre estas, a Novo Nordisk®, a Gist-Brocades®, a Genecor® e a Miles®.

Os microrganismos são responsáveis por cerca de 40% da produção de proteases utilizadas industrialmente, podendo ser obtidas de bactérias, fungos

25 e vírus sendo que as produzidas pelas bactérias apresentam maior empregabilidade.

Abaixo estão relacionados os ramos industriais que utilizam protease, bem como suas respectivas funções:

30 Detergentes

Todas as proteases encontradas em detergentes são serino proteases

produzidas por diferentes linhagens de bacilos. A maioria é alcalina, como a Alcalase[®], protease bacteriana produzida pela Novo Nordisk[®] da Dinamarca.

Atualmente, as pesquisas em torno das proteases vêm tentando entender melhor o mecanismo do processo de lavagem encontrados presentes nos detergentes. Ainda não está claro porque proteases de estruturas similares atuam de maneiras diferentes. Informações como adsorção/desorção de sujeira, especificidade das enzimas, valor do pI em relação ao pH da solução do detergente são muito importantes.

Curtumes

10 No processamento de couros, as proteases possuem ampla função. Na fase de limpeza, por exemplo, é necessário haver reidratação da pele, passando pela remoção de pêlos, em que é utilizada uma protease alcalina, porque o pH alcalino ajuda na exposição de folículos pilosos, facilitando sua remoção.

15 Na Idade Média, com a finalidade de amaciar couros e peles, eram utilizadas fezes de cães e pombos, desconhecendo-se, entretanto, que o efeito devia-se à ação de proteases que hidrolisavam seletivamente proteínas responsáveis pela rigidez, tornando-o macio sem alterar a sua resistência.

20 Já em 1910, utilizavam-se enzimas de forma comercial, em sua maioria de origem animal, como do pâncreas bovino para auxiliar no processo de curtimento de peles. Até cerca de 15 anos atrás, utilizavam-se principalmente enzimas de origem animal. O desenvolvimento da biotecnologia fez surgir uma nova era de produtos enzimáticos, oriundos de microrganismos, que passaram a substituir as enzimas animais.

25 Nos dias de hoje, a substituição de processos químicos por processos biológicos está se tornando uma necessidade, para este segmento industrial, pois a carga de efluentes gerada nos curtumes vem aumentando os custos da produção coureira em função do tratamento exigido.

30 Levando-se em conta que os processamentos químicos habituais geram uma carga poluente perigosa e em grande quantidade, principalmente sulfeto de sódio, acarretando em problemas para a eliminação dos dejetos, ficam

evidentes as vantagens da utilização de enzimas, sendo bastante coerente, pois, tanto a pele quanto os pêlos são formadas por proteínas e outras biomoléculas e, portanto, suscetíveis à ação de enzimas.

5 Como bom exemplo, pode-se citar as proteases alcalinas que são utilizadas para aumentar a velocidade de absorção de água pela pele, diminuindo o tempo de reidratação e, conseqüentemente, os custos.

Panificação

Existem diferenças consideráveis na farinha e nas características finais do produto na indústria de panificação ao redor do mundo. A seleção da variedade de trigo é uma delas. Pode-se acrescentar que a aplicação de diferentes enzimas tem impacto no processamento da farinha, no manejo mecânico e no assar o produto.

15 O principal componente das farinhas de trigo para o processo de panificação é protéico. Sua funcionalidade é muito atribuída a gluteninas e gliadinas insolúveis, além de existirem muitas discussões em torno do glúten do trigo. O glúten hidratado no estágio de mistura da farinha desenvolve mudanças no “cross-linking” e “spatial structures”, que dão as propriedades viscoelásticas que fazem da farinha de trigo a principal matéria prima da indústria de panificação.

20 Laticínios

Dentre as proteases de maior relevância econômica para nosso estado destacamos a quimosina (E.C. 3.4.23.4), largamente utilizada no processo de manufatura de queijo. A quimosina é uma protease ácida, de massa molecular de 40.000 daltons, cuja ação proteolítica e estrutura em muito se assemelham às da pepsina. Sua ação hidrolítica sobre ligações pépticas é favorecida pela presença de cadeia lateral aromática na vizinhança da ligação a ser rompida.

Cervejarias

30 A papaína é a protease mais usada nas cervejarias porque sua ação não origina peptídeos amargos e por manter a estabilidade da espuma. Nessa indústria, age hidrolisando a proteína do malte que causa a turvação da cerveja. Dentre as enzimas proteolíticas contidas na papaína comercial, a

quimiopapaína e a papaína são responsáveis por evitar essa turvação. Estas enzimas têm boa atividade após a pasteurização da cerveja, sendo essa uma razão importante para seu uso. Pelo menos 20 ppm de papaína são adicionados à cerveja para manter a atividade enzimática por mais de 16
5 semanas a 30°C.

O desenvolvimento de novas fontes e de enzimas com características vantajosas em relação às atualmente disponíveis é, portanto, de elevado interesse. Neste contexto, os presentes inventores desenvolveram um processo de produção de protease de uso industrial, sendo a referida protease
10 denominada S64 e produzida por uma espécie de Bacilo da linhagem 021M. A protease da presente invenção apresenta grande estabilidade em surfactantes, estabilidade satisfatória para uso em detergente e outras aplicações industriais. Além disso, a presente invenção proporciona as seguintes características vantajosas.

- 15 1) A atividade enzimática de protease superior a 100 U em cada mL de mosto de crescimento antes do processo de concentração, determinada à temperatura de 50 °C em pH 8,0, utilizando como substrato azocaseína 2%;
- 2) O rendimento enzimático de protease superior a 5 U para cada mg de
20 meio utilizado;
- 3) A produtividade enzimática de protease superior a 10 U por hora de bioprocessos;
- 4) A atividade enzimática de protease com estabilidade não variando mais que 50% entre a faixa de pH de 6,0 a 10,0;
- 25 5) A temperatura de atividade ótima entre 50 e 65°C;
- 6) A manutenção de atividade enzimática de protease acima de 50% após uma hora à temperatura de 50°C;
- 7) Nenhuma perda de atividade enzimática de protease em formulação contendo 1,5% de surfactante Nonil Fenol etoxilado 6M;
- 30 8) Nenhuma perda de atividade enzimática de protease em formulação contendo 15% de surfactante Nonil Fenol etoxilado 9,5M;

- 9) Nenhuma perda de atividade enzimática de protease em formulação contendo a mistura de 1,5% de surfactante Nonil Fenol etoxilado 6M e 15% de surfactante Nonil Fenol etoxilado 9,5M;
- 5 10)A perda de atividade enzimática de protease inferior a 5% em formulação contendo 1, 2, ou 5% de isopropanol;
- 11)A perda de atividade enzimática de protease inferior a 20% em formulação contendo 2M de cloreto de sódio;
- 10 12)A manutenção da atividade enzimática de protease em soluções aquosas contendo concentração igual ou inferior a 4 mM dos íons de manganês, zinco e cálcio;
- 13)A manutenção da atividade enzimática de protease superior a 80% utilizando sulfato de amônio na faixa de 0-20%, no processo de precipitação protéica;
- 15 14)A manutenção da atividade enzimática de protease superior a 50% utilizando sulfato de amônio na faixa de 0-40%, no processo de precipitação protéica;
- 15 15)A manutenção da atividade enzimática de protease superior a 70% utilizando membranas de ultrafiltração com sobrepressão igual ou inferior a 2kgf/cm^2 .
- 20 16)A massa molecular da protease S64 de 26.000 ± 3.000 através de gel de poliacrilamida SDS-PAGE;
- 17)O ponto isoelétrico da protease S64 é $10,8 \pm 0,7$ por cromatografia de focalização isoelétrica em Rotofor;
- 25 18)A protease alcalina S64 especificada nos itens acima de 1 a 17 é produzida por um microrganismo que pertence ao gênero *Bacillus* sp;
- 19)A protease alcalina S64 especificada nos itens acima de 1 a 17 é produzida por um microrganismo que pertence ao gênero *Bacillus* sp linhagem 02IM.

30 **Sumário da invenção**

Tendo em vista as limitações do estado da técnica e as peculiaridades

da presente invenção, é um objeto de presente invenção proporcionar composições para limpeza doméstica ou industrial compreendendo proteases alternativas às presentemente disponíveis.

5 Em um aspecto da presente invenção, sendo, portanto, um objeto da mesma, as proteases da presente invenção apresentam elevada estabilidade surfactante e compatibilidade com substâncias presentes em composições de uso industrial.

10 Em um outro aspecto, sendo, portanto, um adicional objeto da presente invenção, é provido um processo para a produção das referidas proteases, sendo o referido processo caracterizado pelo cultivo do *Bacillus* sp da linhagem 02IM em processo submerso.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

15 FIGURA 1: Seqüência do fragmento de DNA amplificado com primers para RNA ribossômico 16S a partir de RNA do *Bacillus* sp 02IM.

FIGURA 2: Análise da produção de protease S64. Determinação da atividade enzimática pela utilização de azocaseína 2%.

FIGURA 3: Variação do pH durante o cultivo celular para produção de protease S64.

20 FIGURA 4: Crescimento populacional avaliada por medida de massa seca durante a produção de protease S64. Filtragem em membrana de 0,5 µm.

FIGURA 5: Crescimento populacional por plaqueamento em "spread plate" durante a produção de protease S64.

25 FIGURA 6: Variação da proteína total avaliada pelo método de biureto durante a produção de protease S64.

FIGURA 7: Influência do pH na atividade da protease S64.

FIGURA 8: Influência da temperatura na atividade enzimática da protease S64.

FIGURA 9: Estabilidade térmica da protease S64.

30 FIGURA 10: Atividade enzimática de mostos de crescimento do Bacilo 02IM, produzidos em biorreator. Lotes utilizados para formulações experimentais

FIGURA 11: Cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose do mosto de

crescimento do Bacilo 02IM

FIGURA 12: Cromatografia de troca iônica em CM celulose do mosto de crescimento do Bacilo 02IM

Descrição Detalhada da Invenção

5 O microrganismo foi semeado em placas contendo ágar nutritivo e incubado por 48 horas a 37°C, para a etapa de caracterização morfológica que compreendia a observação da morfologia da colônia e posteriormente, em microscopia óptica com lâminas a fresco e com coloração pela técnica de Gram, utilizando ocular com marcação para realização de medidas de diâmetro
10 e comprimento celular.

A fim de realizar a caracterização bioquímica do microrganismo foram realizados os seguintes testes:

a) Para a produção de catalase. Nesse teste, o isolado foi cultivado a 37°C, por 24 horas em placa de ágar nutritivo. Após este tempo, uma colônia
15 foi retirada da placa com uma alça de platina e colocada sobre uma lâmina de vidro. A seguir, três gotas de H₂O₂ 3% foram adicionadas sobre a colônia e a formação de bolhas de oxigênio foi observada.

b) Para a produção de fenilalanina deaminase (E.C. 4.3.1.5 Fenilalanina amônia-lisase). Nesse teste, o isolado foi cultivado a 37°C, por 24 horas em 30
20 mL de meio contendo, em g.L⁻¹, 2,0 de DL-fenilalanina, 3,0 de extrato de levedura, 5,0 de cloreto de sódio, 1,0 de difosfato de sódio e 1,2 de ágar. Posteriormente foi utilizado 1 mL do reagente para revelação (12,0 g de cloreto de ferro, 2,5 mL de ácido clorídrico concentrado e água destilada em q.s.p. 1.000 mL).

25 c) O teste Voges-Proskauer (VP). Nesse teste, o isolado foi cultivado a 37°C, por 24 horas em 30 mL do meio contendo, em g.L⁻¹, 7,0 de peptona, 5,0 de glicose, 5,0 de tampão fosfato de potássio 100 mM. Para este teste foram utilizados 1 mL de cada reagente: a) 5% de α-naftol em etanol absoluto; b) 40% de hidróxido de potássio (Reagente de Battitt's).

30 d) O teste do indol. Nesse teste, em 30 mL de meio de cultura,

composto, em g.L⁻¹, 10,0 de peptona de caseína, 5,0 de cloreto de sódio e 10,0 de triptofano, o isolado foi cultivado a 37°C, por 24 horas. Foi utilizado 1 mL do Reagente de Kovacs (150 mL de álcool isoamílico, 10,0 g de p-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) e 20 mL de ácido clorídrico concentrado.

5 e) O teste da Hidrólise de amido. Nesse teste, o isolado foi cultivado em placas contendo o meio de cultura ágar nutritivo acrescido de 1% de amido solúvel, pH 6,8-7,0. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período as zonas de degradação foram reveladas submetendo-se as placas a vapores de iodo metálico.

10

Utilização de diferentes fontes de carbono:

Em tubos contendo caldo nutritivo com pH entre 7,2 e 7,6, adicionado de 0,018 g.L⁻¹ de vermelho de fenol, foram adicionadas as diversas carbono (esterilizadas por filtração), na concentração final de 1%. Também foi testado na concentração final de 3%, citrato de sódio. Estes tubos contendo 30 mL de meio foram inoculados com 10µL de uma cultura crescida por 12 horas em tubo contendo caldo nutritivo, durante 24 h a 37 °C.

15 O Teste da liquefação da gelatina também foi utilizado para identificar a utilização de diferentes fontes de carbono. Nesse teste foram inoculados 10µL de uma cultura cultivada em caldo nutritivo por 12 horas, sobre uma placa de Petri contendo o seguinte meio de crescimento, em g.L⁻¹: 15,5 de peptona de caseína, 5,0 de extrato de levedura, 2,0 de glicose, 2,5 de cloreto de sódio, 0,75 de ágar, 50 de gelatina, com pH ajustado para 7,0, cultivados a 37 °C por 48 horas.

25

Seqüenciamento do DNA 16S da cultura bacteriana do gênero *Bacillus*:

A amostra foi submetida à extração DNA genômico, pelo método de fervura (termoextração). A caracterização do isolado pela seqüência do rDNA 16S foi realizada pela técnica de PCR. Para amplificar a região 16S rDNA, foram desenvolvidos *primers* universais a partir de regiões conservadas definidas em alinhamentos múltiplos entre as espécies *B. cereus* e *B. subtilis*,

30

utilizando o programa Vector NTI versão 4.0. Estes foram denominados Bac 16S-up, que apresenta a seqüência (5'-3') **GGA GAG TTT GAT CCT GGC TC**, e Bac 16S-do qual a seqüência (5'-3') é **AGT TGG TGA GGT AAT GGC TC** e possibilitam a amplificação do fragmento de aproximadamente 272pb. Na
5 realização do teste de PCR, 5µl do DNA molde foi adicionado a 20µl de uma mistura contendo 10mM de Tris-Cl , 50mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 30pmol de cada *primer*, 200 µM dNTPs e 1U de *Taq* polimerase. Em seguida, as amostras foram levadas ao termociclador e submetidas a 35 ciclos constituídos de 45s a 94°C, 1 min a 65°C e 45s a 72°C, sendo utilizada uma extensão final de 10 min
10 a 72°C.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% com 0,5µg de Brometo de etídio.mL⁻¹ e visualizadas sob luz ultravioleta . O tampão utilizado na corrida eletroforética foi TEB 1X.

O produto de PCR obtido foi retirado com auxílio de bisturi e extraído do
15 gel de agarose com Kit GFX TM PCR[®], para purificação de bandas de DNA em gel. O produto da purificação foi seqüenciado em seqüenciador automático MEGABACE 1000[®] com DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit[®]. As seqüências foram analisadas por alinhamento utilizando o programa Clustal X[®]e BLASTn[®] avaliadas através do GenBank[®].

20

Propriedades bacteriológicas do Bacilo 02IM:

A espécie do bacilo. Linhagem 02IM relacionada a esta invenção tem as seguintes propriedades bacteriológicas:

- (a) Forma: Bastonete
- 25 (b) Coloração de Gram: Positivo
- (c) Produção de endósporo: Positivo
- (d) Forma de esporos: Elipse central
- (e) Mobilidade: Positivo
- (f) Atitude para oxigênio: Aeróbico
- 30 (g) Produção de Catalase: Positivo
- (h) Crescimento em condição de anaerobiose: Positivo

- (i) Voges-Proskauer (VP) reação: Positivo
- (j) pH de VP caldo cultura: 6,2
- (k) Glicose: Positiva
- (l) Arabinose: Positiva
- 5 (m) Xilose: Positiva
- (n) Manitol: Positiva
- (o) Liquefação de gelatina: Positivo
- (p) Degradação de amido: Positivo
- (q) Utilização de citratos: Negativo
- 10 (r) Deaminação da Fenilalanina: Negativo
- (s) Reação de gema de ovo: Negativo
- (t) Redução de nitrato: Negativo
- (u) Crescimento a pH 6,8: Positivo
- (v) Crescimento a pH 5,7: Positivo
- 15 (x) Crescimento em 5% cloreto de sódio: Positivo
- (y) Crescimento em 7% cloreto de sódio: Negativo

Seqüenciamento do DNA 16S da cultura bacteriana Bacilo 02 IM:

- 20 A seqüência obtida, comparada contra o genebank através do BLASTn® apresentou 100% de homologia para *Bacillus* sp e 99% para *Bacillus subtilis*. Ao utilizar o programa CLUSTAL X® ficou demonstrado que a seqüência apresenta maior homologia com *B. subtilis* comparado ao *B. cereus*.

Produção da Protease:

- 25 Para as produções, foram utilizados como meio de cultura matérias primas contendo a composição descrita na Tabela 1.

Ativação celular:

- 30 Uma alíquota de 50 µL foi retirada dos frascos de manutenção de *Bacilo 02IM*, mantidos a -20°C, semeada em um tubo contendo 10 mL de meio LB. O tubo foi incubado em banho d'água com agitação em temperatura mesófila.

Após a realização de coloração de Gram para verificar a ausência de contaminação, o restante do tubo foi vertido para o frasco denominado “frasco inóculo”.

TABELA 1: Composição percentual média do meio de cultivo

	Composição média (%)
Umidade	6,00
Proteína b.s. (N x 6,25)	60,00
Lipídeos	1,50
Cinzas	7,50
Fibras	1,50
Carboidratos	23,50
Aminoácidos	
Ácido aspártico	6,49
Ácido glutâmico	-
Alanina	1,66
Arginina	5,83
Cistina	8,26
Fenilalanina	3,11
Glicina	1,56
Hidroxiprolina	-
Histidina	0,46
Isoleucina	2,01
Leucina	4,15
Lisina	2,45
Metionina	0,43
Prolina	3,31
Serina	2,40
Tirosina	1,12
Treonina	5,03
Triptofano	0,74
Valina	3,41

Frasco inóculo:

O crescimento de Bacilo 02IM no frasco inóculo foi realizado em agitador de plataforma, em temperatura mesófila. Foi utilizado um Erlenmeyer de 1.000 mL que continha 200 mL de meio de cultura esterilizado a 121°C por 15 minutos. Após incubações, a massa celular foi coletada por centrifugação (10.000 rpm por 15 minutos) e lavada três vezes com tampão fosfato estéril 50 mM pH 7,0. Posteriormente, esta massa de células foi ajustada para uma densidade óptica superior a 0,001 em espectrofotômetro a 600 nm. O reator foi inoculado com 100 mL da suspensão de massa celular.

10

Reator:

Foi utilizado um contendo o meio acima citado, ajustado para pH próximo a neutralidade. Ao meio de cultivo foram adicionados dois mL de antiespumante. No ensaio de produção foram mantidos os parâmetros de agitação constante, taxa de aeração superior à concentração inibitória mínima para este microrganismo, durante todo o processo e temperatura mesófila. O meio de produção foi autoclavado a 121°C por 1 hora.

15

Para cada tempo de tomada de amostra do processo, foram retiradas duas alíquotas de 20 mL do mosto, sendo antes desprezados os primeiros 20 mL contidos no tubo de amostragem do biorreator.

20

As alíquotas amostradas em frascos não estéreis foram utilizadas para a realização dos ensaios físico-químicos: determinação de absorbância, pH, massa seca, proteínas totais e atividade enzimática. As alíquotas em frascos estéreis foram utilizadas para os ensaios microbiológicos de contagem de células viáveis totais além de verificação de contaminações por microscopia óptica com lâmina a fresco e coloração de Gram. Foi retirada uma alíquota em tubos esterilizados para os ensaios microbiológicos e uma alíquota em tubos não-esterilizados para os demais ensaios.

25

30 Ensaio enzimáticos - Determinação da atividade proteolítica com azocaseína:

A determinação da atividade proteásica S64 dos diversos pontos do

processo de crescimento foi realizada utilizando-se solução de azocaseína 2% como substrato.

Para o ensaio foi utilizada a seguinte mistura de reação: (1) Amostra (0,1 mL de substrato; 0,1 mL de amostra; 0,2 mL tampão fosfato 200 mM pH8,0);
5 (2) branco da amostra (0,1 mL de substrato; 0,8 mL de ácido tricloroacético 20%; 0,1 mL amostra; 0,2 mL de tampão fosfato 200 mM pH8,0). Os tubos foram incubados a 50°C por quinze minutos. Transcorrido o tempo de incubação, foi adicionado 0,8 mL de ácido tricloroacético nos tubos contendo as amostras. Todos os tubos foram imediatamente resfriados e centrifugados
10 por cinco minutos a 13.000 rpm. A leitura da atividade proteásica foi realizada em espectrofotômetro com um comprimento de onda de 400 nm para determinação da DO. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Neste ensaio de atividade proteolítica, 1 U enzimática foi expressa como $1\Delta OD.mL^{-1}.h^{-1}$.

15 Para a produção de protease S64 a ser utilizada nos ensaios de formulações, ensaios de concentração, estabilização dos extratos enzimáticos e os processos de cultivo do *Bacillus sp* foram realizados.

Acompanhamento do processo de produção de protease alcalina S64 por
20 diversos parâmetros:

Determinação do pH:

O controle do pH em um bioprocesso é importante de ser avaliado, pois é um método de medida simples e rápido de ser determinado. Tendo o perfil da curva de pH dos cultivos, é possível verificar imediatamente as alterações
25 durante um processo de produção.

Determinação dos crescimentos do *Bacilo* 02IM por absorbância:

A absorbância foi determinada em um espectrofotômetro utilizando-se cubeta de acrílico com caminho óptico de 10 mm. A medida de absorbância foi
30 realizada no comprimento de onda de 600 nm, zerando-se o equipamento com água destilada. As amostras dos diversos tempos de crescimento foram

submetidas à homogeneização em vórtice por 15 segundos, diluídas na proporção de 1:50 em água destilada, novamente homogeneizada por 15 segundos e as absorvâncias foram lidas no comprimento de onda especificado.

5 Determinação da massa seca:

As alíquotas referentes aos tempos de crescimento foram agitadas em vórtice por 15 segundos em tubo de ensaio. Uma alíquota de 10 mL do mosto dos crescimentos do Bacilo 02 IM para produção de protease foi filtrada através de sistema de filtração a vácuo, utilizando-se membrana com poro de 0,45 µm, previamente pesadas após as mesmas terem sido mantidas por 3 dias a temperatura de 50 °C. Posteriormente, as amostras secas foram pesadas diariamente até a massa permanecer constante e destes valores foram descontados os pesos iniciais das membranas.

15 As amostras obtidas após a filtração foram transferidas para frascos e mantidas a -20°C para as análises físico-químicas.

Determinação do número de células viáveis totais:

As amostras foram retiradas assepticamente do biorreator, em tubos de ensaio esterilizados e homogeneizadas em vórtice por 15 segundos.

20 As amostras foram diluídas pela técnica das diluições decimais sucessivas até a obtenção das diluições apropriadas para o plaqueamento.

As placas de Petri contendo em média 30 mL de ágar nutritivo foram mantidas à 32°C para secagem, por um período de três dias. A contagem foi realizada segundo o método de "spread-plate".

25

Determinação da concentração de proteína total:

A concentração de proteína das amostras foi determinada pelos métodos de Bradford, biureto, ácido bicinchonínico e espectrofotometria em UV.

30

As determinações de proteína foram realizadas para cada tempo de fermentação e comparadas com a respectiva curva-padrão. A curva foi

preparada utilizando-se albumina sérica bovina.

Ensaio para Determinação de Proteína:

a) Bradford

5 Neste método (Bradford, 1976), 20 μ L de amostra foram adicionados a 1,0 mL de reagente de Bradford (100 mg de comassie Blue G-250, 50,0 mL de etanol 95%, 100 mL de ácido fosfórico e água destilada para um volume final de 1000 mL) e após a incubação a temperatura ambiente por 10 minutos, a quantidade de proteína foi determinada a 595 nm.

10 b) Biureto

Para realização da dosagem de proteína total pelo método do Biureto, em 300 μ L de amostra foram adicionados 700 μ L de reagente Biureto (1,5 g de sulfato de cobre penta hidratado, 6,0 g de tartarato de sódio e potássio em 500 mL de água destilada, 300 mL de hidróxido de sódio 10% e novamente água
15 destilada para um volume final de 1000 mL) e após a incubação a temperatura ambiente por 10 minutos, a quantidade de proteína foi determinada a 520 nm.

c) Ácido bicinchonínico

Em 5 μ L de amostra foram adicionados 100 μ L de reagente ácido bicinchonínico (reagente A: 1% de ácido bicinchonínico, 2% de carbonato de
20 sódio hidratado, 0,16% de tartarato de sódio, 0,4% de hidróxido de sódio e 0,95% de bicarbonato de sódio; reagente B: 4% de sulfato de cobre penta hidratado em água). A relação dos reagentes é de 98 partes de A e 2 partes de B e após a incubação a temperatura ambiente por 30 minutos, a quantidade de proteína foi determinada a 562 nm.

25 d) Espectrofotometria UV

A leitura foi determinada em 280 nm e 205 nm utilizando-se cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm. Em 280 nm as amostras foram diluídas seguindo um fator de 1:50 em água destilada e em 205 nm foram diluídas seguindo um fator de 1: 1000, também em água destilada. Posteriormente
30 aplicou-se o valor obtido na seguinte equação:

$$E_{205} = 27,0 + 120 \times \frac{A_{280}}{A_{205}}$$

Condução do processo e recuperação do produto final:

5 Durante o processo, foram retiradas alíquotas em tempos pré-determinados, para a realização das análises e controles descritos anteriormente.

Ao término dos processos de produção, o mosto foi centrifugado sob refrigeração. O sobrenadante foi armazenado em frasco de vidro esterilizado e
10 congelado para posteriores ensaios.

Ensaio com o sobrenadante das culturas:

Determinação do pH e temperatura:

As atividades da protease S64 foram testadas em uma faixa de pH
15 compreendida entre 3,0 a 10,5. Os tampões utilizados foram tampão citrato/fosfato para pH entre 3,0 e 5,5, tampão fosfato de sódio para pH entre 6,0 e 8,0, tampão Tris-Cl para pH 8,5 e 9,0 e tampão carbonato/bicarbonato de sódio para 9,5, 10,0 e 10,5, todos na concentração de 50 mM. A protease foi ensaiada com azocaseína a 50°C e pH 8,0, sendo incubados por 15 minutos.

20 Para determinação da atividade em função da temperatura, o ensaio de protease S64 foi realizado com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 8,0.

Determinação do pH e temperatura:

O pH ideal de atividade enzimática de protease produzida pelo Bacilo
25 02IM, ao analisar o mosto, está na faixa de 7,5 a 9,0. Está dentro da faixa do concentrado enzimático de protease, comercializado pela empresa Novo Nordisk®, a Alcalase®, que possui uma atividade proteolítica ótima no pH 8,0-9,0. Já a Esperase® possui uma faixa ideal de pH entre 8,0 e 10,0, entretanto, a queda de atividade após o pH 10,0 é mais gradual do que a Savinase®. A
30 curva de atividade após o pH 10,0 do mosto do Bacilo 02IM se apresentou

mais próximo ao comportamento da Alcalase®.

A Savinase® é um concentrado de protease produzido pela Novo Nordisk. Sua característica frente a diferentes pHs é semelhante a Esperase®, outro concentrado protéico da Novo Nordisk . Entretanto, é um produto mais estável quanto à sua auto-hidrólise, pois em sua formulação é adicionado o composto estabilizador 4-FPBA (4-formil-fenil-ácido bórico). A estabilidade enzimática é de extrema importância para garantir a eficiência enzimática após o armazenamento. Atualmente o borato é adicionado às formulações de detergentes líquidos para atender a estes propósitos. O estabilizante adicionado à formulação irá promover estabilidade a Savinase®, assim como para outras enzimas na formulação, como as amilases, lipases e celulasas. O 4-FPBA age como um inibidor reversível da protease.

Outro concentrado produzido pela Novo Nordisk é a Everlase®, que possui uma curva de pH semelhante a Savinase®, porém com uma maior estabilidade em presença de alvejantes.

A temperatura ideal para atividade da protease produzida pelo *B. subtilis* 02IM está na faixa entre 60 e 65°C. A Alcalase®, a Esperase®, a Savinase® e a Everlase® possuem atividade máxima na temperatura de 60°C, apresentando uma queda bem mais pronunciada em temperaturas superiores, em comparação à protease do Bacilo 02IM.

Termoestabilidade:

O sobrenadante do cultivo de protease foi testado para estabilidade térmica a 50°C e 65°C, em diferentes tempos de pré-incubação.

Ao ser testada a termoestabilidade da protease do Bacilo 02 IM, a mesma perdeu pouco mais de 50% da atividade após 2 horas de pré-incubação na temperatura de 50 °C. A partir da décima sexta hora de pré-incubação, o produto não apresentou mais atividade. Ao ser pré-incubado a 65°C, o produto perdeu totalmente a atividade após 2 horas de pré-incubação.

A Alcalase®, após 10 minutos de pré-incubação a 50°C, perdeu 10% de

sua atividade, e a 65°C a perda foi de mais de 40% da atividade. Já a Esperase® apresentou uma maior estabilidade térmica, pois teve uma perda de 20% da atividade ao ser pré-incubada por 10 minutos na temperatura de 65°C.

5 Efeito de inibidores, detergentes, agente redutor e íons sobre a atividade enzimática:

A protease S64 foi pré-incubada durante 30 minutos com os seguintes produtos: surfactante nonil fenol etoxilado 6 M (RENEX 60) e 9,5 M (RENEX 95); 1,5% RENEX 60, 15% RENEX 95, 1,5% e 15% RENEX 95, polietilenoglicol 1%, 5% e 10% e isopropanol 1%, 5% e 10%. Para protease também foram ensaiados com pré-incubação de NaCl 2M, β-mercaptoetanol 5% e EDTA 2 mM. O resultado foi apresentado como % de atividade residual relativo ao controle sem os produtos.

O efeito de íons na atividade de protease S64 foi determinado após a pré-incubação por 30 minutos das enzimas com 4 mM de sulfato de cobre, sulfato de manganês, sulfato de zinco, cloreto de cálcio, sulfato de cálcio, sulfato ferroso e cloreto de lítio.

A concentração 4 mM de íons causou diminuição da atividade da protease de *B. subtilis* 021M quando adicionado sulfato de cobre (48,6%), sulfato de zinco (1,7%) e sulfato ferroso (34,3%). Ocorreu um aumento quando adicionado sulfato de manganês (14%) e cloreto de lítio (9,4%). A adição de sais de cálcio, cloreto de cálcio (21,5%) e sulfato de cálcio (34,5%) causaram os maiores aumentos de atividade enzimática.

A concentração de 2 M de cloreto de sódio reduziu em 15% a atividade e o β-mercaptoetanol em 25,3%.

Os surfactantes, a mistura dos mesmos, e o isopropanol, produtos geralmente presentes na formulação dos detergentes, não alteraram de maneira significativa à atividade de protease.

O polietilenoglicol também não alterou a atividade enzimática. Este produto não é utilizado nas formulações de detergente, entretanto está presente nas formulações de concentrados de protease líquidas da empresa

Novo Nordisk em até 50%.

Concentração e purificação:

Sulfato de amônio:

- 5 As concentrações dos mostos protéicos foram realizadas utilizando sulfato de amônio na concentração de 85%. Foi realizada também uma concentração/purificação fracionada, utilizando as seguintes faixas de concentração de sulfato de amônio: 0-20% e 0-40%.

10 Membrana de ultrafiltração:

O processo de concentração utilizando ultrafiltração foi realizado com membranas de celulose regenerada com poro de 10 kDa e de 50 kDa.

Purificação e Concentração:

- 15 Os sobrenadantes de cultura foram dialisados por 24 horas contra tampão tris-Cl 50 mM pH 8,5, a 4° C, em sacos de diálise com poro de exclusão de 12 a 14 kDa.

Cromatografia em coluna DEAE-Sepharose e CM-celulose:

- 20 Após lavagem e equilíbrio da coluna com tampão tris-Cl 50 mM pH 8,5, foram aplicados na coluna C26/40 1.000 mL das amostras contendo 200 mL de resina DEAE-Sepharose e CM-celulose. Inicialmente, foram aplicados 4 volumes de coluna do tampão de equilíbrio. A primeira etapa de eluição foi realizada com tampão até a leitura em 280 nm voltar a linha de base.
- 25 Posteriormente, foi aplicado um gradiente de NaCl que foi levado até 1,0 M em 6 a 7 volumes de coluna. O fluxo utilizado foi de 5 mL.min⁻¹ (resina DEAE Sepharose) e 2,5 mL (CM celulose). Foi coletada fração de 20 mL. O acompanhamento da purificação foi realizado com leitura das frações em 280 nm e ensaio de atividade com azocaseína 2%. A purificação foi realizada a
- 30 temperatura ambiente.

Todas as formulações experimentais utilizando os lotes de produção

experimental de protease foram realizadas adicionando os produtos enzimáticos no volume de 200 mL.L^{-1} de protease. Os lotes apresentaram estabilidade e características visuais semelhantes aos detergentes formulados com concentrados enzimáticos comerciais. Entretanto, ao ser realizada a
5 concentração utilizando membranas de celulose regenerada de 10 kDa de poro, a concentração de proteína nos concentrados enzimáticos experimentais foi excessivamente elevada.

Ao ser determinada a proteína pelo método do ácido bicinchonínico, foi encontrada a concentração média protéica no mosto centrifugado e filtrado
10 de protease de $2,04 \pm 0,31 \text{ mg.mL}^{-1}$. Ao ser realizada a concentração, foi feita próxima a 10x, onde foi encontrada uma concentração média de proteína de $20,14 \pm 2,18 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Como a formulação comercial do detergente enzimático recebe até 10% de isopropanol, este solvente pode acarretar uma precipitação de proteínas,
15 causando o aparecimento de precipitados nas formulações experimentais.

Para solucionar este problema foram testadas precipitações fracionadas com sulfato de amônio, pré-filtragem em membrana de ultrafiltração com poro de 50.000 Da e passagem do mosto centrifugado e filtrado em resinas de troca iônica.

20

Sulfato de amônio:

Na faixa de 0-20% houve uma manutenção de 88% da atividade e uma redução de proteína de 19%. Na faixa de 0-40%, apenas 60% da atividade enzimática se manteve com uma redução de 63,7% da proteína total. Na faixa
25 de 0-60%, houve uma manutenção da atividade de 44% e uma diminuição da proteína total em 77,4%.

No processo de concentração, utilizando a faixa de 0-85%, foi mantido 75,5% da atividade, mas houve uma redução de apenas 3% na proteína total.

A utilização de sulfato de amônio não influenciou na atividade
30 enzimática, sendo que se for utilizado a faixa de 0-20%, estará com uma concentração protéica dentro da faixa dos produtos comerciais, desta forma

não causando precipitação de proteína quando presente na formulação do detergente enzimático.

TABELA 2. Purificação parcial do mosto de crescimento de *B. subtilis* 02IM.

- 5 Precipitação fracionada utilizando sulfato de amônio. Ensaio enzimático utilizando tampão fosfato de sódio 50mM, pH8,0. Tempo de incubação 15 minutos. Temperatura de 50°C. Substrato azocaseína 2%. Determinação de proteína pelo método de Bradford.

Faixa de NH ₄ (SO ₄) ₂	Atividade (U mL.h ⁻¹)	Proteína (mg.mL ⁻¹)	Manutenção Atividade (%)	Redução de Proteína (%)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)
Mosto	165,40	2,26	100,00	0,00	73,19
0-20%	147,01	1,81	88,91	19,91	81,22
0-40%	99,56	0,82	60,19	63,72	121,41
0-60%	73,37	0,51	44,36	77,43	143,86
0-85%	1.248*	21,93*	75,46	2,96	56,90

- Analisado material concentrado 10x.

TABELA 3: Concentração/purificação do mosto de crescimento de *B. subtilis* 02IM, através de membranas de ultrafiltração. Ensaio enzimático utilizando tampão fosfato de sódio 50mM, pH8,0. Tempo de incubação 15 minutos. Temperatura de 50°C. Substrato azocaseína 2%. Determinação de proteína pelo método de Bradford.

Material da Membrana	Volume final (mL)	Atividade (U.Ml.h ⁻¹)	Atividade total (U)	Proteína (mg.mL ⁻¹)	Ptn total (mg)	Manutenção Atividade (%)	Redução de Proteína (%)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)
Mosto	7.000	184,63	1.292.410	2,26	15.820	100,0	0,00	81,69
Concentr. 10 kDa	660	1.580,40	1.043.064	19,12	12.619	80,7	20,23	82,66
Permeado 50kDa	6.810	175,98	1.198.424	1,48	10.078	92,7	36,30	118,91
Permeado 50 kDa Concentr. em 10kDa	600	1680	1.008.000	16,41	9.846	78,0	37,76	102,38

Membrana de ultrafiltração:

Na passagem pela membrana de 10kDa, o concentrado manteve 80,7% da atividade e houve uma redução 20,23% de proteína. Na passagem pela membrana de 50kDa, o permeado manteve 92,7% da atividade e houve uma redução 36,3% de proteína. Na passagem do permeado da membrana de 50kDa, pela membrana de 10kDa, o concentrado manteve 78,0% da atividade e houve uma redução 37,7% de proteína.

Este processo não se mostrou satisfatório para o fim desejado, pois o produto final apresentou uma concentração de 16,41 mg.mL⁻¹ de proteína, dosado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) (Tabela 20).

Cromatografias do mosto de protease:

Ao ser utilizada uma resina de troca iônica DEAE Sepharose, foi observado que a protease ligou-se à resina, nas condições do experimento. Neste processo, 88,3% da atividade foi mantida, com uma redução de 46,5% de proteína, dosada por A_{280nm}.

Já com a utilização da resina CM celulose, a protease foi eluída. Foi mantido 93% da atividade de protease, com uma redução de 75% de proteína total.

5 A resina mais eficiente para retirada de proteína foi a CM celulose. Não foi possível realizar a concentração deste material, devido ao baixo volume, para podermos avaliar formulações experimentais. Apesar da eficiência da resina DEAE Sepharose ter sido inferior, estabelecendo a concentração exata de cloreto de sódio, para realizar a eluição da coluna esta eficiência aumentará enormemente.

10 Um grande problema enfrentado nos processo de concentração do mosto de protease, nas membranas de celulose regenerada, foi possivelmente causado pela presença de polímeros complexos de carboidratos sintetizados pelo Bacilo 02IM, a partir de carboidratos presentes no meio de cultura. Estes polímeros complexos são constituídos a partir de rafinose e estaquiose.

15 Conforme o processo de concentração avançava, o material tornava-se mais viscoso, diminuindo em muito a produtividade da concentração. Estes polímeros foram eliminados ao ser utilizada a resina DEAE Sepharose.

Reivindicações

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PROTEASE E COMPOSIÇÕES PARA LIMPEZA

1. Processo de produção de protease alcalina caracterizado pelo fato de
5 compreender o cultivo da bactéria *Bacillus sp.* linhagem 02IM em meio submerso.
2. Processo, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o cultivo ocorre em temperatura mesófila e com fornecimento de oxigênio em concentração acima da inibitória mínima .
- 10 3. Composição para limpeza compreendendo protease alcalina, caracterizada pelo fato de a referida protease ser obtida do cultivo da *Bacillus sp.* linhagem 02IM.
4. Composição, conforme reivindicação 3, caracterizada pelo fato de a referida protease ter elevada atividade enzimática e ser estável na presença de
15 surfactantes.
5. Composição, conforme reivindicação 3, caracterizada por adicionalmente compreender outras enzimas e agentes de branqueamento.

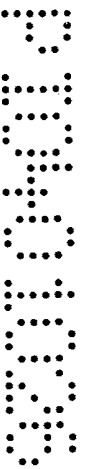
Bcereus : GGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGA --- ACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGCATTAAAGAGCTTGCTC : 83
 bacsub : GGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGA --- ACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGATGC - GAGCTTGCTC : 82
 seqsid : CGAAAAGCGTCCGGAGCGAACAGGATTAAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAACGATAAGT --- GCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGC : 83

* 100 * 120 * 140 * 160 *
 Bcereus : TTATGAAGTTAGCGCGGACCGGTGA - GTAAC - - ACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTCGGAT - - - - - AACTCCGCGAAACCG : 159
 bacsub : CC - TGATGTTAGCGCGGACCGGTGA - GTAAC - - ACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTCGGAT - - - - - AACTCCGCGAAACCG : 157
 seqsid : CCCTAAGTCTTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCCGCTGGCGACTACCGTGGCAAGACTGAAAGTCAAAGGAATTGACGGGGCCCC : 169

180 * 200 * 220 * 240 * 2
 Bcereus : GGGCTAATACCGGATA - - ACATTTTCAACCGCA - TGGTTCGAA - - - - - ATTGAAAGGC - - - GGCTTCGGCTGTCA - - CTTATGGATG : 233
 bacsub : GGGCTAATACCGGATG - - GTTGTTTCAACCGCA - TGGTTCAAA - - - - - CATAAAAGGT - - - GGCTTCGGCTACCA - - CTTACAGATG : 231
 seqsid : GCACAAGCGCTCCAGCATCTGCTTTAATTGCAAGCAACGGCAAGAAAGCTTACCAGGCTCTGACATCCCTCTGACATACCTAGAGATA : 255

60 * 280 * 300 * 320 *
 Bcereus : G - ACCCGC - - - - - GTCGCATTAGCTANTTG - GTGAGGTAACG - - - GCTC - - ACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTG : 300
 bacsub : G - ACCCGC - - - - - GGCGCATTAGCTAGTTG - GTGAGGTAATG - - - GCTC - - ACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTG : 298
 seqsid : GGAGCTCCCTTCCGGGGCAGAGTCACAGGTCGCTGCATGCTGCTGCTCAGCTCCGCTCTGCTCA - CATGTTGGGTAA - GGCCCC : 334

FIGURA 1



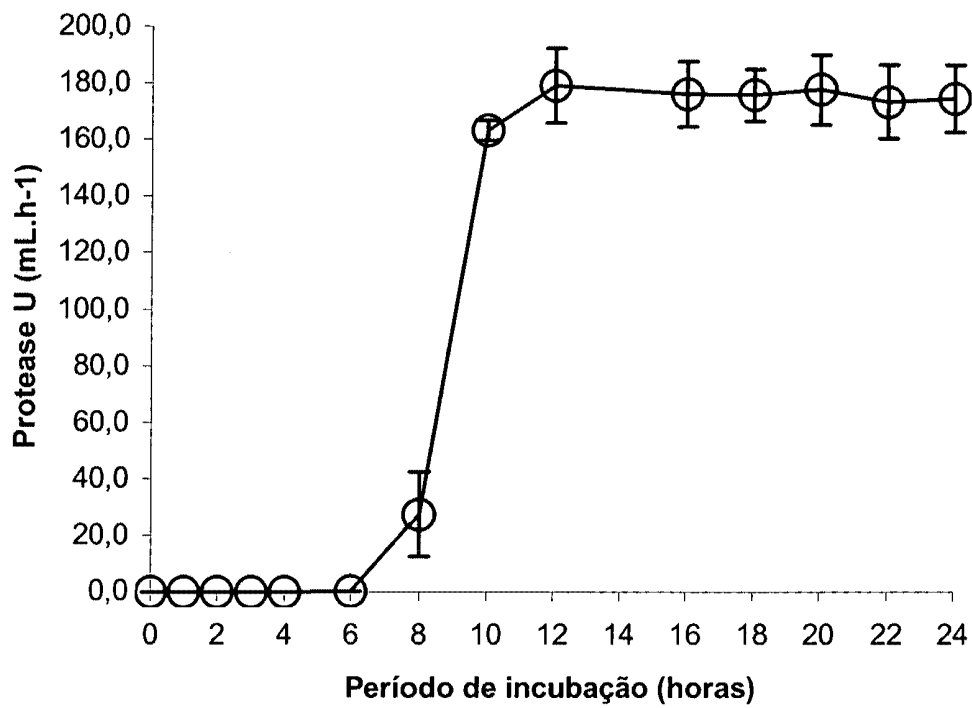


FIGURA 2

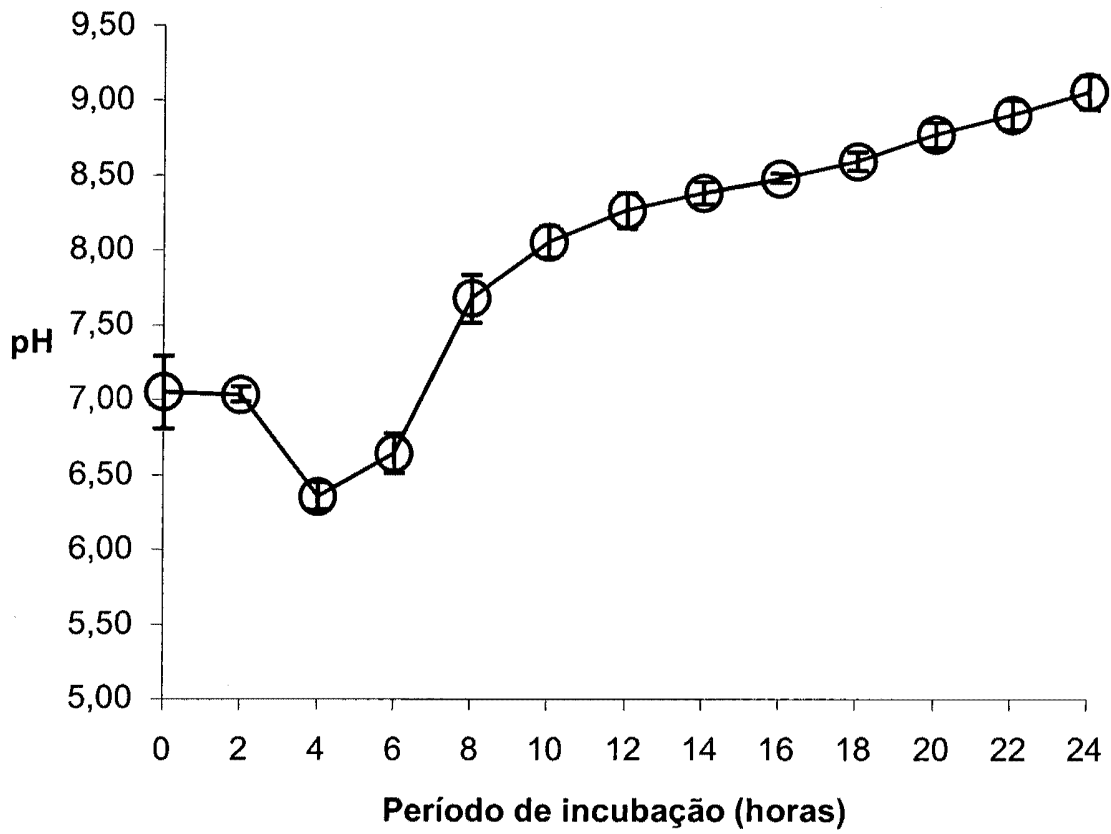


FIGURA 3

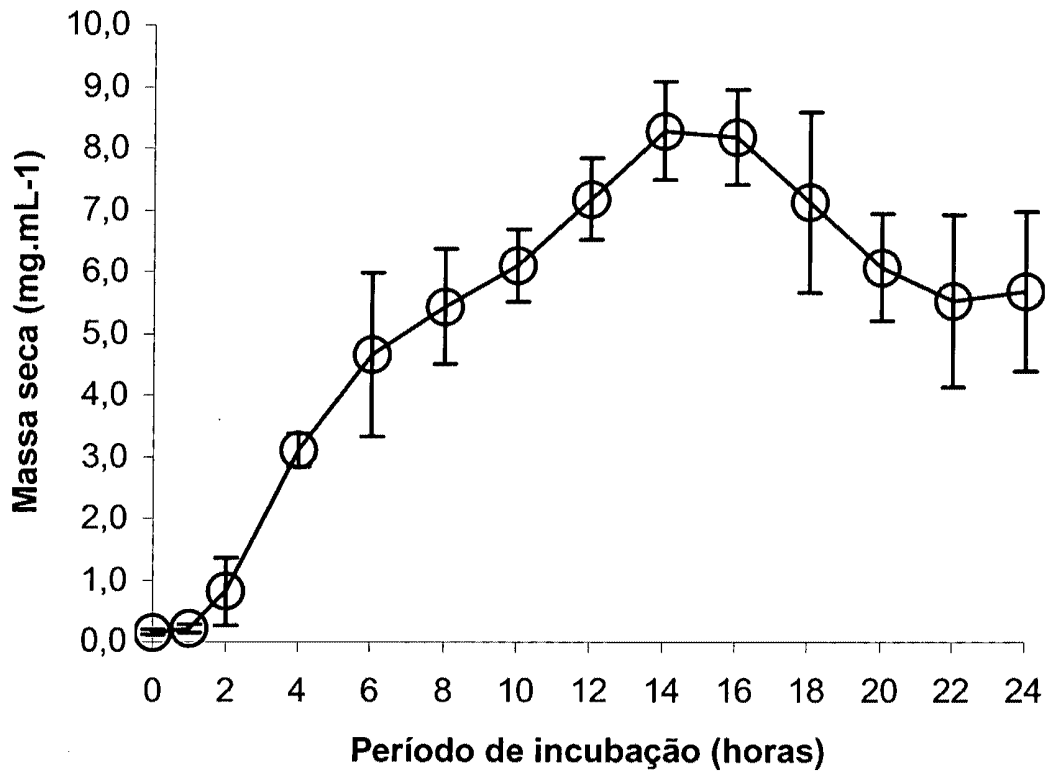


FIGURA 4

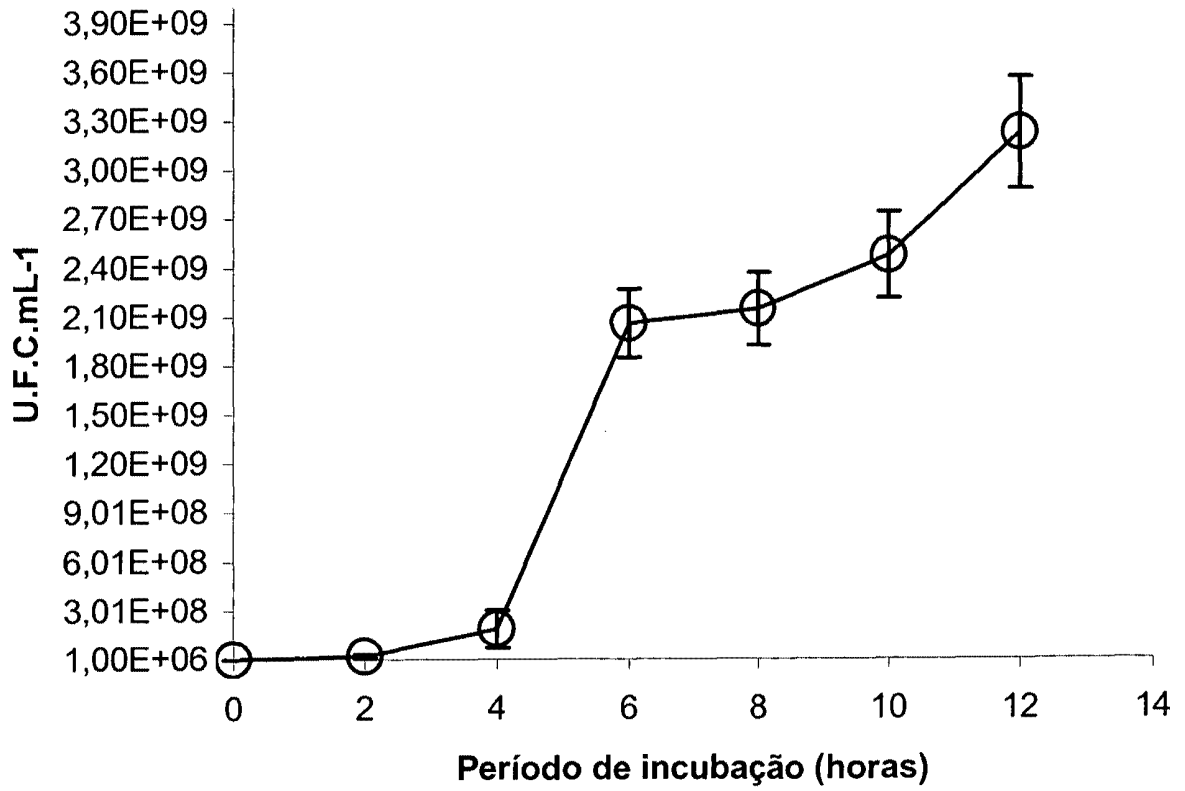


FIGURA 5

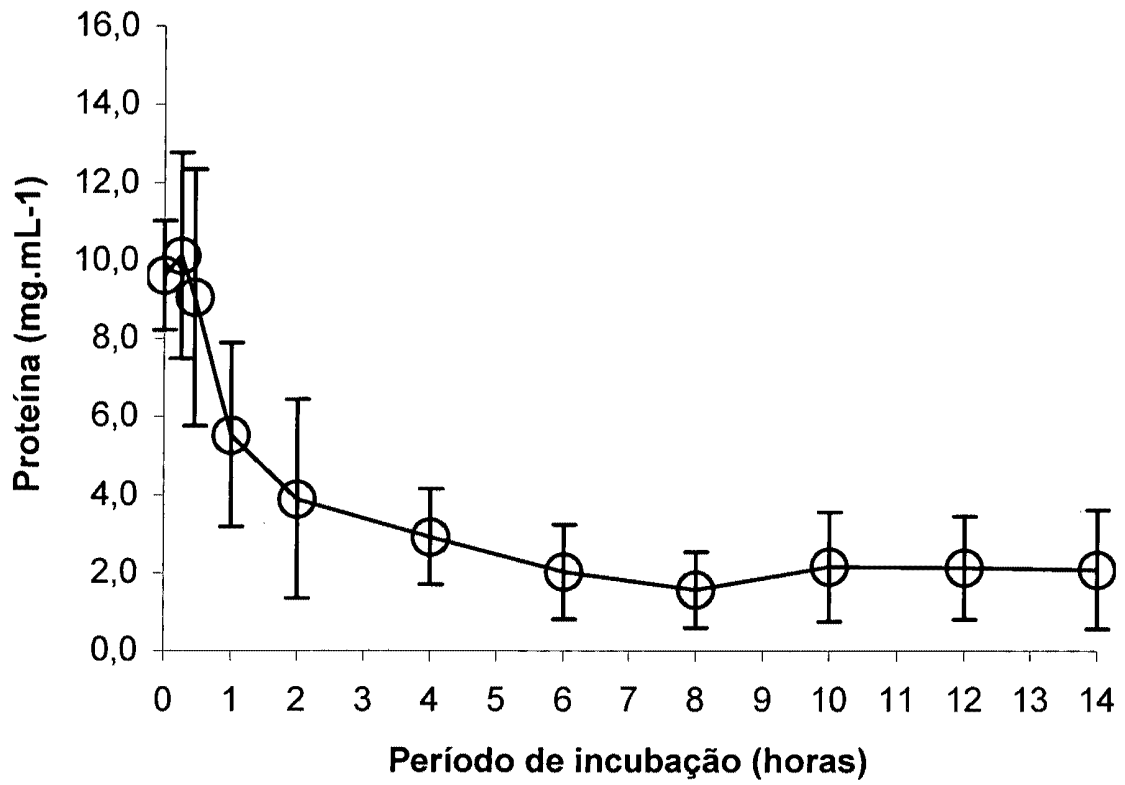


FIGURA 6

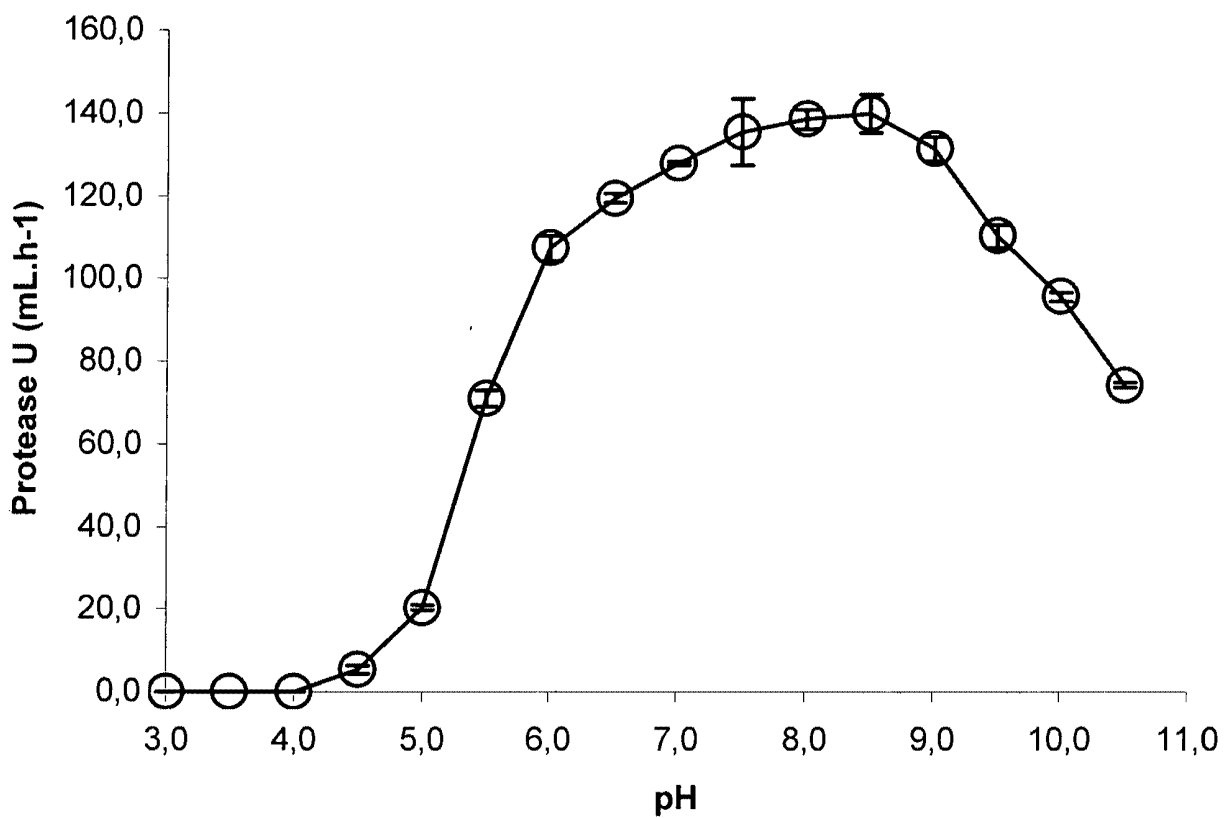


FIGURA 7

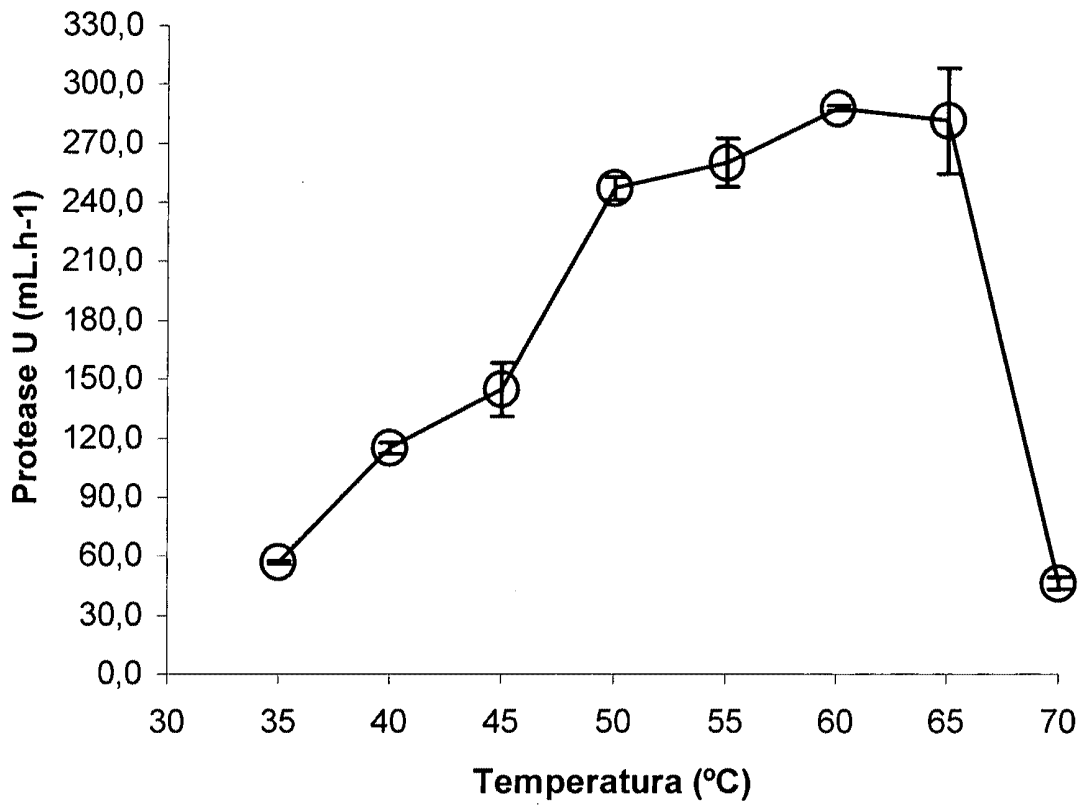


FIGURA 8

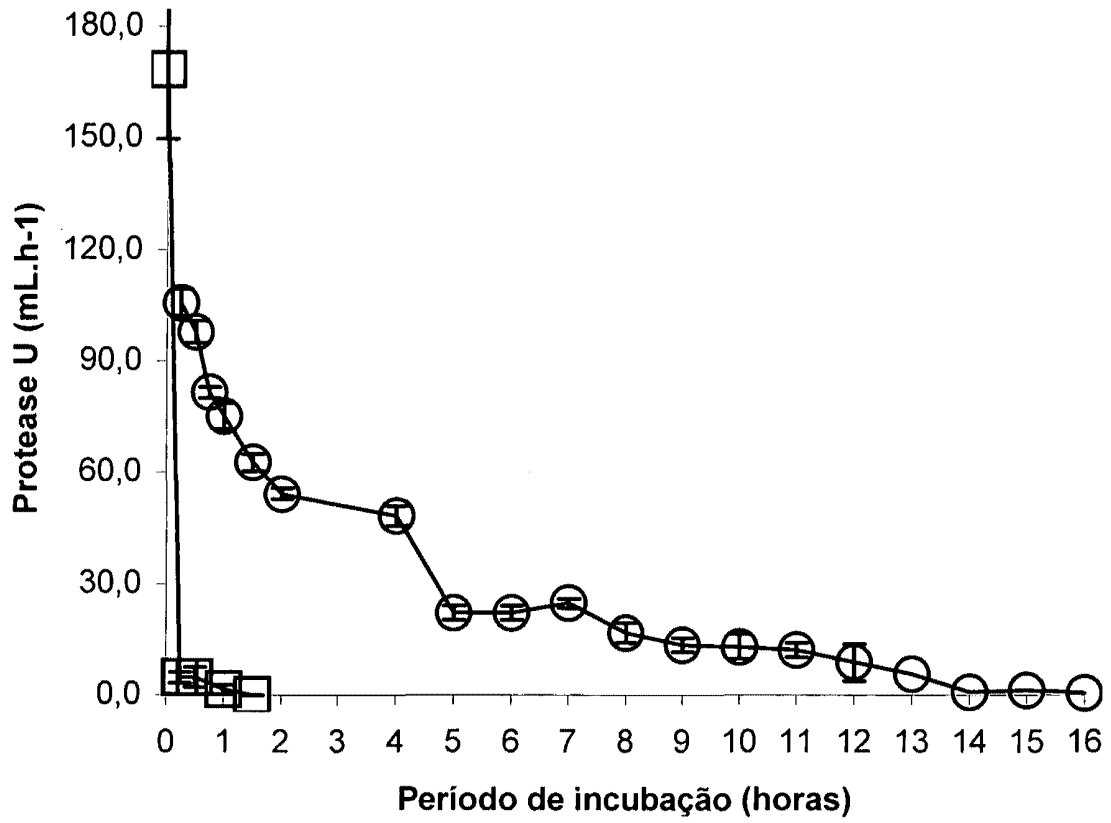


FIGURA 9

10/12

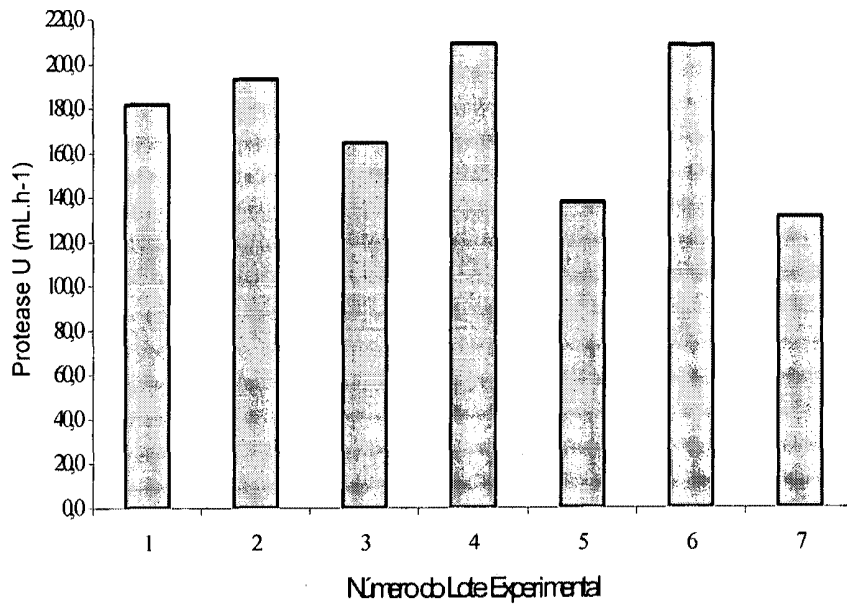


FIGURA 10

11/12

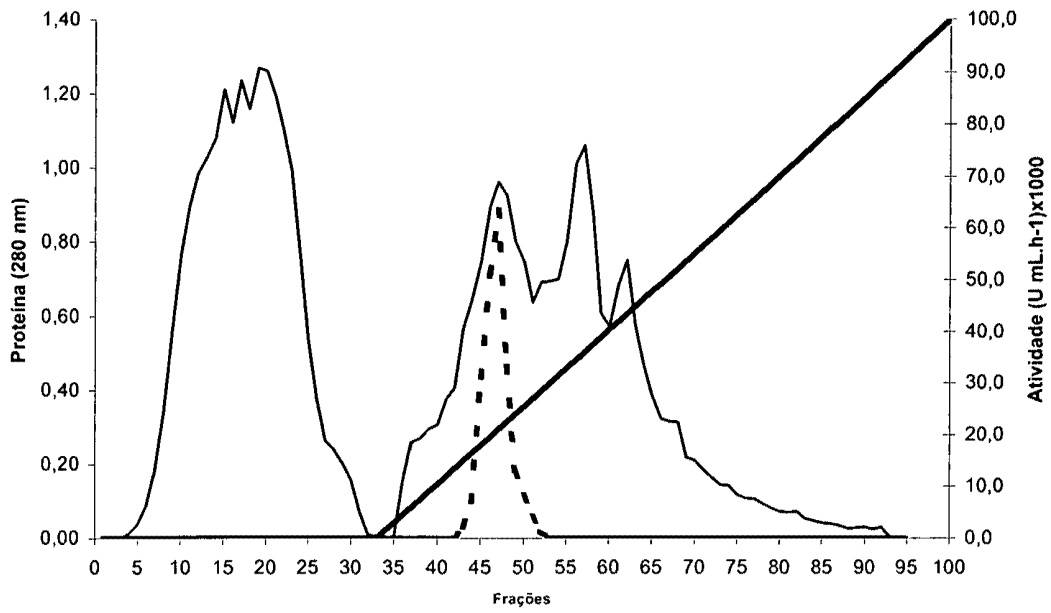


FIGURA 11

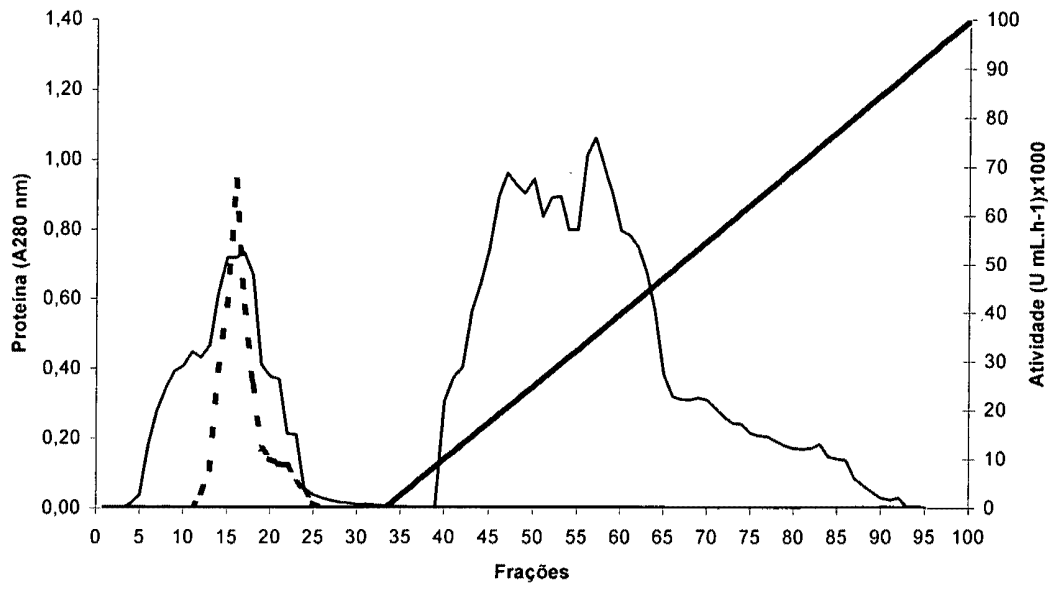


FIGURA 12

Resumo**PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PROTEASE E
COMPOSIÇÕES PARA LIMPEZA**

5 A presente invenção descreve um processo de produção de uma protease alcalina S64 a partir da utilização de um *Bacillus sp.* linhagem 02IM; o crescimento é feito em processo submerso utilizando como meio de cultura um composto contendo uma ou mais fontes de nitrogênio, carbono sais minerais e complementos nutricionais, sendo o processo realizado em temperatura

10 mesófila e com fornecimento de oxigênio em quantidade acima da concentração inibitória mínima durante todo o processo; são também descritas composições de limpeza compreendendo as referidas proteases.