



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

(11) (21) **PI 0401027-2 A**

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



(51) Int. Cl.:
C12N 9/30
C11D 3/386

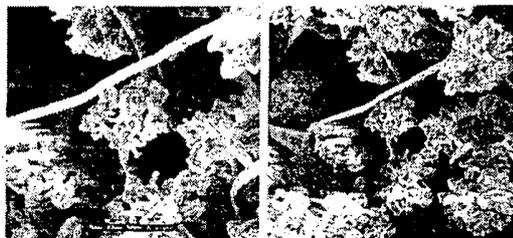
(54) Título: **PROCESSO DE PRODUÇÃO DE AMILASE TERMOESTÁVEL E COMPOSIÇÕES PARA LIMPEZA**

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

(72) Inventor(es): Sydnei Mitidieri Silveira, Marilene Henning Aintein, Augusto Schrank

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

(57) Resumo: "PROCESSO DE PRODUÇÃO DE AMILASE TERMOESTÁVEL E COMPOSIÇÕES PARA LIMPEZA". A presente invenção descreve um processo de produção de uma amilase termóestável HM2003 a partir da utilização de um *Aspergillus* linhagem CBiot-UFRGS; 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 amilases.



Relatório Descritivo

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE AMILASE TERMOESTÁVEL 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 amilase termoestável produzida a partir de um fungo filamentososo de linhagem CBiot-UFRGS 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. O produto após separação do micélio e concentrado é estável em surfactantes e em outros produtos utilizados em formulações para uso industrial em detergentes e outras aplicações industriais.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As enzimas são biocatalisadores cuja excepcional capacidade catalítica tem atraído a atenção daqueles que atuam na industrial. As enzimas estão presentes em todos os sistemas biológicos. São moléculas biológicas, e quando degradadas são reaproveitadas como aminoácidos. Agem em matérias-primas renováveis, como frutos, cereais, leite, gorduras, carne, algodão, couro, madeira e inúmeros outros. Sendo originalmente produzidas para atuar em células vivas, mantêm a atividade em pressão atmosférica e em condições moderadas de temperatura e pH. A maioria das enzimas possui uma atividade máxima a temperaturas de 30 a 70°C em pH próximo ao neutro.

As enzimas de origem microbiana são utilizadas no processamento de alimentos, manufatura de detergentes, têxteis, indústria farmacêutica e terapêutica. O uso diversificado das enzimas se deve a sua característica de atuar como biocatalisadores. 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 temperatura e pH de diferentes processos de produção.

Quase todas as enzimas industriais originam-se de microrganismos. Um determinado microrganismo pode sintetizar mais de mil enzimas diferentes. Um período
5 longo de experimentação laboratorial é necessário para se isolar o melhor microrganismo produtor de um tipo particular de enzima. Quando este microrganismo adequado é encontrado, inicia-se a segunda etapa de pesquisa. O microrganismo deve ser “domesticado” de forma a produzir a enzima desejada com alto rendimento. A técnica de bioprocessamento tornou possível a produção de enzimas por microrganismos, de
10 forma economicamente viável e em quantidades virtualmente ilimitadas. O produto final de um bioprocessamento é uma mistura contendo uma série de enzimas.

As amilases, produzidas por fungos ou bactérias, são hidrolases capazes de degradar especificamente as ligações glicosídicas do amido (amilose, amilopectina) e de seus produtos de degradação (maltodextrinas) até o estágio de oligossacarídeos ou
15 monossacarídeos. São amplamente distribuídas entre os microrganismos, animais e vegetais, onde estão presentes em vários processos biológicos tais como a digestão de alimentos por animais e microrganismos e a germinação e maturação de grãos. São amplamente empregadas na indústria, para despolimerização do amido originando substratos que são importantes na preparação de xaropes de glicose, maltose ou mistos,
20 panificação, cervejaria, produção de etanol e na formulação de detergentes, onde são utilizadas para a remoção de resíduos de alimentos ricos em amido. Segundo seu modo de ação sobre a molécula de amido são classificadas em α -amilases, β -amilases, glicoamilases, isoamilases, pululanases e ciclodextrinas glicosiltransferases.

As α -amilases (1,4- α -glicano-glicohidrolases EC 3.2.1.1) são endoenzimas
25 extracelulares que hidrolisam aleatoriamente ligações α -1,4 no interior da molécula de amido, sem hidrolisar as ligações α -1,6. A hidrólise do amido por estas enzimas origina uma mistura de glicose, maltose e amilopectina, ou seja, oligossacarídeos ramificados e não ramificados que contém ligações α -1,6.

As β -amilases (α -1,4-glicano-maltohidrolases EC 3.2.1.2) são endoenzimas,
30 usualmente sintetizadas por plantas superiores, entretanto, alguns microrganismos tais como *Bacillus polymyxa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* e algumas espécies de

Streptomyces e *Rhizopus japonicus*, também as produzem. As enzimas produzidas por microrganismos possuem uma grande resistência a temperaturas altas ($> 70^{\circ}\text{C}$), sendo esta resistência maior do que as β -amilases isoladas de plantas. Atuam retirando unidades de maltose na forma β -anomérica das extremidades não redutoras das moléculas de amido. Na molécula de amilose obtém-se como resultado final à maltose quase pura. Entretanto, como não possui ação sobre ligações α -1,6 da amilopectina, a reação de depleção do amido termina dando origem a fragmentos de polissacarídeos conhecidos como β -dextrinas.

As glicoamilases (α -1,6-glicano-glicohidrolases) (E.C.3.2.1.3) são exoenzimas que atuam sobre ligações α -1,4 da extremidade não redutora do amido e da amilopectina, retirando monômeros a partir da extremidade da molécula. As moléculas de maltose também são hidrolisadas, porém, muito lentamente. Assim, glicose, maltose e uma quantidade de dextrinas são obtidas a partir do amido.

As isoamilases (glicogênio 6-glicanohidrolase, EC 3.2.1.68) hidrolisam a ramificação do amido liberando glicose e maltose. Sua ação ocorre nas ligações α -1,6 das amilopectinas, glicogênio e em algumas dextrinas ramificadas e oligossacarídeos. Entretanto, estas enzimas não hidrolisam as ligações α -1,6 da pululana e de β -dextrina limite. Esta característica foi atribuída a sua baixa afinidade por cadeias laterais curtas da molécula de amido.

As pululanases (α -dextrina 6-glicanohidrolase, E.C. 3.2.1.41) atuam diretamente sobre a amilopectina hidrolisando as ligações α -1,6. Atuam também sobre as ligações α -1,6 da pululana que, por sua vez, são separadas por três ligações glicosídicas do tipo α -1,4 liberando moléculas de maltotriose.

As ciclodextrinas glicosiltransferases (EC 2.4.1.19), ciclodextrinases, hidrolisam o amido e outras glicanas com ligações α -1,4, formando estruturas circulares (ciclodextrinas) unidas por ligações glicosídicas do tipo α -1,4. São geralmente enzimas extracelulares, encontradas principalmente em microrganismos. As ciclodextrinas são maltoligosacarídeos cíclicos com 6 a 12 unidades de glicose, porém, as mais estáveis possuem 6, 7 ou 8 unidades. Caracteriza-se pela presença de uma cavidade interna hidrofóbica, revestida por grupos CH e uma superfície externa hidrofílica. Estas

desenvolvimento de enzimas alternativas. 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 amilases de uso industrial, sendo a referida amilase denominada HM2003 e produzida por uma espécie de *Aspergillus*, de linhagem isolada pelo Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot-UFRGS). A amilase da presente invenção apresenta grande termoestabilidade, estabilidade satisfatória para uso em detergente e outras aplicações industriais. Além disso, a presente invenção proporciona as seguintes características vantajosas.

- 10 1) A atividade enzimática de amilase termoestável superior a 100 U em cada mL de mosto de crescimento antes do processo de concentração, determinada à temperatura de 42°C em pH 6,0, utilizando método sacarificante e como substrato amido solúvel 1%;
- 2) O rendimento enzimático de amilase termoestável superior a 5 U para cada mg de meio utilizado;
- 15 3) A produtividade enzimática de amilase termoestável superior a 5 U por hora de bioprocessos;
- 4) A atividade enzimática de amilase termoestável na faixa de pH de 3,5 a 7,5;
- 5) A temperatura de atividade ótima entre 50 e 60°C;
- 20 6) A manutenção de atividade enzimática de amilase acima de 50% após 100 horas à temperatura de 53°C;
- 7) Mesma atividade de hidrólise sobre amido de mandioca, milho, arroz, batata e amilopectina;
- 8) Aumento de atividade enzimática de amilase termoestável em pelo menos 50% em formulação contendo 1,5% de surfactante Nonil Fenol etoxilado 6M;
- 25 9) Nenhuma perda de atividade enzimática de amilase termoestável em formulação contendo 15% de surfactante Nonil Fenol etoxilado 9,5M;
- 10) Aumento de atividade enzimática de amilase termoestável em pelo menos 50% em formulação contendo a mistura de 1,5% de surfactante Nonil Fenol etoxilado 6M e 15% de surfactante Nonil Fenol etoxilado 9,5M;
- 30

- 5
- 11) A perda de atividade enzimática de amilase inferior a 5% em formulação contendo 1, 2, ou 5% de isopropanol;
- 12) A manutenção da atividade enzimática de amilase em soluções aquosas contendo concentração igual ou inferior a 4 mM dos íons de magnésio e cálcio;
- 13) Sem ocorrência de inibição de atividade enzimática de amilase termoestável, na presença de até 10 mM de glicose ou maltose;
- 14) A manutenção da atividade enzimática de amilase termoestável superior a 70% utilizando membranas de ultrafiltração com sobrepressão igual ou inferior a 2kgf/cm².
- 10
- 15) A massa molecular da amilase HM2003 de 62.000±3.000 através de gel de poliacrilamida SDS-PAGE;
- 16) O ponto isoelétrico de 3,3±0,6 por cromatografia de focalização isoelétrica em Rotofor;
- 15
- 17) A amilase termoestável HM2003 especificada nos itens acima de 1 a 16 é produzida por um microrganismo que pertence ao gênero *Aspergillus*;

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

20 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 amilases alternativas às atualmente disponíveis.

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

Em um outro aspecto, sendo, portanto, um adicional objeto da presente invenção, é provido um processo para a produção das referidas amilases, sendo o referido processo caracterizado pelo cultivo do fungo filamentosso *Aspergillus* linhagem CBiot-UFRGS em processo submerso.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

- FIGURA 1: Aspecto morfológico do *Aspergillus* CBiot-UFRGS. Microscopia eletrônica de varredura.
- FIGURA 2: Atividade amilolítica pelo método dextrinizante da amilase HM2003.
- 5 FIGURA 3: Atividade amilolítica pelo método sacarificante da amilase HM2003.
- FIGURA 4: Determinação do crescimento celular por da massa seca durante a produção de amilase HM2003. Filtragem em papel filtro.
- FIGURA 5: Concentração de amido pelo método de Fuwa durante a produção de amilase HM2003.
- 10 FIGURA 6: Concentração de açúcares redutores totais durante a produção de amilase HM2003.
- FIGURA 7: Concentração de glicose durante a produção de amilase HM2003.
- FIGURA 8: Concentração de proteína pelo método de Biureto durante a produção de amilase HM2003.
- 15 FIGURA 9: Atividade enzimática de amilase HM2003 em função do pH.
- FIGURA 10: Atividade enzimática de amilase HM2003 em função da temperatura.
- FIGURA 11: Estabilidade térmica da amilase HM2003 de *Aspergillus* CBiot-UFRGS.
- FIGURA : Atividade amilolítica em diferentes nutrientes determinada pelo método
- 20 dextrinizante, utilizando diversas fontes de amido comercial.
- FIGURA 12: Cromatografia de troca iônica do mosto de crescimento de *Aspergillus* CBiot-UFRGS.
- FIGURA 13: Cromatografia de troca iônica do mosto de crescimento de *Aspergillus* CBiot-UFRGS.

25

DESCRIÇÃO DATALHADA DA INVENÇÃO

A confirmação da identificação da linhagem CBiot-UFRGS foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura. A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para observar as estruturas do fungo filamentosos. Após crescimento em placa

30 de Petri contendo o meio MCC na temperatura de 28°C por 7 dias. O micélio foi fixado com glutaraldeído 1% (v/v)/formaldeído 4% (v/v) à temperatura ambiente. A seguir as

amostras foram lavadas três vezes em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 e fixado em tetróxido de ósmio 1% (p/v) por uma hora e submetido novamente a três lavagens com o mesmo tampão.

5 Após este procedimento, o material foi desidratado em banhos com concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 80, e 90% (v/v)), por quinze minutos cada concentração e mais duas vezes em acetona 100% por dez minutos. O material foi levado ao aparelho de secagem ao ponto crítico para completa secagem. Em seguida, o material foi colocado em suportes de alumínio (“stubs”) com fita dupla face e levado ao aparelho “Sputter Coaters” para ser revestido com uma película de ouro.
10 Posteriormente, o material foi analisado ao microscópio eletrônico de varredura.

O micélio deste fungo filamentosos, em placas de Petri contendo ágar Czapeck, tinha característica lanosa de coloração branca, migrando posteriormente para o preto.

Foi observado hifas aéreas e os conidiósporos em cadeia, produzidos pelo *Aspergillus* CBiot-UFRGS. Os conidiósporos apresentam uma característica radial.

15

Manutenção em baixa temperatura

O fungo foi semeado em placas contendo meio Cove completo (MCC). As placas foram incubadas em estufa por 7 dias na temperatura de 28°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com 20 mL de água destilada estéril contendo 0,01% de Tween 80. A
20 suspensão obtida foi centrifugada a 5.000 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado. Os esporos foram novamente suspensos em solução de 0,01% de tween 80 estéril, repetindo-se o processo de centrifugação. Os esporos lavados foram suspensos em uma solução estéril de glicerol a 20% e realizado o teste de pureza da suspensão por adição de 10µL da suspensão de esporos em tubo contendo 10 mL de LB, incubado a
25 37°C por 24 horas.

Testada a ausência de contaminação, o material foi dividido em alíquotas de 100 µL utilizando tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, selados, congelados por 24 horas a -10°C e posteriormente mantidos a -20°C, -80°C e -196°C.

TABELA 1: Manutenção dos esporos de *Aspergillus* CBiot-UFRGS.

Tempo	Condições de manutenção			
	-20°C	-80°C	-196°C	Liofilização
0	$8,8 \times 10^9 \pm 1,9 \times 10^9$			
7 dias	$8,1 \times 10^9 \pm 1,3 \times 10^9$	$8,3 \times 10^9 \pm 1,7 \times 10^9$	$8,5 \times 10^9 \pm 1,7 \times 10^9$	$1,2 \times 10^2 \pm 1,2 \times 10^2$
30 dias	$8,4 \times 10^9 \pm 1,7 \times 10^9$	$9,1 \times 10^9 \pm 1,5 \times 10^9$	$8,8 \times 10^9 \pm 1,9 \times 10^9$	-
2 meses	$7,9 \times 10^9 \pm 1,8 \times 10^9$	$8,5 \times 10^9 \pm 2,2 \times 10^9$	$8,3 \times 10^9 \pm 1,9 \times 10^9$	-
3 meses	$7,9 \times 10^9 \pm 1,7 \times 10^9$	-	$8,2 \times 10^9 \pm 2,1 \times 10^9$	-
4 meses	$8,5 \times 10^9 \pm 1,6 \times 10^9$	-	$8,7 \times 10^9 \pm 2,3 \times 10^9$	-
6 meses	$8,9 \times 10^9 \pm 2,1 \times 10^9$	-	$8,5 \times 10^9 \pm 2,6 \times 10^9$	-

Determinação dos esporos viáveis.mL⁻¹. pela técnica de “spread plate”. Ensaio realizado com cinco repetições. Média±desvio padrão.

5 Preparação da suspensão de esporos do *Aspergillus* CBiot-UFRGS

Para preparação da suspensão de esporos de *Aspergillus* CBiot-UFRGS o fungo foi cultivado em 100 g de arroz em um Erlenmeyer de 2.000 mL adicionado de 30 mL de água esterilizado a 121°C por 30 minutos e mantido em estufa a 28°C por 10 dias 28°C por 10 dias. O arroz foi autoclavado por 30 minutos e inoculado com 1 mL de uma suspensão de esporos contendo 10⁶ esporos.mL⁻¹.

A quantidade de suspensão de esporos de *Aspergillus* CBiot-UFRGS adicionada ao reator foi a necessária para ser obtido 10⁶ esporos.mL⁻¹ no volume do meio de produção.

15 Reator

Foi adicionado de meio de cultura matérias primas contendo a composição descrita na Tabela 2, pH ajustado para próximo a neutralidade e 1 mL de antiespumante. O biorreator contendo o meio de produção foi autoclavado a 121°C por 1 hora. Nesta produção foram mantido os parâmetros de agitação constante, taxa de aeração acima da concentração inibitória mínima ao longo de todo o processo e temperatura mesófila.

PREPARAÇÃO DO BIOPROCESSO NO REATOR DE ESCALA LABORATORIAL

Após esterilização por 1 hora e resfriado, o biorreator foi montado e os sistemas de agitação, aeração e controle de temperatura foram conectados para que os parâmetros do processo fossem mantidos estáveis. Foi retirada uma alíquota, da qual foram
5 determinados os valores de pH, absorbância, massa seca, presença de contaminação microbiana, proteína, amido, glicose, açúcares redutores totais, atividade amilolítica. Esta alíquota foi denominada como “mosto”.

Após a introdução do inóculo no biorreator, a mistura de mosto e inóculo foi homogeneizada durante 10 minutos. Foram retiradas as alíquotas identificadas como
10 tempo zero (T0), para controle do processo.

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

15 DETERMINAÇÕES DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Amilase

a) Atividade sacarificante

A determinação da atividade amilolítica sacarificante foi realizada utilizando-se amido solúvel a 1,0%, como substrato.

20 Para o ensaio foi utilizada a seguinte mistura de reação: 100µl de amostra; 300µl de tampão citrato de sódio 50 mM pH6,0 e 200µL de substrato; incubados a temperatura de 42°C por quinze minutos. Transcorrido o tempo de incubação, foram adicionados 1,5 mL de reagente DNS. As amostras foram fervidas por cinco minutos. Os tubos foram resfriados e foram adicionados 17,9 mL de água destilada. Todos os tubos foram
25 homogeneizados em vórtice. Os ensaios com as amostras foram realizados em triplicata, utilizando-se um branco para cada amostra. A leitura da atividade amilolítica foi realizada em espectrofotômetro com um comprimento de onda de 550 nm para determinação da OD.

30 Para a realização deste ensaio, todas as amostras foram dialisadas em membrana de diálise. As membranas foram fervidas por trinta minutos em solução contendo

carbonato de cálcio 1% (p/v)/EDTA 0,1%, lavadas em água destilada. As amostras foram dialisadas contra tampão citrato de sódio 50 mM pH 6,0 por 24 horas, a 4°C.

Neste ensaio a unidade enzimática foi expressa pela quantidade de enzima necessária para formar 1 μ Mol açúcar redutor, nas condições especificadas.

5 b) Atividade dextrinizante

Colocou-se de 100 a 400 μ L de solução de amido a 1%, 40 μ L de tampão acetato de sódio 500 mM, pH 6, 10 μ L de amostra, e adicionou-se água destilada para completar volume de 500 μ L. Os tubos foram incubados a 42° C durante 15 minutos. Após, foram adicionados 200 μ L de solução de ácido acético 1M, 200 μ L de solução iodo Fuwa e 3,1 mL de água destilada. A leitura das amostras foi realizada a 660nm.

Para este ensaio a unidade enzimática foi expressa pela quantidade de enzima necessária para degradar 1 mg de amido, nas condições especificadas.

Produção de amilase

15 A determinação da atividade enzimática foi iniciada nestas produções a partir da hora zero. Até a sexta hora não foi detectada uma atividade amilolítica enzimática significativa pelo ensaio dextrinizante.

No ensaio dextrinizante, as produções apresentaram atividade a partir da oitava hora com média de $1,1 \pm 0,3$ U mL.min⁻¹. Houve um aumento constante de atividade até a vigésima segunda hora com média de $30,5 \pm 2,2$ U mL.min⁻¹. A partir deste ponto ocorreu uma estabilização na produção enzimática. Nos ensaios sacarificantes as atividades enzimáticas foram nulas até a sexta hora. A partir da hora oito as produções apresentaram um aumento constante de atividade. No reator de 10 litros apresentaram uma atividade média na hora oito de $33,8 \pm 1,1$ U mL.min⁻¹. As estabilizações da atividade enzimática sacarificante ocorreram na vigésima primeira hora, tendo sido obtido uma atividade média de $141,4 \pm 18,3$ U mL.min⁻¹.

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 20 mL do mosto *Aspergillus* CBiot-UFRGS foi utilizada para produção de amilase. Esta foi filtrada através de sistema de filtração a vácuo, utilizando papel filtro Whattman nº 2 previamente pesados após terem

sido mantidos por 3 dias a temperatura de 50°C. Os filtros foram lavados com 10 mL de água destilada por três vezes, sendo levados à estufa a 40°C. Posteriormente, as amostras secas foram pesadas diariamente até a massa permanecer constante e destes valores foram descontados os pesos iniciais dos papéis filtros.

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

Massa seca

- 10 Os mostos apresentaram uma massa seca média inicial de $0,46 \pm 0,12 \text{ mg.mL}^{-1}$. A massa seca apresentou um crescimento constante até a vigésima quarta hora, com $8,20 \pm 0,87 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Determinação da concentração de proteína total

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

As determinações de proteína foram realizadas para cada tempo de bioprocessamento e comparadas com a respectiva curva-padrão. A curva foi preparada utilizando-se albumina sérica bovina.

20 Ensaio para Determinação de Proteína

a) Bradford

- 25 Neste método, 20 μL 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.

b) Biureto

- 30 Para realização da dosagem de proteína total pelo método do Biureto, em 300 μL de amostra foram adicionados 700 μL 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 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 μL de amostra foram adicionados 100 μL de reagente ácido bicinchonínico (reagente A: 1% de ácido bicinchonínico, 2% de carbonato de 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.

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 aplicou-se os valores obtidos na seguinte equação:

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

A concentração média de proteína total, dosada nos mostos na hora inicial pelo método de biureto, foi de $5,13 \pm 0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Nas produções ocorreu um aumento de concentração de proteína total a partir da quarta hora de cultivo, atingindo a concentração máxima de $6,7 \pm 0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ na décima segunda hora. A seguir, ocorreu uma queda constante na concentração de proteína total, até o final do cultivo, na hora 23, onde foi determinada uma concentração de $1,2 \pm 0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Determinação de açúcares redutores totais

As concentrações de açúcares redutores nas amostras dos diferentes tempos de fermentação foram determinadas pelo método de Sumner.

Método para a determinação de açúcares redutores totais

As determinações de açúcares redutores totais foram realizadas para cada tempo de cultivo e comparadas com a respectiva curva-padrão. Esta curva foi preparada utilizando-se uma solução de glicose anidra 10 mg.mL^{-1} .

5 O reagente de ácido dinitrosalicílico (DNS) foi preparado pela dissolução de 3,53 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 6,0 g de hidróxido de sódio em 472 mL de água destilada. Foram acrescentados 102 g de tartarato duplo de sódio e potássio, 2,53 mL de fenol e 2,76 g de metabissulfito de sódio.

Preparação da curva-padrão para a determinação de açúcares redutores totais

10 Foi preparada uma solução estoque de glicose anidra com concentração igual a 10 mg.mL^{-1} . Foram preparados tubos com soluções de glicose com concentrações crescentes de 1 a 10 mg.mL^{-1} , utilizando a solução estoque de glicose e adequados volumes de água destilada, ficando cada tubo com volume final de $100 \mu\text{L}$. Posteriormente, foi acrescentado um volume de $500 \mu\text{L}$ de solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 6,0 e 1,5 mL de reagente de DNS. Os tubos foram homogeneizados em 15 vórtice. O tubo com 0 mg.mL^{-1} de glicose foi utilizado como branco. Todos os tubos foram submetidos à fervura durante 5 minutos. Após a fervura foram adicionados 17,9 mL de água destilada em cada tubo. A absorvância de cada solução foi determinada a 550 nm.

Preparação das amostras para a determinação de açúcares redutores totais

20 Foram pipetados $100 \mu\text{L}$ de cada amostra referente aos diferentes tempos de cultivo, para tubos de ensaio. Em cada tubo foi acrescentado um volume de $500 \mu\text{L}$ de tampão citrato de sódio 50 mM pH 6,0 e 1,5 mL de reagente de DNS. Os tubos foram homogeneizados em vórtice, fervidos durante 5 minutos, acrescidos de um volume de 17,9 mL de água destilada. A absorvância de cada amostra foi determinada a 550 nm.

25

Determinação de Glicose

As concentrações de glicose nas amostras dos diferentes tempos de crescimento foram determinadas através de teste enzimático colorimétrico utilizando glicose-oxidase.

30 Método para a determinação de glicose

Método para a determinação de amido

As determinações de amido foram realizadas para cada tempo de fermentação e comparadas com a respectiva curva-padrão. Esta curva foi preparada utilizando-se uma solução aquecida e filtrada de amido solúvel a 1%.

- 5 O reagente de Fuwa foi preparado pela mistura de uma solução alcoólica de iodo a 1% , uma solução aquosa de iodeto de potássio a 10% e água na proporção 1:1:3, respectivamente.

Preparação da curva-padrão para a determinação de amido

- 10 Foi preparada uma solução estoque de amido solúvel com concentração de 10 mg.mL⁻¹. Foram preparados tubos contendo soluções de amido com concentrações crescentes de 1 a 10 mg.mL⁻¹, utilizando a solução estoque de amido solúvel e adequados volumes de água destilada, ficando cada tubo com um volume final de 100 µL. Em cada tubo foi acrescentado um volume de 40 µL de solução tampão acetato de sódio 500 mM pH 6,0, 60 µL de água destilada, 200 µL de ácido acético 1M, 3,4 mL
- 15 de água destilada e 200 µL de reagente de Fuwa. Os tubos foram homogeneizados em vórtice. O tubo que não continha amido foi utilizado como branco. A absorbância de cada solução foi determinada a 660 nm.

Preparação das amostras para a determinação de amido

- 20 Foram pipetados 10 µL de cada amostra referente aos diferentes tempos de cultivo para tubos de ensaio. Em cada tubo foi acrescentado um volume de 40 µL de solução tampão acetato de sódio 500 mM pH 4,5, 450 µL de água destilada, 200 µL de ácido acético 1M, 3,1 mL de água destilada e 200 µL de reagente de Fuwa. Os tubos foram homogeneizados em vórtice, e a absorbância de cada amostra foi determinada a 660 nm.

- 25 Na determinação de amido presente no mosto, foi dosado uma média de inicial de 14,3±1,1 mg.mL⁻¹ nas produções.

- 30 A queda na concentração de amido no reator foi muito mais rápida, sendo dosado uma média de 1,2±0,8 mg.mL⁻¹ na quarta hora. A partir deste ponto, as concentrações foram insignificantes, não sendo determinada mais à presença de amido na décima hora.

ENSAIOS COM O SOBRENADANTE DAS CULTURAS

Determinação do pH e temperatura

As atividades da amilase HM2003 foram testadas em uma faixa de pH compreendida entre 3,0 a 10,5. Os tampões utilizados foram tampão citrato/fosfato para
5 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 pelo ensaio sacarificante no pH 6,0 e temperatura de 42°C,
sendo incubados por 15 minutos.

Para determinação da atividade em função da temperatura, o ensaio da amilase
10 HM2003, com tampão citrato 50 mM pH6,0.

A temperatura ótima de atividade da amilase produzida por *Aspergillus* CBiot-
UFRGS, está entre 55 e 60°C

O produto Duramyl® possui um pH ótimo em 6,5, apresentando uma forte queda
de atividade após este valor. Já o produto Termamyl® possui uma grande estabilidade de
15 pH, possuindo uma atividade praticamente inalterada na faixa de 6,0 a 8,0.

Termoestabilidade

O sobrenadante do cultivo de amilase HM2003 foi testado para estabilidade
térmica a 53°C, em diferentes tempos de pré-incubação e determinada a atividade pelo
20 ensaio sacarificante.

Foi observado no ensaio de estabilidade térmica da amilase produzida por
Aspergillus CBiot-UFRGS. Ao ser pré-incubada a 53°, após 200 horas, a mesma
apresentava mais de 70% da atividade inicial.

O produto Termamyl® apresenta uma estabilidade térmica bem menor, pois em
25 uma pré-incubação de 30 minutos, na temperatura de 55°C, sua atividade cai em 20%.

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

A amilase HM2003 foi pré-incubada durante 30 minutos com os seguintes
produtos: surfactante nonil fenol etoxilado 6 M e 9,5 M; 1,5% RENEX 60, 15%
30 RENEX 95, 1,5% e 15% RENEX 95, polietilenoglicol 1%, 5% e 10% e isopropanol

1%, 5% e 10%. O efeito dos açúcares glicose e maltose nas concentrações de 2, 5 e 10 mM na atividade enzimática de amilase também foi testado.

O efeito de íons na atividade da amilase HM2003 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.

Para determinar a especificidade das diversas fontes de amido, foram utilizados amilose, amilopectina, amido de batata, amido de arroz, amido de mandioca, amido de milho e farinha de trigo, ensaiados pelo método dextrinizante.

10

Efeito de inibidores, detergentes, agente redutor, íons e especificidade pelo substrato sobre a atividade enzimática

A concentração 4 mM de íons na amilase HM2003 de *Aspergillus* CBiot-UFRGS, ocasionou uma queda da atividade quando adicionado sulfato de cobre (96,3%), sulfato de zinco (82,5%), cloreto de cálcio (12,4%) e sulfato ferroso (85,6%). Nenhum íon ocasionou aumento significativo de atividade de amilase.

Os tensoativos e a mistura dos mesmos alteraram de maneira significativa a atividade de amilase, em alguns casos, quase dobrando a atividade amilolítica.

O polietilenoglicol, o isopropanol e concentrações de 2, 5 e 10 mM de glicose e maltose não alteraram a atividade enzimática.

Não foi encontrada diferença significativa entre os amidos de mandioca, milho, arroz, batata e de amilopectina.

Concentração e purificação

25 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.

Cromatografia de troca iônica

30 Preparação da amostra

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

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. 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 dextrinizante. A purificação foi realizada a temperatura ambiente.

Todas as formulações experimentais utilizando os lotes de produção experimental de amilase foram realizadas adicionando os produtos enzimáticos no volume de 20 mL.L⁻¹ de amilase HM2003. Os lotes apresentaram estabilidade e características visuais semelhantes aos detergentes formulados com concentrados enzimáticos comerciais. Entretanto, ao ser realizada a 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 de amilase HM2003 de $1,16 \pm 0,84$ mg.mL⁻¹. Ao ser realizada a concentração, foi feita próxima a 10x, onde foi encontrada uma concentração média de proteína de $10,03 \pm 1,82$ mg.mL⁻¹.

Como a formulação comercial do detergente enzimático recebe até 10% de isopropanol, este solvente pode acarretar uma precipitação de proteínas, 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 kDa e passagem do mosto centrifugado e filtrado em resinas de troca iônica.

CONCENTRAÇÃO

Membrana de ultrafiltração

Na passagem pela membrana de 10kDa, o concentrado manteve 98,3% da atividade e houve uma redução 31,73% de proteína. Na passagem pela membrana de 50kDa, o permeado manteve 87,6% da atividade e houve uma redução 50,72% de proteína. Na passagem do permeado da membrana de 50kDa, pela membrana de 10kDa, o concentrado manteve 82,9% da atividade e houve uma redução 54,86% de proteína.

Cromatografias do mosto de amilase

Ao ser utilizada uma resina de troca iônica DEAE Sepharose, foi observado que a amilase HM2003 ligou-se à resina nas condições do experimento. Neste processo, 84% da atividade foi mantida, com uma redução de 18% de proteína, dosada por A_{280nm} .

Já com a utilização da resina CM celulose, a amilase experimental foi eluída. Foram mantidas 93% da atividade amilolítica, com uma redução de 64% de proteína total.

A resina mais eficiente para retirada de proteína, sem o objetivo de purificação e sim de diminuição da concentração protéica, foi a CM celulose.

Material da Membrana	Volume final (mL)	Atividade (U mL.min ⁻¹)	Atividade total (U)	Proteína (mg.mL ⁻¹)	Ptn total (mg)	% Manutenção atividade	% Redução de proteína	Atividade específica (U.mg ⁻¹)
Mosto	9.000	18,64	167.760	0,92	8.280	100,0	0,00	20,26
Concentrado 10 kDa	1.000	164,90	164.900	5,65	5.650	98,3	31,76	29,19
Permeado 50kDa	8.000	18,36	146.880	0,51	4.080	87,6	50,72	36,00
Permeado 50 kDa Concentrado Em 10kDa	730	190,44	139.021	5,12	3.738	82,9	54,86	37,20

Reivindicações**PROCESSO DE PRODUÇÃO DE AMILASE TERMOESTÁVEL E
COMPOSIÇÕES PARA LIMPEZA**

1. Processo de produção de amilase termoestável caracterizado pelo fato de
5 compreender o cultivo do fungo *Aspergillus* linhagem CBiot-UFRGS 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 amilase, caracterizada pelo fato de que a referida amilase ser obtida do cultivo do fungo *Aspergillus* linhagem CBiot-UFRGS.
4. Composição, conforme reivindicação 3, caracterizada pelo fato de a referida amilase ter elevada atividade enzimática e ser estável na presença de surfactantes.
- 15 5. Composição, conforme reivindicação 3, caracterizada por adicionalmente compreender outras enzimas e agentes de branqueamento.

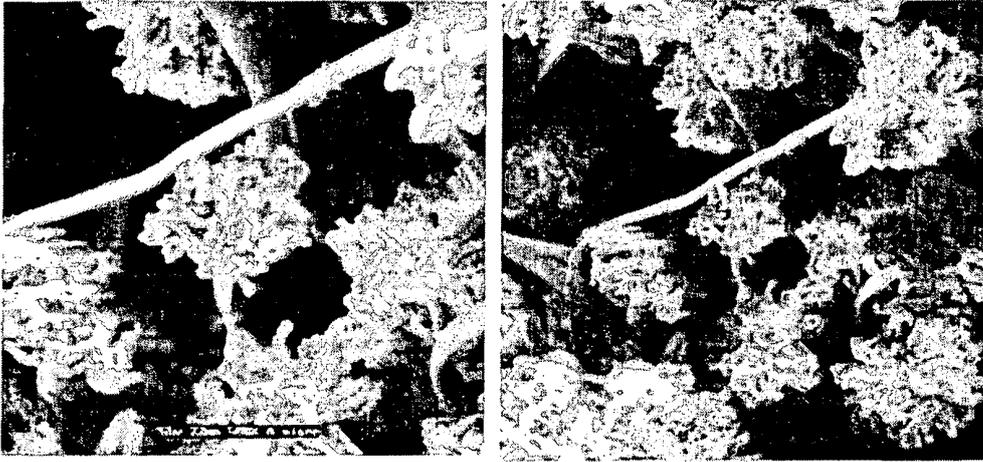


Figura 1

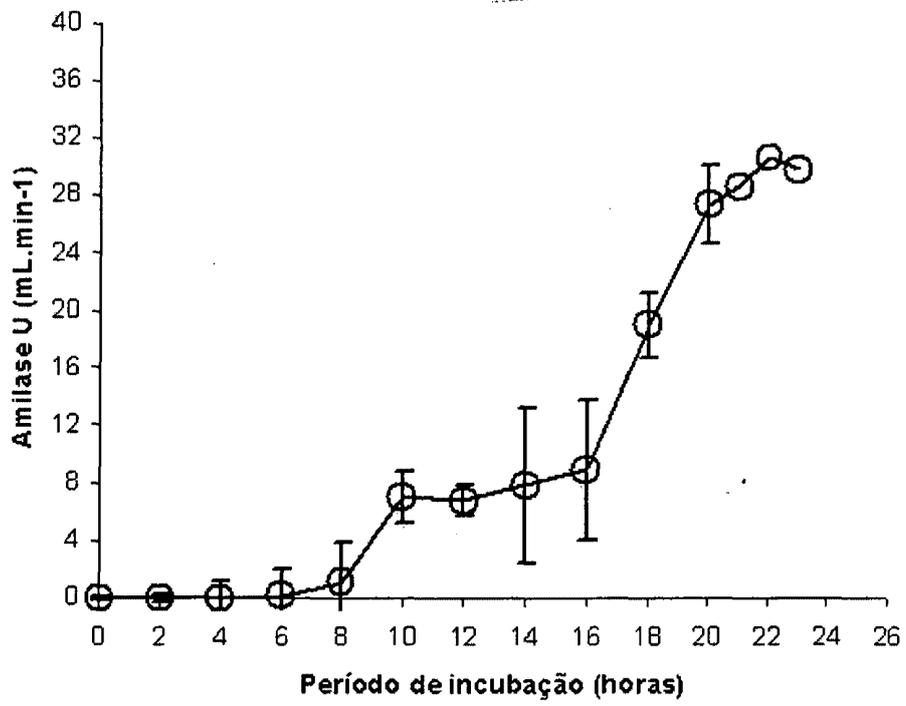


Figura 2

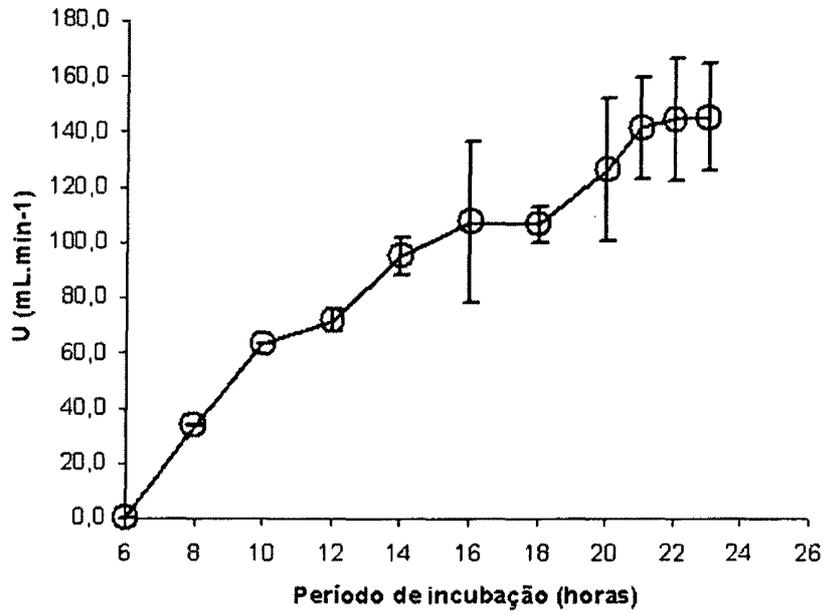


Figura 3

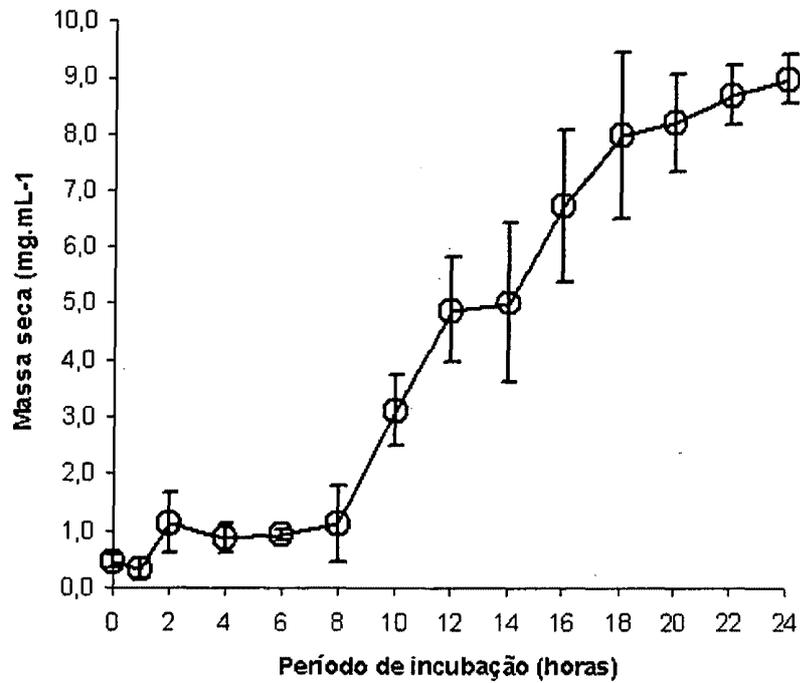


Figura 4

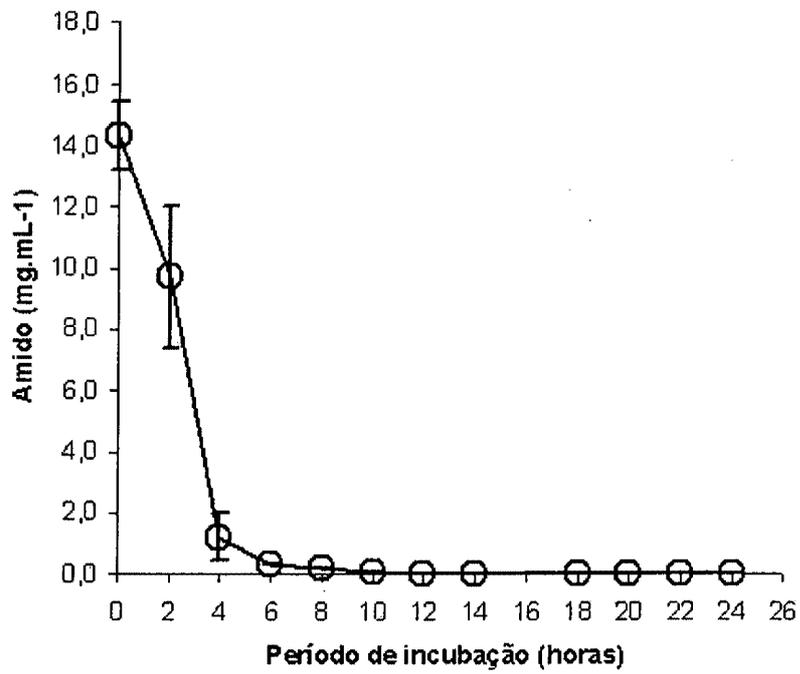


Figura 5

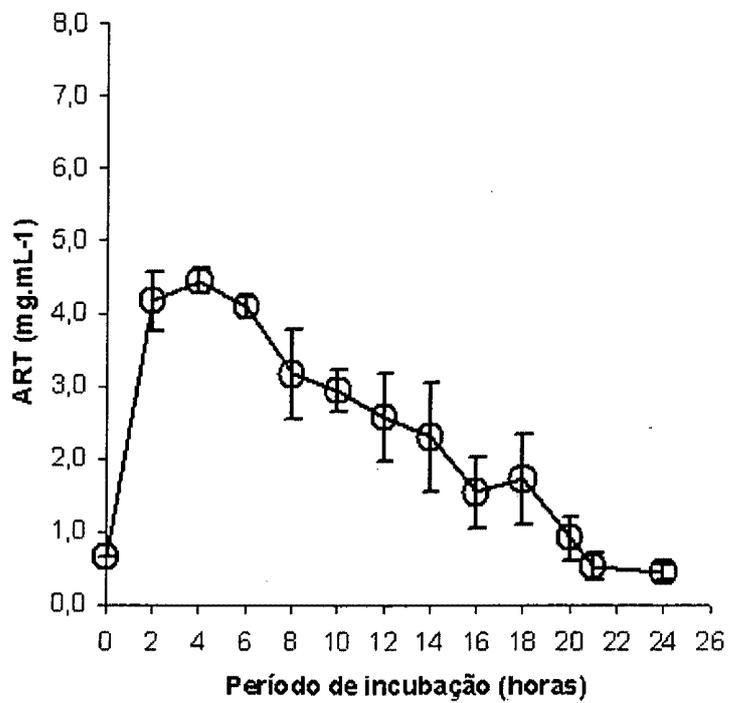


Figura 6

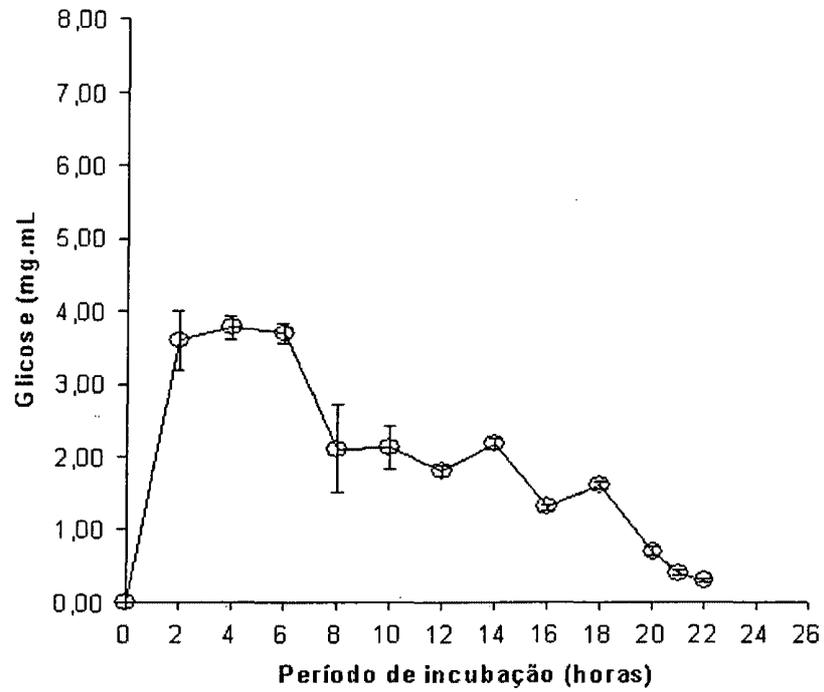


Figura 7

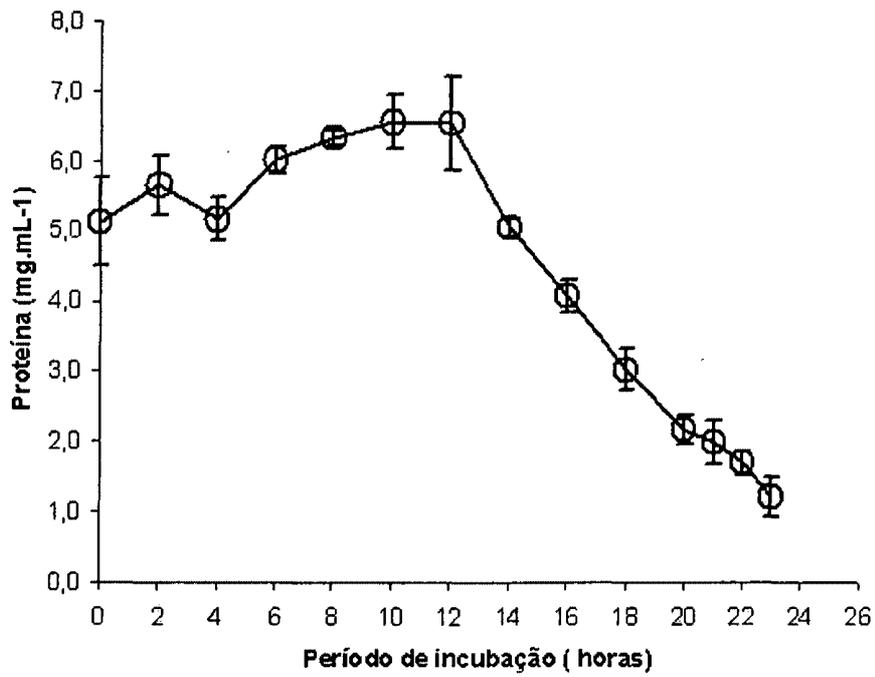


Figura 8

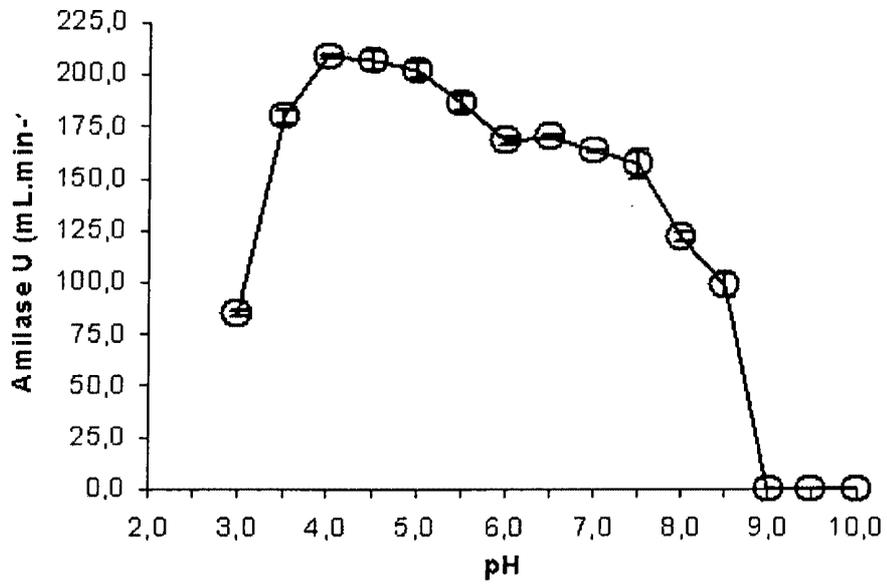


Figura 9

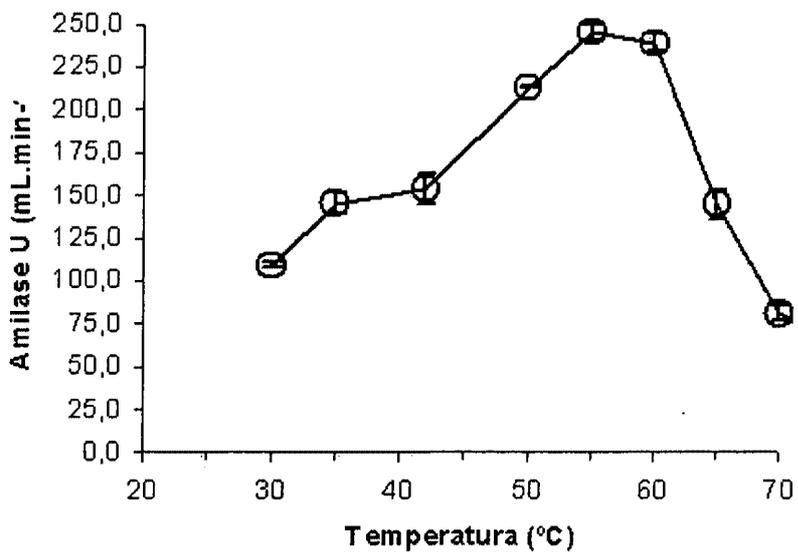


Figura 10

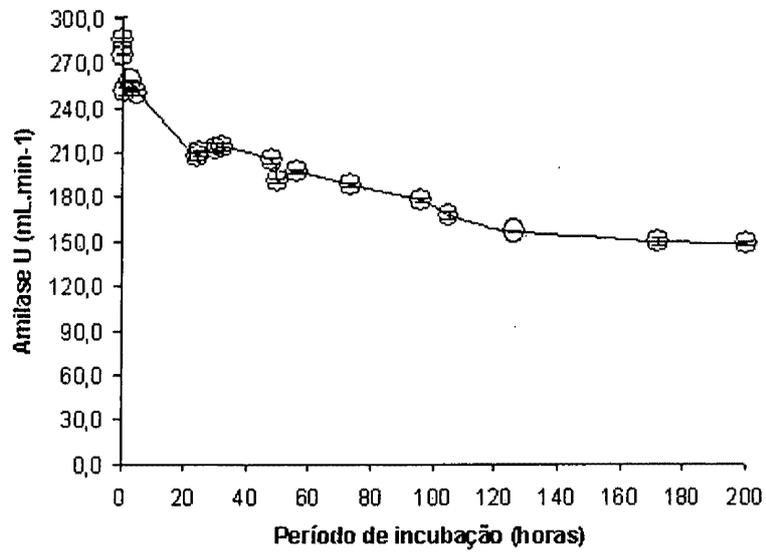


Figura 11

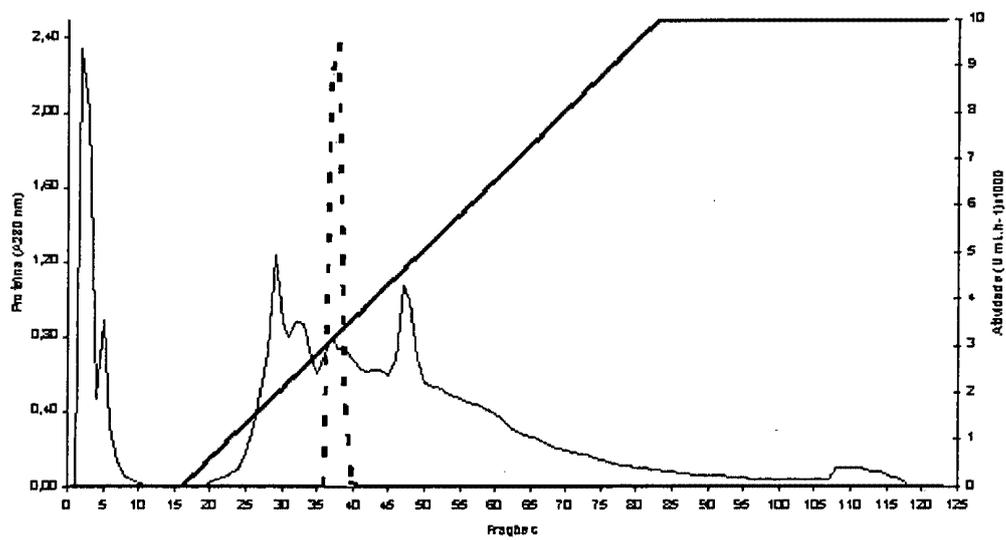


Figura 12

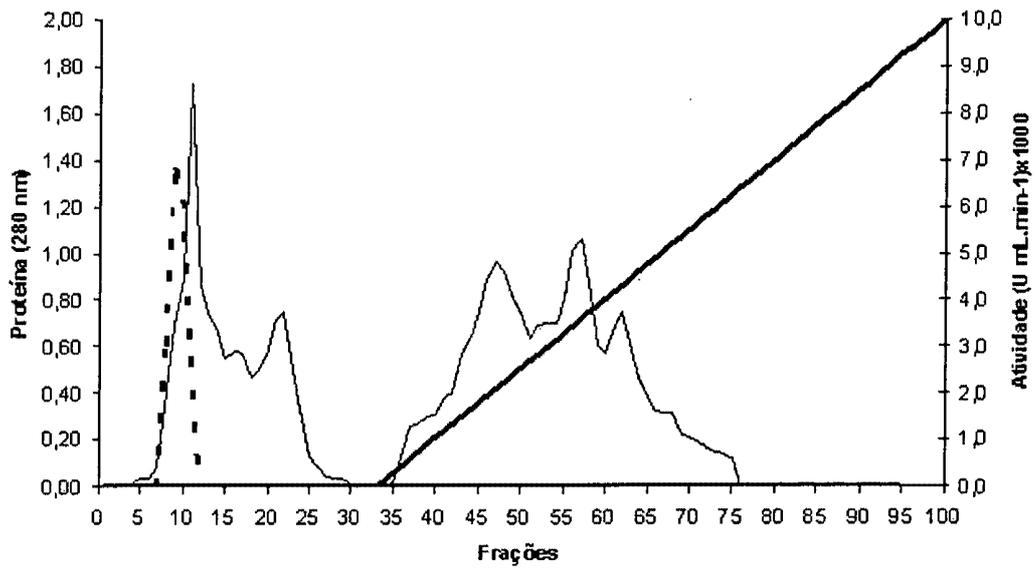


Figura 13

Resumo**PROCESSO DE PRODUÇÃO DE AMILASE TERMOESTÁVEL E
COMPOSIÇÕES PARA LIMPEZA**

- 5 A presente invenção descreve um processo de produção de uma amilase termoestável HM2003 a partir da utilização de um *Aspergillus* linhagem CBiot-UFRGS; 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
- 10 fornecimento de oxigênio em quantidade acima da concentração inibitória mínima durante todo o processo; são também descritas composições de limpeza compreendendo as referidas amilases.