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

(11) PI 0720527-9 B1

(22) Data do Depósito: 20/12/2007

(45) Data de Concessão: 13/06/2017

(54) Título: MÉTODO PARA PRODUZIR UM EXTRATO DE LEVEDURA

(51) Int.Cl.: C12N 1/06; C12N 9/52

(30) Prioridade Unionista: 22/12/2006 DK PA 2006 01699

(73) Titular(es): NOVOZYMES A/S

(72) Inventor(es): LISBETH KALUM

"MÉTODO PARA PRODUZIR UM EXTRATO DE LEVEDURA"

CAMPO TÉCNICO

A presente invenção diz respeito a um método para produzir um extrato de levedura com o uso de uma protease exógena.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os extratos de levedura são amplamente usados, por exemplo para tempero nas indústrias de alimentação, em meios de fermentação de microorganismos, e como alimentos saudáveis. A produção do extrato de levedura é descrita na literatura. Ver, por exemplo, Kelly, M. (1982) *Yeast Extract* (Em: *Industrial Enzymology*, Godfrey, T. ed.) ou Chae, H. J. *et al.* (2001), *Bioresource Technology* 76, 253-258. É tipicamente fabricado pela decomposição da levedura pela hidrólise de ácido ou rompimento mecânico ou químico das células, seguido pela autólise com enzimas endógenas para degradar as estruturas macromoleculares da levedura, em particular as proteínas, na quantidade máxima de material solúvel. Possivelmente, as enzimas exógenas, incluindo as proteases tais como a papaína, são adicionadas para aumentar o efeito das próprias enzimas da levedura. Após a hidrólise enzimática, o extrato de levedura é separado dos detritos celulares e possivelmente pasteurizado e concentrado. A turbidez é uma medida da qualidade do extrato de levedura. A baixa turbidez torna a concentração e a separação mais fácil. Portanto, existe o desejo de métodos para produzir extratos de levedura com baixa turbidez.

As proteases observadas como sendo aplicáveis de acordo com a presente invenção foram anteriormente descritas. Por exemplo, a protease derivada da *Nocardiopsis* sp. NRRL 18262 é apresentada na WO 88/03947 (aqui, a cepa é referida como a cepa de *Nocardiopsis* sp. 10R) e na WO 01/58276. Outras proteases relacionadas, que são úteis de acordo com a invenção, são apresentadas nas WO 88/03947, WO 04/111220, WO

04/111222, WO 04/111223, WO 05/123911 e WO 04/072279.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O presente inventor identificou proteases que são observadas serem aplicáveis na produção de extratos de levedura em alto rendimento com muito baixa turbidez. Tais proteases são mais eficientes do que outras proteases usadas na técnica em comparação com uma quantidade igual de proteína enzimática, o que resulta em melhor economia do produto para os produtores de extratos de levedura. Além disso, o conteúdo de proteína dos sólidos secos totais é elevado quando o extrato de levedura é preparado com as proteases da presente invenção, o que reflete uma alta pureza. Consequentemente, a presente invenção diz respeito a um método para produzir um extrato de levedura, compreendendo: a) adicionar à proteína contendo a levedura uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com a SEQ ID NO: 1; e b) incubar de modo a hidrolisar a proteína.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Protease

O termo protease, como aqui usado, é uma enzima que hidrolisa ligações peptídicas (tem atividade de protease). As proteases são também chamadas, por exemplo, de peptidases, proteinases, peptídeo hidrolases, ou enzimas proteolíticas.

As proteases para uso de acordo com a invenção são do endotipo que atua internamente nas cadeias polipeptídicas (endopeptidases).

Não existe nenhuma limitação sobre a origem da protease para uso de acordo com a invenção. Assim, o termo protease inclui, não apenas proteases naturais ou do tipo selvagem, mas também quaisquer mutantes, variantes, fragmentos etc. destas que apresentem atividade de protease, bem como proteases sintéticas, tais como as proteases embaralhadas, e as proteases de consenso. Tais proteases geneticamente engendradas podem ser preparadas como é geralmente conhecido na técnica, por exemplo por mutagênese

dirigida ao sítio, por PCR (usando um fragmento de PCR contendo a mutação desejada como um dos iniciadores nas reações de PCR), ou por mutagênese aleatória. A preparação das proteínas de consenso é descrita, por exemplo, na EP 897985. Exemplos de variantes de protease, como usadas no presente contexto, são as proteases em que um ou mais aminoácidos tenham sido deletados, introduzidos ou substituídos por outros aminoácidos.

Exemplos de proteases para uso de acordo com a invenção são:

(i) a protease derivada da *Nocardiopsis* sp. NRRL 18262, apresentada na WO 01/58276, cuja sequência é mostrada na SEQ ID NO: 1 do presente documento.

(ii) as proteases tendo pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, ou pelo menos 95% de identidade de aminoácido em relação à protease de (i);

(iii) as mutantes, variantes ou fragmentos das proteases de (i) ou (ii) que apresentem atividade de protease.

Para os fins da presente invenção, o alinhamento de duas sequências de aminoácidos pode ser determinado pelo uso do programa Needle do pacote EMBOSS (http://emboss.org.) versão 2.8.0. O programa Needle implementa o algoritmo de alinhamento global descrito em Needleman, S. B. e Wunsch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453. A matriz de substituição usada é BLOSUM62, a penalidade aberta de intervalo é 10, e a penalidade de extensão da abertura é 0,5.

O grau de identidade entre duas sequências de aminoácidos é calculado como o número de combinações exatas em um alinhamento das duas sequências, dividido pelo comprimento da mais curta das duas sequências. O resultado é expresso em percentual de identidade.

Uma combinação exata ocorre quando as duas sequências têm resíduos de aminoácidos idênticos nas mesmas posições da sobreposição. O

comprimento de uma sequência é o número de resíduos de aminoácidos na sequência (por exemplo, o comprimento da SEQ ID NO: 1 é 188).

Como exemplos de proteases bacterianas aplicáveis para uso de acordo com a invenção podem ser mencionadas a protease da *Nocardiopsis alba* (anteriormente *Nocardiopsis dassonvillei*) NRRL 18133 apresentada na WO 88/03947, as proteases da *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43235, *Nocardiopsis alba* DSM 15647, *Nocardiopsis* sp. DSM 16424 e a Protease sintética 22, todas quatro apresentadas na WO 04/111220, a protease da *Nocardiopsis prasina* DSM 15648 apresentada na WO 04/111222, a protease da *Nocardiopsis prasina* DSM 15649 apresentada na WO 04/111223, as proteases da *Nocardiopsis prasina* (anteriormente *Nocardiopsis alba*) DSM 14010, a *Nocardiopsis alkaliphila* DSM 44657 e a *Nocardiopsis lucentensis* DSM 44048, todas três apresentadas na WO 05/123911, as proteases da *Brachysporiella gayana* CGMCC 0865, *Metarhizium anisopliae*, *Gliocladium* sp. CBS 114001, *Periconia* sp. CBS 114002, *Periconia* sp. CBS 114000 e *Curvularia lunata* CBS 114003, todas as 6 apresentadas na WO 04/072279, e mutantes, variantes ou fragmentos de qualquer destas que apresentem atividade de protease.

Uma protease para uso de acordo com a invenção é uma protease bacteriana, o termo bacteriana indicando que a protease é originada, ou se origina, de uma bactéria, ou é um análogo, um fragmento, uma variante, um mutante ou uma protease sintética derivada de uma bactéria. Ela pode ser produzida ou expressa na cepa bacteriana original do tipo selvagem, em outra cepa microbiana, ou em uma planta; isto é, o termo cobre a expressão das proteases do tipo selvagem, de ocorrência natural, bem como a expressão em qualquer hospedeiro de proteases recombinantes, geneticamente engendradas ou sintéticas.

No processo da invenção, a protease pode ser purificada. O termo "purificada", como aqui usado, cobre a proteína enzimática

essencialmente livre de componentes do organismo do qual ela se origina. O termo "purificada" também cobre a proteína enzimática livre dos componentes do organismo nativo do qual ela é obtida, isto é, também denominada enzima "essencialmente pura", e pode ser particularmente relevante para as enzimas que sejam de ocorrência natural e que não tenham sido modificadas geneticamente, tal como por deleção, substituição ou inserção de um ou mais resíduos de aminoácidos.

Consequentemente, uma protease pode ser purificada, isto é, apenas quantidades secundárias de outras proteínas estando presentes. As expressão "outras proteínas" diz respeito, em particular, a outras enzimas. O termo "purificada", como aqui usado, também se refere à remoção de outros componentes, particularmente outras proteínas e, o mais particularmente, outras enzimas presentes na célula de origem da protease. Uma protease pode ser "substancialmente pura", isto é, substancialmente livre de outros componentes do organismo em que ela é produzida, por exemplo, um organismo hospedeiro para a enzima recombinantemente produzida. Preferivelmente, a protease é pelo menos 75% (p/p) pura, mais preferível pelo menos 80%, 85%, 90% ou mesmo pelo menos 95% pura. Em uma forma de realização ainda mais preferida, a protease é uma preparação proteica de enzima pelo menos 98% pura.

Entretanto, para os usos de acordo com a invenção, a protease não necessita ser tão pura. Ela pode incluir, por exemplo, outras enzimas, mesmo outras proteases, em cujo caso ela pode ser denominada uma preparação de protease.

O uso da protease de acordo com a presente invenção pode ser combinado com o uso de outras enzimas, por exemplo outras proteases. Em uma forma de realização preferida, uma protease do endotipo, por exemplo uma derivada da *Nocardiopsis* sp. NRRL 18262, é combinada com uma exopeptidase, ou uma preparação de protease tendo atividade de

exopeptidase, por exemplo uma preparação de protease derivada de *Aspergillus oryzae*, como apresentado na WO 94/25580, tal como a Flavourzyme® (Novozymes A/S, Dinamarca).

Em uma forma de realização particular, a protease para uso em conformidade com a invenção tem uma atividade de pH ótima próximo à neutra, quando determinada por hidrólise da caseína e subsequente reação dos peptídeos solúveis em TCA com o-ftaldialdeído e 2-mercaptoetanol seguido pela medição da absorbância do complexo resultante em 340 nm.

A expressão atividade de pH ótima próximo à neutra significa um ou mais dos seguintes: que o pH ótimo situa-se no intervalo do pH 5,5 a 11,0, ou pH 7,0 a 11,0, ou pH 6,0 a 10,0, ou pH 7,0 a 10,0, ou pH 8,0 a 11,0, ou pH 8,0 a 10,0.

Em outra forma de realização particular, a protease para uso de acordo com a invenção é termoestável.

O termo termoestável significa um ou mais dos seguintes: Que a temperatura ótima é de pelo menos 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C, 62°C, 64°C, 66°C, 68°C ou pelo menos 70°C, determinada por hidrólise da caseína como descrito acima.

Levedura

Levedura, no contexto da presente invenção, pode ser qualquer espécie de levedura. Ela pode pertencer à família *Saccharomycetaceae*. Em uma forma de realização particular, a levedura é uma *Saccharomyces*, por exemplo a *Saccharomyces cerevisiae* ou a *Saccharomyces uvarum*. Em outra forma de realização, a levedura é uma *Kluyveromyces*, por exemplo a *Kluyveromyces fragiles*. Em ainda outra forma de realização, a levedura é a *Candida*, por exemplo a *Candida utilis*, também conhecida como levedura *Torula*.

A levedura a ser aplicada pode estar em qualquer forma, tal como a levedura especialmente crescida sobre, por exemplo, melado, ou

levedura de Brewer gasta, ou levedura coletada da fermentação de álcool.

A levedura a ser aplicada pode ser células de levedura completas ou células de levedura que sejam completa ou parcialmente rompidas ou degradadas.

Extrato de Levedura

Um extrato de levedura, que no contexto da presente invenção é sinônimo para o hidrolisado de levedura ou o autolisado de levedura, é um extrato solúvel da levedura compreendendo proteína hidrolisada, a qual é amplamente usada, por exemplo como um intensificador do sabor.

Em conformidade com a invenção, o extrato de levedura é produzido com o uso da protease exógena para a hidrólise proteica. Além da protease adicionada, a própria levedura contém uma variedade de enzimas degradantes, incluindo as lipases, nucleases, manases, glicanases e proteases. Os valores ótimos das temperaturas e do pH para estas enzimas endógenas variam, e elas podem ser mais ou menos ativas sob as condições do processo de acordo com a presente invenção.

Antes da adição da protease, a levedura pode estar na forma de uma suspensão aquosa. O conteúdo de matéria seca da suspensão de levedura pode situar-se na faixa de 5 a 50%, tal como de 10 a 30%. O pH e a temperatura da suspensão de levedura podem ser ajustados levando-se na devida consideração as características da protease em questão. Em uma forma de realização, o pH da suspensão de levedura é ajustado de modo a ser mais básico, por exemplo situando-se na faixa de pH de 5,5 a 9, preferivelmente de 6 a 8, ou mais preferível pH de 6 a 7. Os ajustes do pH e da temperatura podem ocorrer antes, simultaneamente ou após a protease ter sido adicionada.

A protease deve ser aplicada em uma quantidade eficaz, isto é, em uma quantidade adequada para suficiente hidrólise proteica. Considera-se, presentemente, que a enzima é administrada em uma ou mais das seguintes quantidades (faixas de dosagem): 0,001 a 1; 0,005 a 1; 0,01 a 0,5; 0,01 a 0,2;

ou 0,01 a 0,1 - todas estas faixas sendo em miligrama de proteína enzimática por grama de matéria seca de levedura.

Antes ou após a adição da protease, as células de levedura podem ser rompidas, isto é, pela elevação da temperatura. Opcionalmente, produtos químicos podem ser adicionados, tais como sal ou solventes orgânicos. Este processo é frequentemente referido como plasmólise. A plasmólise e a hidrólise proteica causadas pela protease exógena, podem ocorrer simultaneamente.

A autodigestão dos conteúdos de células de levedura é frequentemente referida como autólise. Tal autodigestão pode ter lugar em graus variáveis antes ou simultaneamente com a hidrólise proteica causada pela protease exógena.

Em uma forma de realização preferida, a plasmólise, a hidrólise proteica causada pela protease exógena, e um certo grau de autodigestão ocorrem simultaneamente.

Em outra forma de realização, a plasmólise e a autodigestão com as enzimas próprias da levedura são realizadas em primeiro lugar, e a hidrólise com a protease adicionada é realizada em uma etapa de clarificação separada.

A incubação em seguida à adição da protease pode ocorrer em qualquer temperatura conveniente e no tempo de incubação necessário para se obter o grau desejado de hidrólise proteica. A hidrólise proteica no contexto desta invenção pode ser realizada essencialmente pela protease adicionada ou pode ser uma combinação da ação da protease adicionada com as proteases endógenas autodigestivas da levedura. Isto é, a expressão hidrólise proteica compreende hidrólise proteica realizada pela protease adicionada e a hidrólise proteica realizada pelas proteases próprias da levedura, o que frequentemente é referido como autólise.

Em uma forma de realização preferida, a temperatura de

incubação situa-se na faixa de cerca de 20 °C a cerca de 70 °C, preferivelmente de cerca de 40 °C a cerca de 60 °C, e o tempo de incubação situa-se na faixa de cerca de 1 hora a 48 horas, preferivelmente de 12 a 30 horas.

Tanto o pH quanto a temperatura podem opcionalmente ser ajustados para serem ou mais elevados ou mais baixos em qualquer ponto no decurso da incubação.

A incubação com a protease é continuada até que o resultado desejado seja obtido, em seguida ao que ela pode, ou não, ser interrompida pela inativação da enzima, por exemplo por uma etapa de tratamento de calor. Tal tratamento de calor pode também servir para pasteurizar o extrato de levedura.

Após o tratamento proteolítico, o extrato de levedura pode ser separado dos detritos celulares, por exemplo por centrifugação e decantação do sobrenadante. O extrato de levedura assim obtido pode ser concentrado por qualquer método conhecido na técnica.

A qualidade do extrato de levedura pode ser caracterizada, por exemplo, pelos seguintes parâmetros:

O rendimento proteico é o percentual de proteína da matéria seca da levedura antes da hidrólise, que é recuperada no extrato de levedura. Os seguintes são exemplos do rendimento proteico obtenível com o uso das proteases da invenção: pelo menos 40%, pelo menos 50%, ou pelo menos 60%.

O grau de hidrólise (DH) expressa a extensão da hidrólise proteica obtida pelo método. No contexto desta invenção, o grau de hidrólise (DH) é definido pela seguinte fórmula:

DH=(Número de ligações peptídicas clivadas/Número total de ligações peptídicas) x 100%

A fração proteica é a fração de sólidos secos no extrato de

levedura que se origina da proteína. Os seguintes são exemplos de frações proteicas obteníveis com o uso das proteases da invenção: Pelo menos 45%, pelo menos 50%, ou pelo menos 55%.

A turbidez do extrato de levedura pode ser determinada por qualquer método conhecido na técnica. Ela pode ser medida como NTU (Unidades de Turbidez Nefelométrica). A seguir apresentam-se exemplos de turbidez do extrato de levedura obtenível com o uso das proteases da invenção: Menos do que 2000 NTU, menos do que 1500 NTU, menos do que 1000 NTU, ou menos do que 500 NTU.

Uma forma de realização da presente invenção é um extrato de levedura produzido pelo método descrito acima.

EXEMPLO 1

A protease da *Nocardiopsis* sp. NRRL 18262, tendo a sequência apresentada na SEQ ID NO: 1, foi avaliada em comparação com a Alcalase e os controles da levedura sem a protease exógena.

A protease de *Nocardopsis* e a Alcalase® 2,4L (Novozymes A/S, Dinamarca) foram testadas na levedura de bloco da *Saccharomyces cerevisiae*. A levedura foi misturada com água deionizada para alcançar um conteúdo de matéria seca de 13,7%, e foi agitada (magnético) por 60 minutos na temperatura ambiente. A mistura de levedura foi aquecida a 55 °C e uma parte foi ajustada a pH 6,5. Outra parte não teve seu pH ajustado e foi aplicada como controle (o pH no hidrolisado do 'controle de Levedura' foi de cerca de 5). A enzima foi acrescentada às amostras da parte de pH ajustado. A quantidade de enzima foi dosada em miligramas de proteína enzimática/grama de matéria seca de levedura (YDM). Amostras de 20 ml foram retiradas e a quantidade exata foi pesada. Nenhuma enzima foi adicionada à amostra denominada 'Branco'. A hidrólise foi realizada por 22 horas em 55 °C. As amostras foram inativadas em 85 °C por 10 minutos. Após a inativação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos em 3500

rpm com o uso do Multifuge 3S-R da Heraeus. A quantidade de extrato foi pesada após a decantação. Os sólidos secos foram medidos no extrato mediante pesagem (após a secagem em 105 °C). A quantidade de nitrogênio no extrato foi determinada por um método de combustão em um Leco FP-528. A quantidade de proteína foi calculada como 6,25 vezes a quantidade de nitrogênio. O nitrogênio amino livre foi determinado com o uso de um método de OPA (o-ftaldialdeído). Com base nas medições acima, o seguinte foi calculado:

% de Rendimento do Extrato = (g de extrato após a centrifugação)/(g de mistura de levedura antes da centrifugação)*100

% de Rendimento Proteico = (g de extrato após a centrifugação*Conteúdo proteico no extrato)/(g de mistura de levedura antes da centrifugação*conteúdo proteico da mistura de levedura)*100

% de Proteína/DS = (g de extrato após a centrifugação*Conteúdo proteico no extrato)/(g de sólidos secos no extrato)*100.

Grau de hidrólise = (Número de ligações peptídicas clivadas/número total de ligações peptídicas)*100 = (h/htot)*100

Em que h é expresso como uma função de meqv serina NH2: h = serina NH2 -0,4)/1; e htot = 7,8. A serina NH2 foi medida em relação ao padrão de serina contendo 100 mg/litro, medindo-se a absorção em 340 nm.

A turbidez do extrato foi medida como NTU (Unidades de Turbidez Nefelométrica) por um turbidímetro HACH 2100AN com o uso de um filtro USEPA. A calibração foi realizada em relação a um Padrão de Turbidez de Formazin 4000 NTU (disponível da HACH Company, USA). Um NTU mais elevado é uma medida de turbidez mais elevada.

Os resultados são fornecidos na tabela abaixo (EP = proteína enzimática, YDM = matéria seca de levedura)

Enzima	pH no extrato	Dosagem de enzima mg EP/g YDM	% de rend. proteico	Grau de hidrólise	%Prot/ %DS	Turbidez (NTU)
Controle de levedura	5,12	0	43,8	52,1	0,54	3789
Em branco	7,08	0	16,9	40,6	0,29	46,4
Alcalase 2.4 L FG	6,91	0,022	53,7	62,5	0,51	1346
	6,84	0,044	63,7	63,9	0,54	1937
	6,81	0,133	59,0	51,0	0,49	1821
Protease de Nocardiopsis sp. NRRL 18262	6,05	0,022	62,34	54,5	0,57	146
	6,40	0,044	64,68	54,9	0,57	209
	6,91	0,133	62,74	69,0	0,54	1566

A protease da Nocardiopsis sp NRRL 18262 resulta em um rendimento proteico muito elevado em baixos níveis de dose (0,022 a 0,044 mg de EP/g de YDM). A turbidez do extrato tratado com a protease da *Nocardiopsis* sp. NRRL 18262 é muito clara na mesma faixa de dose, e a maior fração dos sólidos secos origina-se da proteína.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um extrato de levedura, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) adicionar à levedura contendo proteína, uma protease tendo a sequência da SEQ ID NO: 1 em uma concentração entre 0,005 e 1 mg de enzima por grama de matéria seca de levedura; e

b) incubar de modo a hidrolisar a proteína.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a levedura é *Saccharomyces*, *Kluveromyces* ou *Candida*.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a levedura é *Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces uvarum*.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a protease se acha presente em uma concentração entre 0,01 a 0,5 mg de enzima por grama de matéria seca de levedura.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que ainda compreende colocar a levedura em suspensão em uma solução aquosa.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que ainda compreende ajustar o pH da suspensão de levedura de modo a ser na faixa de pH de 5,5 a 9.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que ainda compreende realizar a centrifugação para se obter um precipitado e um sobrenadante após a etapa b).

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a proteína hidrolisada é recuperada no sobrenadante.