



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

(21) **PI0617481-7 A2**

(22) Data de Depósito: 20/10/2006  
(43) Data da Publicação: 26/07/2011  
(RPI 2116)



**(51) Int.Cl.:**

A61K 8/66 2006.01  
A61K 38/44 2006.01  
A61Q 11/00 2006.01  
A23L 3/3571 2006.01  
C09D 5/14 2006.01  
C09D 5/16 2006.01  
A01N 63/00 2006.01

(54) Título: **COMPOSIÇÃO QUE COMPREENDE UM SISTEMA ENZIMÁTICO ACOPLADO**

(30) Prioridade Unionista: 21/10/2005 DK PA200501474

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

(72) Inventor(es): Susan Mampusti Madrid, Thomas Rand

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

(86) Pedido Internacional: PCT DK2006000590 de 20/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/045251 de 26/04/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO QUE COMPREENDE UM SISTEMA ENZIMÁTICO ACOPLADO A presente invenção refere-se a uma composição que compreende um sistema enzimático acoplado para a produção rápida e eficiente de peróxido de hidrogênio através do acoplamento de um primeiro sistema enzimático capaz de gerar peróxido de hidrogênio, a um segundo sistema enzimático que utiliza o produto sem ser peróxido de hidrogênio do primeiro sistema enzimático e opcionalmente é capaz de gerar peróxido de hidrogênio adicional.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÃO QUE COMPREENDE UM SISTEMA ENZIMÁTICO ACOPLADO**".

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma composição que compreende um sistema enzimático acoplado para a produção rápida e eficiente de peróxido de hidrogênio através do acoplamento de um primeiro sistema enzimático capaz de gerar peróxido de hidrogênio, com um segundo sistema enzimáticos que utiliza o produto sem ser peróxido de hidrogênio do primeiro sistema enzimático e é opcionalmente capaz de gerar mais peróxido de hidrogênio.

ANTECEDENTE DA INVENÇÃO

O mau odor oral e a descoloração dos dentes são condições que afetam muitas pessoas. O mau odor da cavidade oral é também conhecido como halitose ou mau hálito. Geralmente, acredita-se que a causa desta condição seja pela presença de bactérias anaeróbicas, especialmente bactérias anaeróbicas gram-negativas, na boca. Estas bactérias gerarão compostos voláteis de enxofre (VSC) que são conhecidos por causarem o mau odor do hálito.

A placa dentária é um biofilme amarelado que se forma sobre os dentes. Se não for removida regularmente, pode levar a cavidades nos dentes (cáries), gengivite e periodontite e eventualmente à perda dos dentes. Os micro-organismos que formam o biofilme são quase todos bactérias, com a composição variando através da localização na boca. A doença periodontal afeta o periodonto, que é o tecido envolvente e de sustentação em torno do dente (isto é, o ligamento periodontal, a gengiva e o osso alveolar). A gengivite e a periodontite são distúrbios inflamatórios da gengiva e dos tecidos periodontais mais profundos, respectivamente.

Hoje em dia, os consumidores estão muito interessados em tornar seus dentes mais brancos. Pessoas com dentes mais brancos são consideradas como tendo mais confiança pessoal e melhor aceitação social. Os dentes compreendem tanto uma camada de dentina interna quanto uma camada de esmalte rígido externa. A camada de esmalte protege a camada de

dentina interna e o tecido vivo e serve como a superfície de contato para a mastigação de alimento sólido. A camada de esmalte é geralmente translúcida e tem coloração ligeiramente esbranquiçada. É também considerada porosa uma vez que os cristais de hidróxi apatita que compreendem o esmalte formam bastões ou prismas hexagonais microscópicos que possuem poros ou canais microscópicos entre os mesmos. Como um resultado desta estrutura porosa, os agentes de coloração e as substâncias descolorantes, tais como antibióticos, alimentos contendo materiais corantes, café, cola, chá, tabaco etc., podem permear o esmalte e alterar sua superfície para ter uma aparência de coloração amarela ou amarronzada.

Embora a boa higiene oral, quando atingida pela escovação dos dentes com um agente dentrífcio de limpeza, possa ajudar a reduzir a incidência de coloração, gengivite, placa, doença periodontal e/ou mau hálito, esta não previne ou elimina necessariamente a ocorrência dos mesmos. Os micro-organismos contribuem tanto para o início quanto para a progressão de gengivite, placa, doença periodontal e/ou mau hálito. Assim, para prevenir ou tratar estes estados de saúde, estes micro-organismos têm que ser suprimidos através de algum meio sem ser a simples esfregação mecânica. Em adição, a simples esfregação mecânica não será totalmente eficiente para remover todos os tipos de manchas e/ou para branquear os dentes.

As enzimas que pertencem à classe EC 1.1.3. são oxidoredutases que utilizam oxigênio como receptor e grupos CH-OH constituem o doador. A capacidade de tais oxigênio oxidoredutases de gerar peróxido de hidrogênio, que possui um efeito antimicrobiano, tem sido utilizada para aumentar a estabilidade ao armazenamento de certos produtos alimentícios incluindo queijo, manteiga e suco de frutas como é descrito na JP-B-73/016612. Foi também sugerido que as oxidoredutases podem ser potencialmente úteis como absorvedores de oxigênio ou antioxidantes nos produtos alimentícios. A composição de branqueamento dos dentes que compreende oxidoredutase(s) é descrita na Patente U.S. Nº 6.379.653, em que o branqueamento dos dentes foi obtido através do tratamento com glicose oxidase. A glicose oxidase é altamente específica para a glicose e requer a

presença deste açúcar cariogênico que se degrada na boca em compostos responsáveis pelas cáries.

A WO97/06775 descreve composições orais que compreendem pelo menos uma oxidorreductase. As oxidorreductases consideradas pela  
5 WO97/06775 incluem enzimas dentro das classes de enzimas que compreendem as oxidases incluindo E. C. 1.1.3, E. C. 1.2.3, E.G. 1.3.3, E. C. 1.4.3, E. C. 1.5.3, E. C. 1.7.3, E. C. 1.8.3, E. C. 1.9.3, laccases e enzimas relacionadas compreendidas em E. C. 1.10.3 e peroxidases em E. C. 1.11. Os substratos que não são cariogênicos, tais como aminoácidos, álcool, álcool  
10 de açúcar, tal como xilitol e sorbitol são considerados como substratos adequados para as oxidorreductases. Uma xilitol oxidase específica é descrita na JP 80892242, que é relatada oxidar o xilitol, o D-sorbitol, o D-galactitol, o D-manitol e o D-arabinitol na presença de oxigênio.

A inclusão de certas enzimas oxidativas nas composições orais  
15 tais como pastas dentais, colutórios e dentríficos pode reduzir a placa e a gengivite. As enzimas que foram utilizadas incluem como seus ingredientes ativos, amiloglucosidase e glicose oxidase. Estas produzem peróxido de hidrogênio partindo dos carboidratos que podem ser fermentados da dieta que por sua vez converte tiocianato em hipotiocianito na presença da lactoperoxidase salivar. O hipotiocianito resultante atua como um inibidor bacteriano  
20 através da interferência com o metabolismo celular. A sorbitol oxidase é conhecida, por exemplo, de Hiraga K. e outros "Molecular cloning and expression of a gene encoding a novel sorbitol oxidase from *Streptomyces* sp. H-7775."; Biosci. Biotechnol. Biochem. 62: 347-353 (1998) que descreve a clonagem e a expressão da sorbitol oxidase de *Streptomyces* sp.  
25

A maior parte de substitutos do açúcar aprovados para uso alimentício é constituída de compostos sintetizados artificialmente. Entretanto, são conhecidos alguns substitutos naturais do açúcar – incluindo sorbitol e xilitol, que são encontrados em bagas, frutos, vegetais e cogumelos. Embora  
30 naturais, podem ser produzidos sinteticamente na produção de alimentos em massa, em custos de produção menores. Tanto o xilitol quanto o sorbitol são utilizados nas composições para cuidado oral tal como pasta de dente ou

goma de mascar para fornecer um sabor doce e, no caso do xilitol, para diminuir a produção de ácido láctico e aumentar a produção de saliva (Hayes C. J Dent Educ. 65(10): 1106-1109 2001).

Muito embora uma grande quantidade de pesquisa tenha sido realizada com a finalidade de encontrar composições úteis para o tratamento e/ou para a prevenção de gengivite, placa, doença periodontal e/ou mau hálito e/ou para o branqueamento dos dentes, composições eficientes adicionais e métodos de tratamento para estas finalidades ainda são desejáveis.

Detergentes para lavanderia e para lavar louças consistem em misturas complexas de uma grande variedade de ingredientes, que incluem tipicamente um número de componentes tais como tensoativos iônicos e não iônicos, solventes, builders, perfumes, enzimas e componentes de branqueamento. Em tais misturas complexas, os problemas de estabilidade no armazenamento, particularmente de enzimas, são bem-conhecidos. Em alguns casos os problemas de estabilidade estão relacionados com a estabilidade física do detergente, embora em outros casos, se refiram à estabilidade funcional dos ingredientes individuais no detergente. Os agentes de branqueamento tais como percarbonatos e perboratos, são comumente utilizados em detergentes em pó em que, junto com os ativadores de branqueamento (por exemplo, tetra-acetiletlenodiamina (TAED) e nonanoiloxibenzenosulfonato (NOBS)), atuam para gerar perácidos (por exemplo, ácido peracético), peróxido de hidrogênio e/ou outras espécies relacionadas após a adição de água durante o ciclo de lavagem. Os perácidos ou as outras espécies de oxigênio ativas atuam então para branquear ou alvejar certas manchas no tecido ou na louça. Entretanto, não há um sistema de branqueamento ideal disponível para uso nas formulações líquidas aquosas. Em adição, há uma necessidade da produção de agentes de branqueamento (por exemplo, espécies de oxigênio ativas, peróxidos e perácidos) após a diluição do detergente no líquido de lavagem de roupas para branquear e/ou alvejar manchas.

Enzimas tais como as oxidases são, em particular, suscetíveis aos problemas de estabilidade no armazenamento na formulação detergente

líquida. Isto previne seu uso amplo em composições para limpeza de tecidos e para manutenção da casa que envolvem ação alvejante. A manutenção da atividade enzimática da oxidase nos detergentes durante o armazenamento tem sido um desafio, especialmente em detergentes que contêm ainda componentes do substrato da oxidase. A presença tanto da oxidase quanto do substrato da oxidase resulta na geração de peróxido *in situ*. Isto resulta na menor estabilidade enzimática devido à oxidação das enzimas tanto em formulações líquidas quanto secas. Os peróxidos danificam as enzimas através de vários mecanismos tais como a oxidação de alguns dos resíduos de aminoácidos ou através da interação com os cofatores das enzimas. Isto resulta frequentemente em uma perda gradual da atividade. Nas formulações detergentes secas, as enzimas podem ser estabilizadas, por exemplo, através do encapsulamento das enzimas como descrito na WO 96/02623.

## 15 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma composição que compreende uma primeira enzima, um substrato para a primeira enzima e uma enzima adicional e ao uso da mesma para branquear e/ou alvejar, por exemplo, dentes, pele, pelos, tecidos ou papel, a um produto para cuidado oral e a um método para branquear e/ou alvejar dentes, ao uso como um conservante e como um agente antimicrobiano, ao uso em cosméticos, em detergentes, em tintas, em alimentos humanos e animais, na produção e na preparação de alimentos humanos e animais e em pesticidas.

A presente invenção se baseia em uma sinergia surpreendente que os presentes inventores descobriram quando um sistema de produção de peróxido de hidrogênio que compreende uma primeira enzima, tal como uma poliol oxidase e um primeiro substrato, tal como um poliol, é acoplado a um sistema enzimático adicional, tal como um sistema da enzima oxidorreductase que utiliza o produto sem ser peróxido de hidrogênio gerado pela primeira oxidase (isto é, o segundo substrato) gerando opcionalmente mais peróxido de hidrogênio.

Foi descoberto que o acoplamento das primeira e segunda en-

zimas (sistemas) aumenta enormemente a eficiência da produção de peróxido de hidrogênio partindo do primeiro sistema enzimático e pode resultar na produção de peróxido de hidrogênio partindo tanto do primeiro quanto do segundo substratos. O efeito é uma produção de peróxido de hidrogênio consideravelmente maior e devido à sinergia surpreendente entre a primeira oxidase e a enzima/oxidoreductase adicional, uma taxa muito maior de peróxido de hidrogênio comparada com a que seria esperada partindo do sistema do primeiro substrato/primeira enzima oxidase isoladamente (ou do sistema enzimático oxidoreductase adicional isoladamente). Isto é como se o acoplamento do sistema enzimáticos adicional 'carregasse de forma turbinada' a primeira oxidase, forçando a produção do nível muito alto de peróxido de hidrogênio.

A primeira enzima é preferencialmente uma oxidase e é referida aqui como uma primeira oxidase. Uma oxidase preferida é a poliol oxidase, tal como a sorbitol oxidase.

A presente invenção fornece composições detergentes que compreendem a composição, da invenção assim como métodos para uso da composição da invenção em composições detergentes líquidas para o branqueamento e para a limpeza, por exemplo, de manchas coradas de alimentos.

Durante o desenvolvimento da presente invenção, foi descoberto de forma surpreendente que as sorbitol oxidases eram adequadas para uso nos sistemas de branqueamento que evitavam as desvantagens que atrapalham os sistemas de branqueamento utilizados atualmente.

O acoplamento da primeira oxidase a uma enzima adicional permite, portanto, a exploração completa da capacidade oxidativa associada ao primeiro substrato. Parece que a primeira oxidase atua como um 'elemento vital' que é substancialmente robusto em um ambiente detergente e, como descrito aqui, permite a produção eficiente e rápida do poder de branqueamento do peróxido de hidrogênio, especialmente quando acoplada a uma oxidoreductase adicional.

A presente invenção fornece em um aspecto uma composição

que compreende uma primeira oxidase, um primeiro substrato e uma oxidorredutase, em que o primeiro substrato é oxidável pela primeira oxidase para formar peróxido de hidrogênio e um segundo substrato e o segundo substrato é oxidável pela oxidorredutase para formar peróxido de hidrogênio e um  
5 produto.

Em um aspecto adicional, a invenção fornece um produto para cuidado oral que compreende uma composição de acordo com a invenção e ingredientes utilizados nos produtos para cuidado oral.

Em um aspecto adicional, a invenção fornece um produto cos-  
10 mético que compreende uma composição de acordo com a invenção e um ou mais ingredientes utilizados nos produtos cosméticos.

Em um aspecto adicional, a invenção fornece um produto detergente que compreende uma composição de acordo com a invenção e um ou mais ingredientes utilizados nos produtos detergentes.

Em um aspecto adicional, a invenção fornece um produto de tin-  
15 ta que compreende uma composição de acordo com a invenção e um ou mais ingredientes utilizados nos produtos de tinta.

Em um aspecto adicional, a invenção fornece um produto pesti-  
cida que compreende uma composição de acordo com a invenção e um ou  
20 mais ingredientes utilizados nos produtos pesticidas.

Em uma modalidade adicional, a invenção fornece um produto alvejante ou alvejante, tal como um produto alvejante ou alvejante para alve-  
jar ou branquear um tecido externo de mamífero, tal como pele, pelos ou  
dentes que compreende uma composição de acordo com a invenção e in-  
25 gredientes utilizados nos produtos alvejantes e alvejantes adequados para a aplicação sobre o tecido externo de mamífero.

Em uma modalidade adicional, a invenção fornece um método cosmético para alvejar ou branquear o tecido externo de mamífero que com-  
preende o contato do tecido externo de mamífero com uma composição de  
30 acordo com a invenção ou com o produto para alvejar e/ou branquear o tecido externo de mamífero de acordo com a invenção em uma quantidade e uma duração adequadas para alvejar e/ou branquear o tecido externo de



mamífero.

A invenção fornece ainda um medicamento que compreende uma composição de acordo com a invenção.

5 A invenção fornece ainda uma bebida que pode ser ingerida que compreende uma composição de acordo com a invenção, tal como um suco de fruta.

Em uma modalidade, a composição não compreende o primeiro substrato, mas o primeiro substrato está naturalmente presente ou é adicionado na composição ou na matriz de aplicação.

10 A invenção fornece ainda um produto detergente ou alvejante que compreende uma composição de acordo com a invenção e pelo menos um ingrediente adicional utilizado nos produtos detergentes ou alvejantes.

A invenção fornece ainda o uso da composição de acordo com a invenção em um produto para cuidado oral com efeitos alvejantes e/ou alve-  
15 jantes dos dentes benéficos e/ou vida útil estendido e/ou efeitos antimicrobi-  
anos/antibacterianos antes ou durante o uso.

A invenção fornece ainda o uso de uma composição de acordo com a invenção em um produto comestível com efeitos pré-bióticos benéfi-  
cos quando consumido por um mamífero individual e/ou uma vida útil pro-  
20 longada.

A invenção fornece ainda o uso de uma composição de acordo com a invenção em um produto cosmético que possui uma vida útil prolongada e/ou é capaz de alvejar e/ou branquear o tecido externo de mamífero e/ou possui um efeito antimicrobiano/antibacteriano quando aplicado na pele  
25 humana.

A invenção fornece ainda o uso de uma composição de acordo com a invenção em um produto de tinta que exhibe maior conservação antes ou após a aplicação e/ou exhibe propriedade anti-incrustante reduzida.

A invenção fornece ainda um método para a preparação de uma  
30 composição que compreende a mistura de uma primeira enzima e um primeiro substrato e pelo menos uma enzima adicional, em que o primeiro substrato é oxidável pela primeira enzima, tal como a sorbitol oxidase, para

formar peróxido de hidrogênio e um segundo substrato e o segundo substrato pode ser convertido por pelo menos uma enzima adicional para formar um produto.

5 A composição pode compreender um componente ou componentes de matriz adequados aos quais a primeira enzima e pelo menos uma enzima adicional são misturadas. O primeiro substrato também pode ser misturado no componente de matriz ou, em uma modalidade faz parte ou até constitui todo o componente de matriz. O componente de matriz pode, portanto, consistir ou compreender o primeiro substrato.

10 A invenção fornece ainda um método para a preparação de uma composição que compreende a mistura de uma primeira oxidase e um primeiro substrato e pelo menos uma oxidoredutase adicional, em que o primeiro substrato é oxidável pela primeira oxidase tal como a sorbitol oxidase, para formar peróxido de hidrogênio e um segundo substrato e o segundo  
15 substrato é oxidável pela oxidoredutase para formar peróxido de hidrogênio e um produto.

A invenção fornece ainda o uso de uma composição de acordo com a invenção, na produção de um medicamento para o tratamento ou para a prevenção de um distúrbio médico selecionado dentre: doença gengival,  
20 gengivite, doença periodontal, síndrome do intestino irritável, intolerância à lactose, câncer de cólon, alto teor de colesterol no sangue, alta pressão sanguínea, hipertensão, infecção, inflamação e deficiências nutricionais.

A invenção fornece ainda um método de tratamento médico que compreende a administração de uma composição de acordo com a invenção  
25 ou de um medicamento ou de produtos para cuidado oral de acordo com a invenção a um paciente que necessita do tratamento ou da profilaxia.

A invenção fornece ainda um método de produção de peróxido de hidrogênio, o método compreendendo a mistura de uma primeira enzima e um primeiro substrato e pelo menos uma enzima adicional sob condições  
30 adequadas para a produção de peróxido de hidrogênio a partir da oxidação do primeiro substrato devido à atividade da primeira enzima e opcionalmente a produção de peróxido de hidrogênio adicional a partir da oxidação de um

segundo substrato devido à atividade de pelo menos uma enzima adicional, em que o segundo substrato é gerado pela oxidação do primeiro substrato pela primeira oxidase e em que o segundo substrato é convertido em um produto por pelo menos uma enzima adicional.

- 5                   A invenção fornece ainda um método de produção de peróxido de hidrogênio, o método compreendendo a mistura de uma primeira oxidase e um primeiro substrato e pelo menos uma oxidorredutase adicional sob condições adequadas para a produção de peróxido de hidrogênio partindo tanto da oxidação do primeiro substrato devido à atividade da primeira oxi-
- 10   dase quanto da produção de peróxido de hidrogênio a partir da oxidação de um segundo substrato devido à atividade de pelo menos uma oxidorredutase adicional, em que o segundo substrato é gerado pela oxidação do primeiro substrato pela primeira oxidase.

- Em um outro aspecto, a invenção fornece o uso de uma compo-
- 15   sição de acordo com a invenção para branquear e/ou alvejar.

- Em um outro aspecto, a invenção fornece um método para alvejar e/ou branquear os dentes, que compreende o contato dos dentes com um produto para cuidado oral que compreende uma composição de acordo com a invenção em uma quantidade e um período de tempo adequados para al-
- 20   vejar e/ou branquear os dentes.

                  A invenção fornece o uso de uma composição de acordo com a invenção para branquear e/ou alvejar os dentes.

- Embora os aspectos principais da invenção se refiram a um sistema enzimático acoplado, em algumas modalidades, tais como as modali-
- 25   dades a seguir, a invenção fornece composições que compreendem uma poliol oxidase e um primeiro substrato, que são referidos aqui. Foi descoberto que o uso do sistema enzimáticos de poliol oxidase/primeiro substrato é altamente benéfico nestas aplicações, tal como a produção de peróxido de hidrogênio partindo de um substrato que não pode ser fermentado, opcio-
- 30   nalmente sem a diminuição do pH (por exemplo, como quando não acoplado a um sistema de oxidorredutase adicional) e as características antimicrobianas/bacterianas, antideterioração, alvejantes e alvejanteas são fornecidas

dessa maneira.

A invenção fornece uma composição de tinta que compreende uma poliol oxidase e um primeiro substrato, em que o primeiro substrato é oxidável pela poliol oxidase para formar peróxido de hidrogênio.

5 A invenção fornece uma composição cosmética que compreende uma poliol oxidase e um primeiro substrato, em que o primeiro substrato é oxidável pela poliol oxidase para formar peróxido de hidrogênio.

A invenção fornece uma composição de alimentos humanos ou animais que compreende uma poliol oxidase e um primeiro substrato, em  
10 que o primeiro substrato é oxidável pela poliol oxidase para formar peróxido de hidrogênio, de forma que uma composição de alimentos humanos ou animais é selecionada do grupo que consiste em: produtos laticínios, tais como leite, creme, queijo, soro de leite; bebidas, tal como suco de fruta.

A invenção fornece uma composição de medicamento que compreende uma poliol oxidase e um primeiro substrato, em que o primeiro  
15 substrato é oxidável pela poliol oxidase para formar peróxido de hidrogênio, tal como quando o primeiro substrato é sorbitol ou preferencialmente xilitol.

A invenção fornece uma composição pesticida que compreende uma poliol oxidase e um primeiro substrato, em que o primeiro substrato é  
20 oxidável pela poliol oxidase para formar peróxidos de hidrogênio.

#### FIGURAS:

Figura 1: O plasmídeo de expressão (pKB105-TAT-SOX-7775).

Figura 2: O plasmídeo "pKB105-CelA-Sox7775".

Figura 3: A velocidade inicial da produção de  $H_2O_2$  utilizando as  
25 composições com um excesso entre 1x 3000x da enzima adicional (oxidoreductase) comparada com a da primeira oxidase (SOX), que é medida ao longo de 5 minutos em 300  $\mu$ L de ensaio ABTS. Foi observada uma sinergia drástica com as enzimas adicionais tanto glicose oxidase quanto hexose oxidase, com um aumento de até aproximadamente 250 - 300% na taxa de  
30 produção peróxido de hidrogênio observada.

Figura 4: A velocidade inicial da produção de  $H_2O_2$  utilizando as composições com um excesso entre 1x e 3000x da enzima adicional (oxidore-

redutase) comparada com a da poliol oxidase, que é medida ao longo de 5 minutos em 300 µL de ensaio ABTS. Foi observada uma sinergia drástica com as enzimas adicionais tanto glicose oxidase quanto hexose oxidase, especialmente em dosagens maiores que 1x, tal como uma dosagem de pelo menos 2x das enzimas adicionais comparada com a da poliol oxidase.

Figura-5a: pET 24a – vetor de expressão da sorbitol oxidase (H7775).

Figura 5b. Expressão da Sorbitol oxidase ativa na cepa BL21 (DE3) pLysS de *E. coli*:

- a) Vetor de expressão contendo o fragmento de NdeI-BamHI de 1,27, que codifica o gene sintético SOX de *Streptomyces*,
- b) Ensaio de atividade de cobertura em gel (PMS/NBT) utilizando sorbitol com substrato. Controle negativo: Glicose oxidase (GOX) na faixa 1, as faixas 2-10 são lisados de células de transformantes diferentes.

Figura 6. O constructo para expressão do suposto gene SOX na cepa de *Streptomyces lividans* g3s3. O suposto gene SOX foi clonado na forma do fragmento da pCR NcoI-BamHI e inserido.

## 20 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se em um aspecto a uma composição que compreende uma primeira enzima tal como uma poliol oxidase (por exemplo, sorbitol oxidase), um primeiro substrato e uma enzima adicional tal como uma oxidorreductase, em que o primeiro substrato é oxidável pela primeira oxidase, para formar peróxido de hidrogênio e um segundo substrato e o segundo substrato pode ser convertido pela enzima adicional para a obtenção de um produto.

Preferencialmente, a enzima adicional é uma oxidorreductase adicional e o segundo substrato é oxidável pela oxidorreductase para gerar peróxido de hidrogênio e o produto (adicional).

A composição de acordo com a invenção pode ser aplicada para todas as finalidades em que a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é necessária, por exemplo,

em aplicações em que o alvejamento e/ou o branqueamento é necessário ou para as finalidades antimicrobianas e especialmente em produtos em que ingredientes não tóxicos e ambientalmente aceitáveis são desejados.

#### O Primeiro Substrato

5                   No presente contexto, o termo "primeiro substrato" se refere a um substrato que é oxidável pela primeira enzima (tal como a primeira oxidase tal como a sorbitol oxidase) para gerar peróxido de hidrogênio e um segundo substrato.

10                   Em um aspecto da invenção, o primeiro substrato é um poliol, tal como um ou mais substratos selecionados de álcoois de açúcar tais como os selecionados do grupo que consiste em D-sorbitol, D-xilitol, D-manitol, D-arabitol, glicerol, inositol, 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol e 1,4-butanodiol.

                    Em uma modalidade, o primeiro substrato é um ou mais polióis selecionados do grupo que consiste em D-sorbitol ou D-xilitol.

15                   Em uma modalidade, o primeiro substrato é D-sorbitol.

                    É reconhecido que açúcares e álcoois de açúcar que existem nos estereoisômeros D ou L, é a forma D que prevalece na natureza, e são, portanto, preferido em termos dos primeiro e segundo substratos como referido aqui.

20                   Em um aspecto adicional da invenção, o primeiro substrato é um adoçante não cariogênico tal como selecionado do grupo que consiste em D-sorbitol ou D-xilitol. Ainda em um aspecto adicional, o primeiro substrato é D-sorbitol. D-sorbitol e D-xilitol são essencialmente não cariogênicos e já são utilizados em produtos para cuidado oral, por exemplo, em goma de mascar  
25                   como um adoçante artificial com resultados benéficos (Hayes C. J Dent Educ. 65(10): 1106-1109 2001).

                    Em um aspecto, o primeiro substrato é um ou mais substratos de álcool de açúcar selecionados do grupo que consiste em sorbitol, xilitol, maltitol, manitol, galactitol, isomalte, lactitol, arabitol e eritritol.

30                   Em um aspecto, o primeiro substrato pode ser selecionado do grupo que consiste em: ribitol, treitol, lixitol, alitol, altritol, gulitol, iditol, talitol, pentitol e hexitol.

Em um aspecto, o primeiro substrato é um ou mais substratos de álcoois de açúcar selecionados do grupo que consiste em sorbitol, xilitol, maltitol, manitol, galactitol, isomalte, lactitol, arabitol, eritritol, glicerol, inositol, 1,2-propanodiol, 1,3-butanodiol e 1,4-butanodiol.

5                    Em um aspecto preferido da invenção, o primeiro substrato é ou compreende sorbitol.

Em um aspecto da invenção, o primeiro substrato é ou compreende xilitol.

10                   A poliol oxidase e a oxidorreductase adicional são oxidases que são capazes de gerar peróxido ( $H_2O_2$ ).

O nível de poliol presente em uma composição de acordo com a invenção dependerá da aplicação e da formulação utilizada. Para uso em produtos para cuidado oral pode ser utilizado um alto nível de poliol, em que o poliol pode ser o ingrediente de matriz principal na composição. Os polióis também podem formar um componente principal de formulações cosméticas. Em tais aplicações, os polióis podem ser adicionados como agentes umectantes. Os polióis também podem ser adicionados em detergentes tais como sabões, em que podem ter uma função umectante ou como um agente de clarificação.

20                   Entretanto, em algumas aplicações, tais como em algumas aplicações de tinta e de detergente o poliol pode ser adicionado como um componente mioritário, suficiente para fornecer o primeiro substrato suficiente para a produção de peróxido de hidrogênio, mas não constituindo um componente principal de matriz.

25                   Portanto, por exemplo, o nível do primeiro substrato presente na composição da invenção, antes da oxidação no segundo substrato pode ser entre aproximadamente 0,05% até aproximadamente 80% em p/p, tal como entre 0,1% e aproximadamente 70% em p/p.

30                   De forma adequada em uma modalidade, o nível de poliol presente nos produtos para cuidado oral pode, portanto, ser entre aproximadamente 1 até aproximadamente 80% em p/p, tal como entre aproximadamente 10 até aproximadamente 75% em p/p ou tal como entre aproximadamente

20 até aproximadamente 70% em p/p.

De forma adequada em uma modalidade, o nível de poliol presente nos produtos de tinta pode variar entre aproximadamente 0,01 até aproximadamente 20% em p/p, tal como de aproximadamente 0,1 até aproximadamente 10% em p/p, tal como de aproximadamente 1 até aproximadamente 5% em p/p.

De forma adequada em uma modalidade, o nível de poliol presente em uma composição cosmética ou em produtos de acordo com a invenção pode variar entre aproximadamente 1 até aproximadamente 50% em p/p, tal como entre aproximadamente 5 até aproximadamente 40% em p/p ou tal como entre aproximadamente 10 até aproximadamente 40% em p/p. A Patente U.S. Nº 7094395 descreve cosméticos que compreendem aproximadamente 8-32% de poliol (umectantes), tal faixa pode também ser utilizada nas composições da presente invenção.

De forma adequada, em modalidades adicionais, o nível de poliol presente nos produtos detergentes pode variar entre aproximadamente 0,01% até aproximadamente 40% em p/p, tal como entre aproximadamente 0,1% até aproximadamente 30%, tal como entre aproximadamente 1% até aproximadamente 20%, tal como entre aproximadamente 1% até aproximadamente 10% ou entre aproximadamente 1% e aproximadamente 5%.

#### A Primeira Enzima

A primeira enzima é tipicamente uma enzima oxidase e é referida aqui como 'primeira oxidase'.

A primeira enzima, tal como a primeira oxidase pode ser derivada ou isolada de um organismo selecionado do grupo que consiste em: espécies de *Streptomyces*, *Xanthomonas*, *Brevibacterium*, *Frankia*, *Nocardia*, *Janibacter*, *Burkholderia*, *Paracoccus*, *Chromabacterium*, *Thermobifida*, *Psuedomonas*, *Corynebacterium* e *Bacillus* e homólogos das mesmas.

As primeiras oxidases adequadas podem incluir enzimas que são categorizadas sob um número de Classificação de Enzima (E. C.) selecionado do grupo que consiste em: EC 1.1.3.14 catecol oxidase, EC 1.1.3.18 álcool oxidase secundária, EC 1.1.3.41 xilitol oxidase, EC 1.1.3.13 álcool



oxidase, EC 1.1.3.19 4-hidroximandelato oxidase, EC 1.1.3.20 álcool oxidase de cadeia longa, EC 1.1.3.40 D-manitol oxidase, EC 1.1.3.7 arilálcool oxidase, EC 1.1.3.30 polivinilálcool oxidase, EC 1.1.3.21 glicerolalcoooloxidase e EC 1.1.3.38 vanililálcool oxidase.

5 A JP 80892242 descreve uma xilitol oxidase que oxida xilitol, D-sorbitol, D-galactitol, D-manitol e D-arabinitol na presença de oxigênio.

Uma xilitol oxidase que pode ser obtida partindo de cepas de *Streptomyces* sp. (por exemplo, *Streptomyces* IKD472, FERM P14339) possuindo um pH ótimo em 7,5, é estável em pH 5,5 até 10,5 e a temperaturas até 65°C; propriedades muito bem adequadas para as aplicações descritas aqui, tais como composições e produtos para cuidado oral e detergentes.

Em uma modalidade específica, a primeira enzima não é a xilitol oxidase que pode ser obtida partindo de cepas de *Streptomyces* sp. (por exemplo, *Streptomyces* IKD472, FERM P14339) possuindo um pH ótimo em 7,5 e que é estável em pH 5,5 até 10,5 e a temperaturas de até 65°C.

Durante o desenvolvimento da presente invenção, foi descoberto de forma surpreendente que as poliol oxidases tais como as sorbitol oxidases eram adequadas para uso em sistemas de branqueamento que evitavam as desvantagens que atrapalham os sistemas de branqueamento atualmente utilizados. Estas sorbitol oxidases incluem enzimas isoladas de organismos tais como espécies de *Streptomyces* ou de *Xanthomonas* e homólogos das mesmas. Entretanto, não é pretendido que a presente invenção seja limitada a esta(s) sorbitol oxidase(s) específica(s) nem a qualquer (quaisquer) particular(es).

25 A sorbitol oxidase ("SOX" ou "SoX") é uma enzima que catalisa a conversão do sorbitol em glicose e peróxido de hidrogênio. As sorbitol oxidases são conhecidas e utilizadas em várias aplicações (Ver, por exemplo, Oda e Hiraga, Ann. NY Acad. Sci., 864: 454-457 [1998]; e Yamashita e outros J. Biosci. Bioengin., 89: 350-360 [2000]). O sorbitol (D-glucitol,  $C_6H_{14}O_6$ , PM 182,2, CAS 50-70-4) é comumente utilizado em formulações de produtos com enzimas. Assim, a sorbitol oxidase fornece um agente bioalvejante atraente para uso em detergentes que incorporam estas formulações de pro-

duos com enzimas contendo sorbitol.

- Em uma modalidade, a primeira oxidase possui uma atividade específica maior sobre o sorbitol quando comparada com aquela sobre o xilitol, tal como uma atividade específica de pelo menos aproximadamente 1,5x ou de pelo menos aproximadamente 2x maior que a atividade específica sobre o sorbitol quando comparada com aquela sobre o xilitol.

Em uma modalidade, a primeira oxidase possui uma atividade específica sobre o sorbitol de pelo menos aproximadamente 5 unidades/mg.

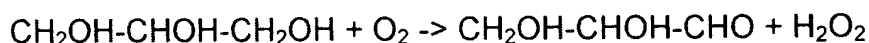
- A atividade específica da primeira oxidase sobre os substratos sorbitol e xilitol pode ser determinada *in vitro*, tal como utilizando os ensaios fornecidos nos exemplos ou alternativamente a atividade específica pode ser determinada *in situ*, dentro da dita composição para cuidado oral.

- Uma SOX preferida é uma oxidoredutase que utiliza FAD ligado covalentemente como um cofator para a oxidação do sorbitol em glicose. Esta enzima oferece uma oportunidade exclusiva para seu uso potencial como um agente bioalvejante por si só, assim como utilizada em combinação com carboidrato oxidases tais como glicose oxidase e/ou hexose oxidase (ver a WO 96/39851), (gluco)oligossacarídeo oxidase e carboidrato oxidase de *M. nivale* (ver a WO99/31990).

- Uma vantagem do uso de tais combinações é devido ao fato de que a SOX converte o sorbitol em glicose, que pode então ser convertida em gluconato pela glicose oxidase e/ou pela hexose oxidase, gerando assim dois mols de peróxido de hidrogênio por mol de sorbitol, como ilustrado abaixo.

- D-Sorbitol + O<sub>2</sub> -> D-Glicose + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
D-Glicose + O<sub>2</sub> -> D-Gluconato + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

- Uma glicerol oxidase (GLOX) preferida é uma enzima encontrada nos gêneros *Penicillium* e *Botrytis* (Ver, por exemplo, Lin e outros *Enz. Micro. Technol.*, 18: 383-387 [1996]; e Uwajima e outros, *Agric. Biol. Chem.*, 44: 399-406 [1989]). Esta enzima catalisa a conversão de glicerol e oxigênio em gliceraldeído e peróxido de hidrogênio como mostrado abaixo.



O glicerol (glicerina,  $C_3H_8O_3$ , PM 92,09, CAS 56-81-5) é comumente utilizado em formulações de produtos com enzimas, formulações para sabão e detergente, alimentos e bebidas, produtos farmacêuticos e é amplamente utilizado em cosméticos e aplicações de cuidado pessoal. Assim, a glicerol oxidase fornece um agente bioalvejante atraente para uso em detergentes que incorporam estas formulações de produtos com enzimas contendo glicerol.

Durante o desenvolvimento da presente invenção, a sorbitol oxidase foi isolada de *Streptomyces lividans* (SCO6147) (SEQ ID Nº: 2) e *Streptomyces* sp. H7775 (SEQ ID NO 1) (Ver, Hiraga e outros, Biosci. Biotech. Biochem., 61: 1699-1704 [1997]). A sorbitol oxidase foi expressa tanto de forma intracelular quanto extracelular partindo destes organismos. O grupo prostético é um FAD ligado covalentemente (1 mol de FAD para 1 mol de SOX). Assim é uma flavoproteína, com máximo de absorção típico em 276, 358 e 455 nm para a H7775 SOX, 345 nm para a SCO6147 SOX (que é expressa em *S. lividans*), que é indicativo de uma ligação histidina-flavina. A flavina está funcionalmente envolvida na oxidação do sorbitol que é observada pelas alterações desejadas nos espectros de UV-VIS. O FAD fica muito fortemente ligado com a proteína e oferece assim uma enzima estável para aplicações de lavanderia.

O gene SOX foi clonado e sequenciado a partir da espécie de *Streptomyces* H-7775 (número de acesso do Genbank AB000519).

O gene da sorbitol oxidase proveniente da espécie de *Streptomyces* H-7775 (número de acesso do Genbank AB000519) compreende um quadro aberto de leitura (ORF) de 1260 pb que codifica uma proteína que possui 420 aminoácidos com PM teórico de 45.158 Dáltons. A enzima é estável durante 24 horas a 30°C, entre pH 7,5-10 com uma temperatura ótima de 50°C em pH 7,5. É também termoestável até 55°C. O homólogo mais próximo identificado para esta enzima é a xilitol oxidase (51% de homologia). A SOX é uma enzima eficiente para várias aplicações, incluindo detergentes, cuidado de tecidos, cuidado doméstico, cuidado oral (por exemplo, branqueamento e/ou limpeza dental), cuidado pessoal, processamento de tecidos,

processamento de alimentos e limpeza industrial. Em adição, várias SOXs podem catalisar outros substratos tais como xilitol, manitol, arabitól, ribitol, eritritol, inositol, glicerol, propano diol e butano diol. Assim, esta enzima utiliza um espectro mais amplo de substratos, fornecendo flexibilidade no uso de substratos em várias aplicações.

Muitos destes primeiros substratos, que são fornecidos aqui, estão presentes em formulações para detergente, cuidado oral e cosméticas típicas ou podem ser adicionadas às mesmas.

A sequência de aminoácidos da sorbitol oxidase de *Streptomyces* sp. H7775 é conhecida na técnica e é apresentada na SEQ ID N<sup>o</sup>: 1.

Como indicado anteriormente, foi descoberto que a poliol oxidase tal como as sorbitol oxidases utilizadas aqui é termicamente estável e estável ao longo de uma faixa ampla de pH. Na verdade, foi descoberto que o perfil de pH da sorbitol oxidase utilizada era compatível com o dos pHs necessariamente utilizados na indústria, assim como em detergentes e outros agentes de limpeza.

Em adição, a poliol oxidase tal como a sorbitol oxidase fornecida pela presente invenção pode produzir preferencialmente açúcar tal como glicose, isto é, um produto de aldeído que pode ser adicionalmente oxidado em ácido glucônico, um produto do ácido carboxílico, utilizando outras oxidases tal como a hexose oxidase ou a glicose oxidase que libera uma outra molécula de peróxido de hidrogênio partindo do sorbitol do substrato de partida. Similarmente é possível a oxidação de polióis tais como xilitol, arabitól, manitol, pela sorbitol oxidase, xilitol oxidase, manitol oxidase com o auxílio de oxigênio atmosférico com a formação do açúcar correspondente, tal como xilose, arabinose, manose, respectivamente como o substrato secundário para a oxidação adicional por outras oxidases relevantes tais como hexose oxidase, xilose oxidase, piranose oxidase, arabinose oxidase e manose oxidase.

Para uso em composições comestíveis e para cuidado oral, é também vantajoso utilizar enzimas que são substancialmente ativas em pHs prevalentes na boca, isto é, entre pH 5,0 até 9,0, preferencialmente entre

pH 6,0 até 8,5, especialmente entre pH 6,4 até 7,5.

Em uma modalidade, a poliol oxidase é uma pentitol ou hexitol oxidase.

Em uma modalidade, a poliol oxidase não é uma triose oxidase ou não é uma glicerol oxidase.

É reconhecido que as enzimas podem ter atividade sobre mais de um substrato. Portanto, quando se refere a uma enzima pelo nome do composto que esta oxida, por exemplo, sorbitol oxidase (sorbitol) ou hexose oxidase (hexose) ou glicose oxidase (glicose), o nome se refere à classificação que foi dada à enzima, tal como o número de EC ou ao nome que a enzima é referida na técnica ou à atividade predominante quando comparada ao substrato para o qual a enzima possui a maior atividade específica. Sob este aspecto, uma sorbitol oxidase possui uma atividade específica maior sobre o sorbitol do que, por exemplo, sobre o xilitol. De forma adequada, a sorbitol oxidase pode, em uma modalidade, catalisar também a oxidação de vários polióis incluindo pelo menos dois do grupo que consiste em D-sorbitol, D-xilitol, D-manitol, D-arabitol, glicerol, inositol, 1,2-propanodiol, 1,3-butanodiol e 1,4-butanodiol.

Em uma modalidade, a poliol oxidase é selecionada do grupo que consiste em ribitol oxidase, treitol oxidase, xilitol oxidase, alitol oxidase, altritol oxidase, gulitol oxidase, iditol oxidase, talitol oxidase, pentitol oxidase e hexitol oxidase.

Em uma modalidade a poliol oxidase possui uma taxa de atividade específica sobre o poliol que será denominado posteriormente, comparada com a atividade específica sobre um substrato alternativo, que é listado aqui como o dito primeiro substrato ou o dito segundo substrato, excluindo o substrato cujo poliol será denominado posteriormente, maior que 1, tal como maior que aproximadamente 1,5, tal como maior que aproximadamente 2, tal como maior que aproximadamente 3, tal como maior que aproximadamente 4, tal como maior que aproximadamente 5, tal como maior que aproximadamente 10. Em uma modalidade, a poliol oxidase possui uma taxa de atividade específica sobre o sorbitol comparada com a atividade específica sobre

um substrato alternativo, maior que 1, tal como maior que aproximadamente 1,5, tal como maior que aproximadamente 2, tal como maior que aproximadamente 3, tal como maior que aproximadamente 4, tal como maior que aproximadamente 5, tal como maior que aproximadamente 10, em que o substrato alternativo é selecionado do grupo que consiste em: um açúcar tal como maltose, hexose, glicose, manose, galactose, isomaltulose, lactose, arabinose, eritrose, pentose, xilose e triose, preferencialmente glicose; uma triose poliol, tal como glicerol; e xilitol.

Em uma modalidade, a poliol oxidase não é xilitol oxidase.

10 Em uma modalidade, a primeira oxidase tal como a poliol oxidase exibe uma atividade maior sobre o sorbitol do que sobre o xilitol, tal como o pelo menos uma vez e meia a mais de atividade, tal como pelo menos duas vezes a mais de atividade. Na mesma modalidade ou em uma modalidade diferente, a poliol oxidase possui não mais que três vezes a atividade sobre o sorbitol quando comparada com aquela sobre o xilitol.

Em uma modalidade, a primeira oxidase tal como a poliol oxidase é selecionada do grupo que consiste em: sorbitol oxidase, xilitol oxidase, maltitol oxidase, manitol oxidase, galactitol oxidase, isomalte oxidase, lactitol oxidase, arabitól oxidase, arabitól oxidase e eritritol oxidase.

20 Em uma modalidade, a primeira oxidase tal como a poliol oxidase possui uma atividade de oxidase (específica) de pelo menos aproximadamente 5 unidades/g de proteína quando o respectivo substrato (por exemplo, poliol) é utilizado, tal como um substrato selecionado do grupo que consiste em: Sorbitol, xilitol, maltitol, manitol, galactitol, isomalte, lactitol, arabitól, arabitól e eritritol.

Uma primeira oxidase preferida, tal como a poliol oxidase é a sorbitol oxidase ou uma enzima que exibe atividade sobre o sorbitol.

Em uma modalidade a primeira oxidase tal como a poliol oxidase é a xilitol oxidase ou exibe atividade da xilitol oxidase.

30 Em uma modalidade a primeira oxidase tal como a poliol oxidase é uma glicerol oxidase ou compreende atividade da glicerol oxidase.

Em uma modalidade, a primeira oxidase tal como a poliol oxidase

se possui uma proporção de atividade específica sobre o respectivo poliol em relação ao açúcar correspondente maior que 1, tal como pelo menos aproximadamente 1,5, tal como pelo menos aproximadamente 2, tal como pelo menos aproximadamente 3, tal como pelo menos aproximadamente 4, tal como pelo menos aproximadamente 5, tal como pelo menos aproximadamente 10. Em uma modalidade, a primeira oxidase tal como a poliol oxidase possui uma taxa de atividade específica sobre o respectivo poliol em relação à glicose maior que aproximadamente 1, tal como pelo menos aproximadamente 1,5, tal como pelo menos aproximadamente 2, tal como pelo menos aproximadamente 3, tal como pelo menos aproximadamente 4, tal como pelo menos aproximadamente 5, tal como pelo menos aproximadamente 10.

Em uma modalidade, a primeira oxidase tal como a poliol oxidase, tal como a sorbitol oxidase ou a xilitol oxidase é derivada ou obtida de uma cepa de *Streptomyces*, tal como de *Streptomyces coelicolor* ou de *Streptomyces* sp. IKD472.

Em uma modalidade, a primeira oxidase tal como a poliol oxidase, tal como a sorbitol oxidase é derivada ou obtida de uma cepa de *Streptomyces coelicolor*.

Em uma modalidade preferida, a primeira oxidase tal como a poliol oxidase, tal como a sorbitol oxidase, é um polipeptídeo que consiste em ou é derivado da SEQ ID NO 1 ou da SEQ ID NO 2 e homólogos, variações ou fragmentos do mesmo.

Em uma modalidade, utilizando o ensaio fornecido pelo Exemplo 6, a poliol oxidase possui atividade sobre D-sorbitol, D-xilitol, D-manitol, D-ribitol, mio-inositol e glicerol. Em uma modalidade adicional, que pode ser a mesma ou diferente, a poliol oxidase possui atividade sobre 1,3 propanodiol e/ou 1,2 propanodiol.

Em uma modalidade, utilizando o ensaio fornecido pelo Exemplo 6, a poliol oxidase não possui atividade sobre propileno glicol e/ou etileno glicol.

A sorbitol oxidase (SOX) pode ser obtida partindo de micro-

organismos adequados tais como *Streptomyces*. Hiragi K. e outros (Biosci. Biotechnol. Biochem. 62: 347-353(1998)) descrevem a produção da sorbitol oxidase recombinante em *E. coli*. Outras fontes são descritas, por exemplo, na Patente U.S. Nº 5.741.687 e na Patente U.S. Nº 5.472.862 em que é

5 descrito um micro-organismo do solo de Sekigahara-cho, Fuwa-gun, Gifu Prefecture, Japão, do gênero *Xanthomonas*, tal como *Xanthomonas maltophilia* TE3539 (FERM BP-4512). Outros exemplos de poliol oxidases são manitol oxidase (EC 1.1.3.40) dos caracóis *Helix aspersa* e *Arion ater* que catalisa a oxidação de D-arabinitol, D-manitol e, até uma menor extensão, de

10 D-glucitol (sorbitol) e xilitol oxidase (EC 1.1.3.41) de *Streptomyces coelicolor* que oxida a D-xilitol em xilose e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e D-sorbitol em glicose e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A primeira oxidase tal como a poliol oxidase, tal como uma sorbitol ou xilitol oxidase pode ser obtida partindo de uma fonte microbiana tal como uma bactéria ou um fungo. Em particular partindo de bactérias classificadas na classe Actinobacteria e na ordem Actinomycetales.

15

A primeira oxidase tal como a poliol oxidase, tal como uma sorbitol ou xilitol oxidase pode ser obtida partindo de espécies diferentes de *Streptomyces*, *Xanthomonas*, *Brevibacterium*, *Frankia*, *Nocardia*, *Janibacter*, *Burkholderia*, *Paracoccus*, *Chromobacterium*, *Thermobifida*, *Pseudomonas*,

20 *Corynebacterium* e *Bacillus* e homólogos das mesmas.

A primeira oxidase tal como a poliol oxidase, tal como uma sorbitol ou xilitol oxidase pode ser obtida partindo de uma cepa de *Streptomyces*, preferencialmente de uma cepa de *Streptomyces coelicolor* ou *Streptomyces* sp. IKD472 (Yamashita, Mitsuo e outros, Journal of Bioscience and Bioengineering (2000), 89(4), 350-360) e de *Streptomyces* sp. H-7775. (Hiraga, Kazumi e outros, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (1997), 61(10), 1699-1704.).

25

A JP 09206072 descreve uma sorbitol oxidase de *Streptomyces* e seu método de produção e uso, que pode também ser utilizada na presente invenção.

30

A JP 06169764 descreve uma sorbitol oxidase de *Xanthomonas* que também pode ser utilizada na presente invenção.



Em um aspecto da invenção a primeira oxidase tal como a poliol oxidase, tal como a sorbitol oxidase é derivada de uma cepa de *Streptomyces*.

5 Em um aspecto adicional, a primeira enzima, tal como a primeira oxidase tal como a poliol oxidase, por exemplo, a sorbitol oxidase é produzida através de métodos recombinantes.

Em uma modalidade, a primeira enzima/oxidase e a enzima adicional são ativas à temperatura ambiente.

10 Em uma modalidade, a primeira enzima/oxidase e a enzima adicional são ativas na temperatura da boca ou do corpo, tal como aproximadamente 37°C.

Embora seja reconhecido que o versado na técnica dosará a primeira enzima/oxidase em um nível adequado (uma quantidade eficiente) para a finalidade requerida, é imaginado que em uma modalidade a primeira oxidase esteja em um nível entre aproximadamente 0,1 e aproximadamente 200.000 unidades por kg, tal como entre aproximadamente 0,1 e aproximadamente 100.000 unidades por kg, tal como entre aproximadamente 1 e aproximadamente 100.000 unidades por kg, tal como entre aproximadamente 5 e aproximadamente 50.000 unidades por kg, tal como entre aproximadamente 10 e aproximadamente 20.000 unidades por kg, tal como entre aproximadamente 100 e aproximadamente 10.000 unidades por kg. Outras faixas adequadas, para uso em alguma modalidade, incluem entre aproximadamente 10 e aproximadamente 1.000 unidades por kg ou entre aproximadamente 1 e aproximadamente 10.000 unidades por kg.

25 Em uma modalidade, que se refere a uma composição para cuidado oral pode ser utilizada entre 1 e 10000 U (unidades)/100 g da primeira oxidase. Dosagens em torno de 5-20 unidades por 100 g são também consideradas apropriadas para algumas modalidades.

30 Para uso em composições de alimentos humanos e animais, as faixas de dosagens anteriores também podem ser apropriadas.

Em uma modalidade que se refere a uma composição de tinta podem ser utilizadas entre aproximadamente 10 e aproximadamente 10000

U/100 g da primeira oxidase tal como a poliol oxidase. Dosagens em torno de 10-50 unidades por 100 g também são consideradas apropriadas para algumas modalidades.

5 Em uma modalidade que se refere a uma composição cosmética podem ser utilizadas entre aproximadamente 1 e aproximadamente 10000 U/100 g da primeira oxidase tal como a poliol oxidase. Dosagens em torno de 5-20 unidades por 100 g também são consideradas apropriadas para algumas modalidades.

10 Em uma modalidade que se refere a uma composição detergente, podem ser utilizadas entre aproximadamente 0,1 e aproximadamente 10000 U/100 g da primeira oxidase tal como a poliol oxidase. Dosagens em torno de 5-100 unidades por 100 g também são consideradas apropriadas para algumas modalidades.

#### O Segundo Substrato

15 O segundo substrato é capaz de ser convertido pela (pelo menos uma) enzima adicional no produto. O segundo substrato pode ser, preferencialmente, oxidado pela enzima adicional (oxidoredutase adicional) para gerar mais peróxido de hidrogênio e o produto.

20 No presente contexto o termo "segundo substrato" se refere a um substrato que é um resultado da oxidação do primeiro substrato e pode ser convertido pela enzima adicional para formar o produto.

25 Em uma modalidade preferível, o termo "segundo substrato" se refere a um substrato que é um resultado da oxidação do primeiro substrato pela primeira enzima e é oxidável pela oxidoredutase adicional para formar peróxido de hidrogênio e o produto.

O segundo substrato é, em um aspecto, um ou mais açúcares, tais como os açúcares selecionados do grupo que consiste em glicose, xilose, maltose, manose, galactose, isolmaltulose, lactose, arabinose e eritrose.

30 O segundo substrato é, em um aspecto, um ou mais açúcares, tais como os açúcares selecionados do grupo que consiste em ribose, lixose, alose, altrose, gulose, idose e talose.

O segundo substrato pode, portanto, ser ou compreender glico-

se, por exemplo, quando o primeiro substrato for ou compreender sorbitol.

Devido à sinergia notável entre a primeira oxidase tal como a poliol oxidase e a enzima adicional tal como a oxidoredutase adicional, o nível no estado estacionário do segundo substrato é tipicamente baixo. Nos produtos para cuidado oral, assim como para as aplicações de conservantes, por exemplo, em tinta ou cosméticos, o baixo nível do segundo substrato pode ser altamente vantajoso, particularmente quando o segundo substrato for um açúcar que pode ser fermentado ou cariogênico, isto é, compostos que podem favorecer ou 'alimentar' o crescimento de organismos prejudiciais tais como micro-organismo/bactérias (por exemplo, bactérias cariogênicas na cavidade oral) ou algas e estrelas do mar (que se depositam sobre tinta marítima, por exemplo). Portanto, não apenas a invenção fornece uma produção altamente eficiente e volumosa de peróxido de hidrogênio, como pode também fornecer um sistema em que há um nível mínimo de substratos que podem ser fermentados, reduzindo a probabilidade de crescimento indesejável de organismos prejudiciais.

Em uma modalidade, o nível do segundo substrato, que é gerado pela primeira oxidase tal como um ou mais açúcares que podem ser fermentados ou cariogênicos, presente na composição de acordo com a invenção é menor que aproximadamente 50%, tal como menor que aproximadamente 25%, tal como menor que aproximadamente 10%, tal como menor que aproximadamente 5%, tal como menor que aproximadamente 1%, tal como menor que aproximadamente 0,5%, tal como menor que aproximadamente 0,1%, tal como menor que aproximadamente 0,05%, tal como menor que aproximadamente 0,01% do nível (inicial) de poliol presente na composição, que é medido através de uma proporção molar.

Em uma modalidade preferida, o segundo substrato é um açúcar.

Em uma modalidade, o açúcar é uma monossacarídeo hexose, tal como uma hexose selecionada do grupo que consiste em glicose, frutose, galactose, manose, sorbose.

Em uma modalidade, o açúcar é uma monossacarídeo pentose,

tal como uma pentose seleccionada do grupo que consiste em ribose, arabinose, xilose ou lixose.

Em uma modalidade, o açúcar é uma triose tal como aldotriose ou cetotriose.

- 5                    Em uma modalidade, o açúcar é um dissacarídeo tal como sacarose ou maltose.

#### A Enzima Adicional

- 10                    A (pelo menos uma) enzima adicional é caracterizada pelo fato de que é capaz de converter o segundo substrato para a obtenção de um produto.

A enzima adicional não é a mesma enzima ou a entidade enzimática, que a primeira enzima. Entretanto em uma modalidade, a enzima adicional pode ser ligada à primeira enzima, por exemplo, a primeira e as enzimas adicionais podem ser coexpressas na forma de uma poliproteína.

- 15                    A enzima adicional pode ser qualquer enzima que, dentro da composição de acordo com a invenção ou nas aplicações descritas aqui, seja capaz de converter o segundo substrato em um produto, cuja presença não afete de forma prejudicial a produção de peróxido de hidrogênio a partir da oxidação do primeiro substrato pela primeira enzima.

- 20                    Os exemplos de enzimas adicionais adequadas incluem glicose desidrogenase (E.C: 1.1.1.118) que, quando fornecida com NAD<sup>+</sup>, resulta na produção de D-glucono-1,5-lactona + NADH; glicose 1-desidrogenase (E.C: 1.1.1.119) (NADP<sup>+</sup>), que, quando fornecida com NADP<sup>+</sup>, resulta na produção de D-glucono-1,5-lactona + NADPH; glucoquinase (E.C. 2.7.1.2), que  
25                    fosforila o grupo COOH da glicose para produzir glicose-6-fosfato; glucoquinase, que converte D-glicose + D-frutose  $\rightleftharpoons$  D-gluconolactona + D-glucitol.

- Portanto, em uma modalidade, a composição pode compreender compostos adicionais que são utilizados pela enzima adicional com o segundo substrato para produzir o(s) produto(s) - de forma adequada tal composto adicional pode, por exemplo, ser seleccionado do grupo que consiste  
30                    em NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup> ou frutose.

Em um aspecto preferido, a (pelo menos uma) enzima adicional

é uma (pelo menos uma) oxidorredutase adicional (também referida como oxidorredutase).

A oxidorredutase adicional é preferencialmente uma oxidase sem ser uma poliol oxidase. A oxidorredutase adicional não é a poliol oxidase referida aqui dentro do contexto da primeira oxidase.

As oxidorredutases são enzimas que pertencem à classe EC 1.x.x.x. Na presente invenção, as oxidorredutases utilizam um receptor de oxigênio, tal como CH-OH ou um aldeído ou oxo (EC 1.2.3.x).

Em uma modalidade preferida, as oxidorredutases no presente contexto são enzimas que pertencem à classe EC 1.1.3. que atuam com o oxigênio como receptor. Por exemplo, a hexose oxidase (D-hexose:O<sub>2</sub>-oxidorredutase, EC 1.1.3.5) é uma enzima que na presença de oxigênio é capaz de oxidar D-glicose e vários outros açúcares redutores incluindo maltose, lactose e celobiose em suas lactonas correspondentes com a hidrólise subsequente nos respectivos ácidos aldobiônicos após a formação de peróxido de hidrogênio. A oxidação catalisada pela hexose oxidase sobre a glicose e a galactose pode, por exemplo, ser ilustrada como a seguir:



Em um outro aspecto da invenção a oxidorredutase é selecionada uma vez ou mais do grupo que consiste em hexose oxidase, glicose oxidase, carboidrato oxidase e oligossacarídeo oxidase tal como (gluco)oligosacarídeo oxidase. Em um aspecto adicional da invenção, a oxidorredutase é uma ou mais enzimas que catalisam a oxidação de açúcares tais como as selecionadas do grupo que consiste em uma carboidrato oxidase, uma (gluco)oligosacarídeo oxidase, uma piranose oxidase, uma hexose oxidase ou uma glicose oxidase. Em um aspecto adicional da invenção, a oxidorredutase é uma glicose oxidase e/ou uma hexose oxidase. Ainda em um aspecto adicional da invenção, a oxidorredutase é uma hexose oxidase.

Em uma modalidade preferida, a oxidorredutase é um açúcar oxidase, tal como um açúcar-oxidase selecionada do grupo que consiste em: carboidrato oxidase, oligossacarídeo oxidase, maltose oxidase, hexose

oxidase, glicose oxidase, manose oxidase, galactose oxidase, isolmaltulose oxidase, lactose oxidase, arabinose oxidase, eritrose oxidase, pentose oxidase, xilose oxidase, triose oxidase.

Em uma modalidade, a açúcar-oxidase é selecionada do grupo  
5 que consiste em: EC 1.1.3.4 glicose oxidase, EC 1.1.3.5 hexose oxidase, EC 1.1.3.9 galactose oxidase, EC 1.1.3.10 piranose oxidase, EC 1.1.3.11 L-sorbose oxidase e EC 1.1.3.40 D-manitol oxidase.

As oxidases adequadas podem ser identificadas sob o número  
10 de Classificação de Enzima E.C. 1 (Oxidoredutases) de acordo com as recomendações (1992) da International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) que são enzimas que catalisam oxidorreduções, em particular, as oxidases listadas sob E.C. 1.1.3. ou E.C. 1.2.3, isto é, as oxidases atuam sobre o oxigênio molecular ( $O_2$ ) e fornecem peróxido ( $H_2O_2$ ), utilizando CH-OH ou um grupo aldeído ou oxo como um doador.

15 Uma glicose oxidase adequada pode se originar de *Aspergillus* sp., tal como uma cepa de *Aspergillus niger* ou de uma cepa de *Cladosporium* sp., em particular, de *Cladosporium oxysporum*, especialmente *Cl. oxysporum* CBS 163 descrita na WO 95/29996 (da Novo Nordisk A/S).

As hexose oxidases da alga marinha vermelha *Chondrus crispus*  
20 (comumente conhecida como musgo irlandês) (Sullivan e Ikawa, (1973), Biochim. Biophys. Acts, 309, p. 11-22; Ikawa, (1982), Meth. In Enzymol. 89, carbohydrate metabolism parte D, 145-149) oxidam um amplo espectro de carboidratos, tais como D-glicose, D-galactose, maltose, celobiose, lactose, D-glicose 6-fosfato, D-manose, 2-desóxi-D-glucol, 2-desóxi-D-galactose, D-  
25 fucase, ácido D-glucurônico e D-xilose.

Ainda a alga marinha *Iridophycus flaccidum* produz hexose oxidases que podem ser facilmente extraídas, que oxidam vários mono- e dissacarídeos diferentes (Bean e Hassid, (1956), J. Biol. Chem, 218, p. 425; Rand e outros (1-972, J. of Food Science 37, p. 698-710).

30 O espectro amplo de substratos da hexose oxidase é vantajoso em associação com o branqueamento de dentes uma vez que a quantidade total do substrato que pode ser utilizado (isto é, carboidrato) presente na bo-

ca é significativamente maior que para as enzimas relacionadas que possuem propriedades catalíticas mais específicas.

A carboidrato oxidase de *Microdochium nivale* descrita na EP 1041890 atua sobre vários açúcares, incluindo glicose, lactose e xilose assim como sobre oligossacarídeos.

Uma outra oxidorredutase capaz de atuar sobre vários açúcares e oligossacarídeos é obtida partindo de *Acremonium strictum* (Lin e outros Biochemica and Biophysica Acta 118 (1991)). Seu uso nas aplicações de panificação é descrito na JP 11056219.

Outros exemplos de oxidorredutases adequadas são glicose oxidase (EC 1.1.3.4) e galactose oxidase (EC 1.1.3.9).

Em uma modalidade a oxidorredutase é uma ou mais selecionadas do grupo que consiste em uma carboidrato oxidase, uma hexose oxidase ou uma glicose oxidase.

Em uma modalidade, a oxidorredutase é uma hexose oxidase.

Um outro exemplo de uma oxidorredutase adequada é hexose oxidase (HOX) (EC 1.1.3.5) que pode ser obtida através do isolamento da enzima partindo de várias espécies de algas vermelhas tais como *Iridophycus flaccidum* (Bean e Hassid, 1956) e *Chondrus crispus* (Sullivan e outros 1973). Em um aspecto preferido da invenção a HOX é obtida ou preparada como descrito na WO 01/38544. A HOX está disponível na Danisco A/S como DairyHOX®.

A dosagem da oxidorredutase adicional pode estar dentro das mesmas faixas que as referidas para a poliol oxidase anterior, embora seja reconhecido que em uma modalidade um excesso da oxidase adicional é adicionado, como referido aqui.

#### A Composição da Enzima

É preferido que sejam utilizadas as enzimas purificadas, tais como a sorbitol oxidase e/ou a oxidorredutase adicional, isto é, as enzimas são purificadas antes de serem adicionadas à composição da invenção. A pureza da enzima é preferencialmente determinada utilizando SDS-PAGE e densitometria. Uma enzima purificada é pelo menos aproximadamente 20%

pura, tal como pelo menos aproximadamente 30% pura, tal como pelo menos aproximadamente 40% pura, tal como pelo menos aproximadamente 50% pura. É reconhecido que uma enzima purificada pode, entretanto, ser formulada com outras proteínas, por exemplo, misturada com agentes estabilizantes de proteínas tais como BSA ou outras enzimas, a avaliação da pureza da enzima, portanto, exclui as proteínas adicionadas à enzima após a purificação.

A taxa de produção de peróxido de hidrogênio pode ser controlada, por exemplo, através da preparação de uma composição que compreende uma proporção especificada da quantidade eficiente da primeira enzima/oxidase comparada com a da enzima/oxidoreductase adicional. Tipicamente e como mostrado nos exemplos, um excesso crescente da enzima/oxidoreductase adicional resulta na maior taxa de produção de peróxido de hidrogênio.

Em uma modalidade, a quantidade molar do peróxido de hidrogênio total produzido (ou que pode ser produzido), é maior que a quantidade molar do primeiro substrato convertido (ou que pode ser convertido) no segundo substrato ou que a quantidade do primeiro substrato presente. De forma adequada, a quantidade molar de peróxido de hidrogênio produzido (ou que pode ser produzido), é, em uma modalidade, entre mais que 100% e menos que ou igual a 200% da quantidade molar do primeiro substrato convertido (ou que pode ser convertido) no segundo substrato ou a quantidade do primeiro substrato presente. O uso da presente invenção pode, portanto, permitir que até duas moléculas de peróxido de hidrogênio sejam produzidas partindo de um primeiro substrato de sorbitol, quando comparado com o uso de uma enzima sorbitol oxidase isoladamente. Em uma modalidade, a quantidade molar de peróxido de hidrogênio produzida (ou que pode ser produzida) é de até duas vezes a quantidade molar do peróxido de hidrogênio que pode ser produzido partindo de um sistema de poliol oxidase sem uma oxidoreductase adicional.

Em uma modalidade preferida, a quantidade da pelo menos uma enzima/oxidoreductase adicional comparada com a quantidade da primeira

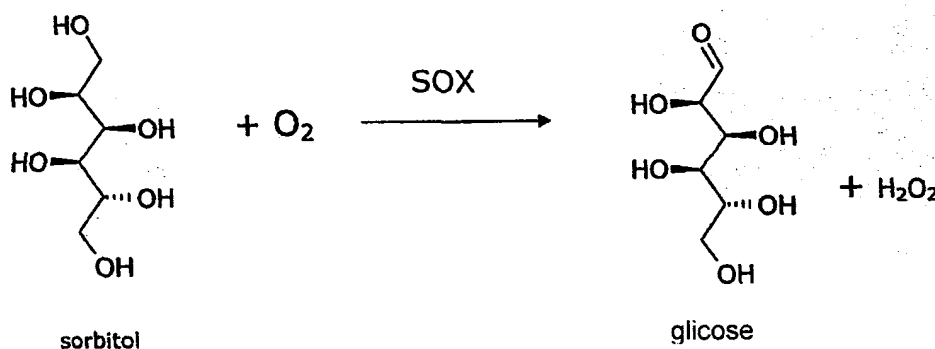


enzima/oxidase, tal como a poliol oxidase (por exemplo, sorbitol oxidase) presente na composição de acordo com a invenção é maior que 1, que é medida pelo número respectivo de unidades da enzima presente na dita composição, tal como maior que aproximadamente 1,5, tal como maior que aproximadamente 2, tal como maior que aproximadamente 3, tal como maior que aproximadamente 5, tal como maior que aproximadamente 10, tal como maior que aproximadamente 20, tal como maior que aproximadamente 50, tal como maior que aproximadamente 100, tal como maior que aproximadamente 150, tal como maior que aproximadamente 200, tal como maior que aproximadamente 300, tal como maior que aproximadamente 500, tal como maior que aproximadamente 1000.

Uma vantagem adicional da composição de acordo com a invenção é a possibilidade de escolher uma combinação de enzimas e substratos que gerem o agente alvejante de peróxido de hidrogênio sem acumular adoçantes ou açúcares cariogênicos como um produto.

Como um exemplo, a SOX catalisa a oxidação de D-sorbitol para produzir 1 mol de D-glicose e 1 mol de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A oxidorredutase, tal como HOX, catalisa a oxidação de D-glicose para produzir 1 mol de ácido D-glucônico e 1 mol de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O uso combinado de SOX e HOX gera assim 2 mols de  $\text{H}_2\text{O}_2$  partindo de 1 mol de substrato da sorbitol oxidase como é ilustrado no esquema a seguir.

O resultado da reação enzimática de SOX é a glicose intermediária, que é cariogênica, mas possui um tempo de vida curto uma vez que é rapidamente convertida em ácido glucônico. Uma vantagem adicional da presente invenção é que apenas um mol de ácido glucônico é formado para cada dois mols de peróxido de hidrogênio.



9

se).

A quantidade de cada enzima presente na composição da invenção ou a quantidade total de enzima presente ou adicionada à composição ou aos produtos (aplicação) que é referida aqui dependerá das enzimas utilizadas e da formulação requerida, mas tipicamente pode variar de aproximadamente 0,0001% até aproximadamente 20%, tal como aproximadamente 0,001% até aproximadamente 10%, tal como aproximadamente 0,005% até aproximadamente 2%, tal como aproximadamente 0,01% até aproximadamente 1% em peso da composição final.

Tipicamente, foi observado que o acoplamento das duas enzimas fornece aproximadamente 200-300% da taxa de produção de peróxido de hidrogênio comparado com um sistema de primeira enzima/primeiro substrato isoladamente. Embora melhorias consideráveis no peróxido de hidrogênio tenham sido obtidas utilizando uma unidade equivalente à dose unitária tanto da poliol oxidase (tal como sorbitol oxidase) quanto da oxidoredutase adicional tal como hexose ou glicose oxidase, a sinergia foi adicionalmente aumentada através da adição de um excesso da oxidoredutase adicional à composição, resultando em mais peróxido de hidrogênio produzido e a uma taxa maior.

Em um aspecto da invenção, a composição compreende uma sorbitol oxidase e uma hexose oxidase e como o primeiro substrato D-sorbitol.

Em um outro aspecto da invenção, a composição compreende uma sorbitol oxidase e uma glicose oxidase e como o primeiro substrato D-sorbitol.

Em uma modalidade, tal como quando a oxidoredutase adicional é HOX, a poliol oxidase, tal como sorbitol ou xilitol oxidase pode catalisar a oxidação de D-xilitol para fornecer 1 mol de xilose e 1 mol de  $H_2O_2$ . Isto pode ser particularmente vantajoso na modalidade em que há um poliol alternativo sem ser xilitol, tal como sorbitol, em que devido à baixa atividade da HOX sobre a xilose, a xilose irá se acumular. A xilose é um composto pré-biótico. Assim, tais composições podem ser utilizadas nas composições

de alimentos humanos e animais ou em um medicamento ou na preparação de uma composição de alimento humano ou animal ou de um medicamento, para aumentar o conteúdo de xilose, enquanto também são obtidos os outros efeitos benéficos da invenção.

- 5                   O uso de poliol oxidase, tal como sorbitol oxidase ou xilitol oxidase e um poliol, tal como D-xilitol ou sorbitol, possui a vantagem de que o efeito antimicrobiano e/ou alvejante pelo  $H_2O_2$  é obtido utilizando ingredientes não tóxicos e a adição de compostos cariogênicos tais como açúcar é evitada.

10    A Matriz de Composição

A composição de acordo com a invenção pode, de forma adequada, compreender outros materiais tipicamente utilizados nos produtos e nas aplicações referidos aqui ou em outras aplicações/produtos adequados.

- 15                   Os materiais de matriz são, de forma adequada, selecionados para garantir a compatibilidade com as enzimas utilizadas na composição para permitir que uma quantidade eficiente das enzimas seja utilizada.

O Produto

- 20                   Como descrito anteriormente, uma modalidade preferida é quando a ação da enzima adicional sobre o segundo substrato gera mais peróxido de hidrogênio e um produto. O produto é, portanto, outro sem ser o peróxido de hidrogênio.

Em uma modalidade, o produto obtido pela ação da enzima adicional sobre o segundo substrato pode ser mais que um único produto, isto é, podem ser produtos.

- 25                   O acúmulo do produto na composição da invenção ou nas aplicações descritas aqui, preferencialmente não afeta negativamente a taxa de produção de peróxido de hidrogênio a partir da conversão do primeiro substrato pela primeira enzima. Na verdade, como os presentes inventores descobriram, a conversão do segundo substrato no produto remove eficientemente o segundo substrato que não somente aumenta enormemente a taxa de produção de peróxido de hidrogênio afetando a atividade da primeira en-  
30                   zima sobre o primeiro substrato, mas também reduz o acúmulo indesejável

possível do segundo substrato.

Em uma modalidade preferida, o produto é obtido através da oxidação do segundo substrato pela oxidorreductase adicional e pode, por exemplo, ser uma lactona (oxidação em C1), uma dialdose (oxidação em C5 para pentoses, em C6 para hexose etc). Um exemplo é a D-galactohexadialdose produzida pela galactose oxidase ou um desidro-açúcar se a oxidação ocorrer em qualquer outra posição no meio da cadeia do açúcar. Um exemplo adicional é a 2-desidro-D-glicose produzida pela piranose oxidase através da oxidação da glicose em C2.

O produto pode ser selecionado do grupo que consiste em D-glucono-1,5-lactona, D-xilono-1,5-lactona, D-maltono-1,5-lactona, D-manono-1,5-lactona, D-galactono-1,5-lactona, D-hexadialdose, D-lactono-1,5-lactona, D-arabono-1,5-lactona, D-eritrano-1,5-lactona, D-ribono-1,5-lactona, D-lixono-1,5-lactona, D-alono-1,5-lactona, D-altrono-1,5-lactona, D-gulono-1,5-lactona, D-idono-1,5-lactona, D-talono-1,5-lactona e a lactona de isomaltulose e possivelmente mais alguns produtos provenientes da oxidação da galactose oxidase na posição C6 de açúcares.

### Definições

A não ser que seja indicado de outra maneira, a prática da presente invenção envolve técnicas convencionais comumente utilizadas na biologia molecular, na microbiologia, na purificação de proteínas, na engenharia de proteínas, no sequenciamento de proteínas e de DNA, nos campos do DNA recombinante e no uso e no desenvolvimento de enzimas industriais, dos quais todos estão dentro da perícia da técnica.

A não ser que seja definido de outra maneira aqui, todos os termos técnicos e científicos utilizados aqui possuem o mesmo significado que é comumente entendido por um versado na técnica à qual esta invenção se refere. Por exemplo, Singleton e Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2<sup>a</sup> Ed., John Wiley and Sons, NY (1994); e Hale e Margham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991) fornecem a tais versados na técnica dicionários gerais de muitos dos termos utilizados na invenção. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou

equivalentes aos descritos aqui encontrem uso na prática da presente invenção, os métodos e os materiais preferidos são descritos aqui. Consequentemente, os termos definidos imediatamente abaixo são mais completamente descritos com referência ao Relatório Descritivo como um todo. Ainda, como  
5 utilizado aqui, os termos no singular "um", "uma", "o" e "a" incluem a referência no plural a não ser que o contexto indique claramente de outra maneira. A não ser que seja indicado de outra maneira, os ácidos nucleicos são escritos da esquerda para a direita na orientação 5' a 3'; as sequências de aminoácidos são escritas da esquerda para a direita na orientação amino a car-  
10 bóxi, respectivamente. Deve ser entendido que esta invenção não está limitada à metodologia, aos protocolos e aos reagentes particulares descritos, uma vez que estes podem variar, dependendo do contexto que são utilizados pelos versados na técnica.

É pretendido que cada limite numérico máximo fornecido ao longo de todo este relatório descritivo inclua cada limite numérico inferior, como  
15 se tais limites numéricos inferiores fossem especialmente escritos aqui. Cada limite numérico mínimo fornecido ao longo de todo este relatório descritivo incluirá cada limite numérico máximo, como se tais limites numéricos máximos fossem especialmente escritos aqui. Cada faixa numérica fornecida ao  
20 longo de todo este relatório descritivo incluirá cada faixa numérica mais limitada que se encaixa dentro de tal faixa numérica mais ampla, como se tais faixas numéricas mais limitadas fossem todas especialmente escritas aqui.

Quando se faz referência a um "respectivo substrato de poliol" de uma enzima, isso se refere ao substrato que a enzima utiliza, por exemplo, o respectivo substrato da sorbitol oxidase é o sorbitol e o respectivo  
25 substrato da xilitol oxidase é o xilitol.

Como utilizado aqui, o termo "compatível", significa que os materiais de matriz da composição (outros ingredientes) não reduzem a atividade enzimática da(s) enzima(s) oxidase(s) fornecida(s) aqui até tal extensão que  
30 a(s) oxidases(s) não é/são eficiente(s) quando desejado durante situações de usos normais. Os materiais da composição de limpeza específicos são exemplificados em detalhes posteriormente aqui.

Como utilizado aqui, "quantidade eficiente de enzima" se refere à quantidade de enzima necessária para atingir a atividade enzimática requerida na aplicação específica. Tais quantidades eficazes são facilmente determinadas por um versado na técnica e são baseadas em muitos fatores, tais como a variação de enzima particular utilizada, a aplicação de limpeza, a composição específica da composição de limpeza e se uma composição líquida ou seca (por exemplo, granular) é necessária e similares.

A homologia de aminoácidos e de polinucleotídeos pode ser determinada utilizando o algoritmo ClustalW utilizando os ajustes padronizados: ver <http://www.ebi.ac.uk/emboss/alian/index.html>, Método: EMBOSS: água (local): Abertura do Espaço = 10,0, Extensão do espaço = 0,5, utilizando Blosun 62 (proteína) ou DNAsfull para sequências de nucleotídeos.

É preferível que quando se faz referência a "o segundo substrato pode ser convertido por pelo menos uma enzima adicional para formar um produto", que o segundo substrato é oxidável pela enzima adicional (oxidoreductase) para formar peróxido de hidrogênio e um (o) produto.

O termo "variante(s)" como utilizado aqui no contexto de um polipeptídeo (sequência), tal como a SEQ ID NO 1 e a SEQ ID NO 2 se refere a um polipeptídeo que é preparado partindo do polipeptídeo original (parental) ou utilizando a informação de sequência do polipeptídeo, através da inserção, da deleção ou da substituição de um ou mais aminoácidos na dita sequência, isto é, pelo menos um aminoácido, mas preferencialmente menos que aproximadamente 50 aminoácidos, tal como menos que aproximadamente 40, menos que aproximadamente 30, menos que aproximadamente 20 ou menos que aproximadamente 10 aminoácidos, tal como 1 aminoácido, 1-2 aminoácidos, 1-3 aminoácidos, 1-4 aminoácidos, 1-5 aminoácidos.

O termo "homólogo(s)" como utilizado aqui no contexto de uma sequência de polipeptídeo, tal como a SEQ ID NO 1 e a SEQ ID NO 2 se refere a um polipeptídeo que é pelo menos aproximadamente 70% homólogo, tal como pelo menos aproximadamente 80% homólogo, tal como pelo menos aproximadamente 85% homólogo ou pelo menos aproximadamente 90% homólogo, tal como pelo menos aproximadamente 95%, aproximada-

mente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98% ou aproximadamente 99% homólogo à dita sequência de polipeptídeo. A homologia entre duas sequências de polipeptídeos pode ser determinada utilizando o algoritmo de alinhamento ClustalW utilizando os ajustes padronizados, que são referidos aqui.

O termo "fragmento(s)" como utilizado aqui no contexto de uma sequência de polipeptídeo, tal como a SEQ ID NO 1 e a SEQ ID NO 2 se refere a um polipeptídeo que consiste em apenas uma parte da sequência de polipeptídeo. Um fragmento pode, portanto, compreender ou consistir em pelo menos aproximadamente 50%, tal como pelo menos aproximadamente 60%, tal como pelo menos aproximadamente 70%, tal como pelo menos aproximadamente 80%, tal como pelo menos aproximadamente 90% ou tal como pelo menos aproximadamente 95% da dita sequência de polipeptídeo.

A variante, o homólogo e o fragmento de acordo com a invenção mantêm, todos, pelo menos parte da atividade enzimática desejada (para a finalidade da presente invenção) da enzima original, tal como pelo menos aproximadamente 10%, pelo menos aproximadamente 20%, pelo menos aproximadamente 30%, pelo menos aproximadamente 40%, pelo menos aproximadamente 50%, pelo menos aproximadamente 60%, pelo menos aproximadamente 70%, pelo menos aproximadamente 80% pelo menos aproximadamente 90% ou toda a atividade enzimática da enzima original.

Será reconhecido pelo versado na técnica que quando são identificadas as enzimas preferidas para uso na composição e nos métodos da invenção por suas SEQ IDs específicas, estas incluem enzimas que são derivadas dos ácidos nucleicos que codificam as SEQ IDs dos aminoácidos correspondentes quando expressos, em sua espécie hospedeira nativa ou em uma espécie hospedeira heteróloga e de forma que as enzimas possam ser processadas co- ou pós-tradução.

O termo "aproximadamente" como utilizado aqui para se referir a concentrações, atividades e condições etc. inclui e descreve especificamente os valores exatos e as faixas exatas referidas às mesmas.

O termo "poliol" como utilizado aqui se refere a um álcool de a-



çúcar que compreende mais de um grupo hidroxila. O poliol é um termo distinto de açúcar uma vez que os polióis contêm apenas grupos hidroxila (COH) e pertencem ao grupo geral alditóis, enquanto que os açúcares possuem grupos carbonila (COOH).

5 Os dissacarídeos e os monossacarídeos podem ambos formar álcoois de açúcar; entretanto, os álcoois de açúcar derivados de dissacarídeos (por exemplo, Maltitol e lactitol) não são totalmente hidrogenados porque apenas um grupo aldeído está disponível para redução. Em uma modalidade, o álcool de açúcar está completamente hidrogenado.

10 Os álcoois de açúcar são comumente adicionados aos alimentos por causa de seu menor teor calórico que os açúcares; entretanto, são também geralmente menos doces e são frequentemente combinados com adoçantes de alta intensidade. Estes também são adicionados à goma de mascar porque não são metabolizados (isto é, quebrados) por bactérias na boca, então não contribuem para a formação de cáries. O maltitol, o sorbitol e o isomalte são alguns dos tipos mais comuns. Os álcoois de açúcar podem ser formados sob condições redutoras suaves partindo de seus açúcares análogos.

Como utilizado aqui, o termo "oxidase" se refere a enzimas que catalisam uma reação de oxidação/redução que envolve o oxigênio molecular ( $O_2$ ) como o receptor de elétrons. Nestas reações, o oxigênio é reduzido em água ( $H_2O$ ) ou peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). As oxidases constituem uma subclasse das oxidoredutases.

O termo "poliol oxidase" se refere a uma enzima que é capaz de oxidar um poliol no açúcar correspondente. A oxidação do poliol pela ação da poliol oxidase resulta na produção de peróxido de hidrogênio.

Como utilizado aqui, o termo "glicose oxidase" ("Gox") se refere à enzima oxidase (EC 1.1.3.4) que se liga à beta-D-glicose (isto é, um isômero de açúcar com seis carbonos, glicose) e ajuda na quebra do açúcar em seus metabólitos. A GOx é uma proteína dimérica que catalisa a oxidação da beta-D-glicose em D-glucono-1,5-lactona, que então hidrolisa em ácido glu-  
cônico com a redução concomitante do oxigênio molecular em peróxido de

hidrogênio.

Como utilizado aqui, o termo "álcool oxidase" ("Aox") se refere à enzima oxidase (EC 5 1.1.3.13) que converte um álcool em um aldeído com a redução concomitante do oxigênio molecular em peróxido de hidrogênio.

5                Como utilizado aqui, o termo "colina oxidase" ("Cox") se refere a uma enzima oxidase (EC 1.1.3.17) que catalisa a oxidação de quatro elétrons da colina em glicina betáina, com o aldeído de betáina como um intermediário com a redução concomitante de duas moléculas do oxigênio molecular em duas moléculas de peróxido de hidrogênio.

10              Como utilizado aqui, o termo "hexose oxidase" ("Hox") se refere a uma enzima oxidase (EC 1.1.3.5) que catalisa a oxidação de mono- e dissacarídeos em suas lactonas correspondentes, com a redução concomitante do oxigênio molecular em peróxido de hidrogênio. A hexose oxidase é capaz de oxidar uma variedade de substratos incluindo D-glicose, D-galactose,  
15              maltose, celobiose e lactose etc.

                Como utilizado aqui, "glicerol oxidase" se refere a uma enzima oxidase (EC 1.1.3.) que catalisa a oxidação do glicerol em gliceraldeído, com a redução concomitante do oxigênio molecular em peróxido de hidrogênio.

                É reconhecido que a atividade de uma enzima dependerá das  
20              condições e dos substratos disponíveis e, portanto, a atividade de uma enzima pode diferir de uma condição de ensaio padronizado (ensaio *in vitro*), quando comparada àquela dentro da composição de acordo com a invenção ou ao uso de tal composição na aplicação desejada. Em uma modalidade, a atividade enzimática é determinada através de um ensaio *in vitro* como referido nos exemplos. Alternativamente, a atividade de uma enzima é determi-  
25              nada *in situ*, isto é, na composição de acordo com a invenção e sob as condições em que a composição será utilizada. Os mesmos métodos analíticos podem ser utilizados para a determinação da atividade enzimática *in situ* assim como para a atividade *in vitro*, o mesmo ensaio é realizado utilizando  
30              a matriz da composição ou sob as condições em que a composição/o produto de acordo com a invenção é utilizado.

                O termo "açúcar" como utilizado aqui se refere a monossacári-

deos, dissacarídeos e oligossacarídeos, hexose, tais como açúcares selecionados do grupo que consiste em lactose, maltose, sorbose, triose, pentose, hexose, manose, glicose, galactose, xilose, frutose, isomaltose, eritrose.

Os açúcares contêm grupos aldeído (-CHO) ou grupos cetona (C=O), em que há ligações duplas de carbono-oxigênio, tornando os açúcares reativos. Preferencialmente, o termo açúcar está conforme a  $(CH_2O)_n$  em que n fica entre 3 e 6, tal como 3, 5 ou 6 ou 5 ou 6.

Os açúcares podem ser trioses, pentose ou hexose, preferencialmente açúcares pentose ou hexose, preferencialmente na forma de cadeia fechada.

O açúcar pode ser selecionado do grupo que consiste em: sacarose, frutose, glicose, galactose, maltose, lactose e manose.

Por "produto para cuidado oral" como utilizado aqui entende-se um produto que não é intencionalmente engolido para as finalidades de administração sistêmica de agentes terapêuticos, mas é mantido na cavidade oral durante um período de tempo suficiente para entrar em contato com substancialmente todas as superfícies dentais e/ou tecidos da mucosa oral com a finalidade de atividade oral. No contexto da presente invenção, o produto para cuidado oral inclui ainda produtos para a limpeza de dentaduras, dentes artificiais e similares. O produto para cuidado oral pode ter qualquer forma física adequada tal como, por exemplo, pó, pasta, gel, líquido, unguento, tablete de goma de mascar ou spray.

Como utilizado aqui, "composições para limpeza" e "formulações para limpeza" se referem a composições que encontram uso na remoção de compostos indesejados de itens que serão limpos, tais como tecido, louça, lentes de contato, outros substratos sólidos, cabelos (xampu), pele (sabonetes e cremes), dentes (líquidos para limpeza bucal, pastas de dentes) etc. O termo abrange quaisquer materiais/compostos selecionados para o tipo particular de composição para limpeza desejado e a forma do produto (por exemplo, composição líquida, em gel, em grânulos ou em spray), contanto que a composição seja compatível com a oxidase e outra(s) enzima(s) utilizada(s) na composição e quaisquer inibidores reversíveis da enzima na

composição. A seleção específica de materiais para composições para limpeza é facilmente feita considerando a superfície, o item ou o tecido que será limpo e a forma da composição para as condições de limpeza durante o uso.

- 5 Os termos se referem ainda a qualquer composição que seja adequada para a limpeza, o branqueamento, a desinfecção e/ou a esterilização de qualquer objeto e/ou superfície. É pretendido que os termos incluam, mas não estejam limitados às composições detergentes (por exemplo, detergentes para roupas líquidos e/ou sólidos e detergentes para tecidos finos;
- 10 formulações para limpeza de superfícies duras, tais como para vidro, madeira, cerâmica e superfícies de balcões de metal e janelas; produtos de limpeza para tapetes; produtos de limpeza para fornos; agentes de renovação de tecidos; amaciantes de tecidos; e produtos para limpar manchas pré-lavagem para tecidos e lavanderia, assim como detergentes para louça).
- 15 Na verdade, o termo "composição para limpeza" como utilizado aqui, inclui, a não ser que seja indicado de outra maneira, agentes de lavagem para todas as finalidades ou para trabalho pesado na forma de pó, especialmente detergentes para limpeza; agentes para lavagem para todas as finalidades na forma líquida, de gel ou de pasta, especialmente os assim
- 20 chamados tipos líquidos para trabalho pesado (HDL); detergentes líquidos para tecidos finos; agentes para lavagem de louça manual ou agentes para lavagem de louça para trabalho leve, especialmente aqueles do tipo com alta formação de espuma; agentes para lavagem de louça na máquina, incluindo os vários tipos em tablete, granulares, líquidos e agentes auxiliares de
- 25 enxágue para uso na limpeza doméstica e institucional; agentes de limpeza e desinfetantes líquidos, incluindo os tipos antibacterianos para lavagem das mãos, barras para limpeza, líquidos para limpeza bucal, produtos para limpeza de dentaduras, xampus para carros ou tapetes, produtos para limpeza de banheiros; xampus para cabelos e cremes rinses; géis para banho e es-
- 30 pumas para banheira e produtos para limpeza de metais; assim como agentes auxiliares de limpeza tais como aditivos de branqueamento e os tipos "removedores de manchas" ou pré-tratamento.

Como utilizado aqui, os termos "composição detergente" e "formulação detergente" são utilizados em referência às misturas que são pretendidas para uso em um meio de lavagem para a limpeza de objetos sujos. Em algumas modalidades preferidas, o termo é utilizado em referência aos tecidos de lavanderia e/ou artigos de vestuário (por exemplo, "detergentes para lavagem de roupas"). Em modalidades alternativas, o termo se refere a outros detergentes, tais como os utilizados para lavar louças, talheres etc. (por exemplo, "detergentes para lavagem de louças"). Não é pretendido que a presente invenção seja limitada a qualquer formulação ou composição detergente particular. Na verdade, é pretendido que em adição à oxidase, o termo abranja detergentes que contêm tensoativos, transferase(s), enzimas hidrolíticas, oxidoredutases, per-hidrolases, reforçadores de detergência, agentes alvejantes, ativadores de branqueamento, agentes azulantes e corantes fluorescentes, inibidores de formação de torta, agentes de mascaramento, ativadores de enzimas, inibidores de enzimas, antioxidantes e solubilizantes. Em algumas modalidades preferidas, as formulações detergentes incluem, mas não estão limitadas às apresentadas nos Pedidos de Patentes U.S. Nºs de Série 10/576.331 e 10/581.014, assim como a WO 05/52161 e a WO 05/056782 encontram uso na presente invenção. Entretanto, não é pretendido que a presente invenção seja limitada a qualquer(qualsquer) formulação(ões) detergente(s) particular(es), uma vez que qualquer formulação detergente adequada encontra uso na presente invenção.

Como utilizado aqui, "composição para lavagem de louças" se refere a todas as formas de composições para limpeza de louças, incluindo talheres, que incluem, mas não estão limitadas às formas granulares e líquidas. Não é pretendido que a presente invenção seja limitada a qualquer tipo particular ou composição para louças. Na verdade, a presente invenção encontra uso na limpeza de louças (por exemplo, louças, incluindo, mas não limitadas a pratos, copos, tigelas etc.) e talheres (por exemplo, utensílios, incluindo, mas não limitados a colheres, facas, garfos, utensílio para servir etc.) de qualquer material, incluindo, mas não limitado a louças, plástico, metais, porcelana, vidro, acrílico etc. O termo "louça" é utilizado aqui em refe-

rência tanto a pratos quanto a talheres.

Como utilizado aqui, "desempenho de lavagem" de uma enzima se refere à contribuição de uma enzima à lavagem que fornece desempenho de limpeza adicional ao detergente sem a adição da enzima na composição.

- 5 O desempenho de lavagem é comparado sob condições de lavagem relevantes.

O termo "condições de lavagem relevantes" é utilizado aqui para indicar as condições, particularmente a temperatura de lavagem, o tempo, mecânica da lavagem, concentração de espuma, tipo de detergente e dureza da água, realmente utilizados nas limpezas domésticas em um segmento do mercado de detergente.

O termo "maior desempenho de lavagem" é utilizado para indicar que um melhor resultado final é obtido na remoção de manchas dos itens lavados (por exemplo, tecidos ou louças e/ou talheres) sob condições de lavagem relevantes ou que menos enzima, em uma base em peso, é necessária para a obtenção do mesmo resultado final em relação a uma outra enzima.

O termo "desempenho de lavagem mantido" é indicado para indicar que o desempenho de lavagem de uma enzima, em uma base em peso, é de pelo menos 80% em relação a uma outra enzima sob condições de lavagem relevantes.

O desempenho de lavagem de enzimas é convenientemente medido pela sua capacidade de remover certas manchas representativas sob condições de teste apropriadas. Nestes sistemas de teste, outros fatores relevantes, tais como a composição do detergente, a concentração de espuma, a dureza da água, mecânica da lavagem, o tempo, o pH e/ou a temperatura, podem ser controlados de tal maneira que as condições típicas para a aplicação de limpeza doméstica em um certo segmento de mercado sejam imitadas.

30 Como utilizado aqui, o termo "desinfetante" se refere à remoção de contaminantes das superfícies, assim como à inibição ou à morte de micro-organismos sobre as superfícies dos itens. Não é pretendido que a pre-

sente invenção seja limitada a qualquer superfície, item ou contaminante(s) ou micro-organismos particulares que serão removidos.

### Controle da reação

5 Ambas as reações de oxidação requerem a presença de oxigênio e assim não ocorreriam em um grau significativo contanto que a composição seja mantida em um recipiente selado, tal como em um ambiente com oxigênio controlado (ambiente com oxigênio limitado), tal como na exclusão da limitação ou na ausência de oxigênio molecular. Uma vez que o recipiente é aberto e a composição é submetida ao ar atmosférico ou a uma fonte  
10 alternativa de oxigênio molecular, a reação pode ocorrer.

A invenção fornece, portanto, ainda um produto embalado que compreende a composição da invenção, em que a composição é mantida em um ambiente com oxigênio controlado ou em um ambiente com oxigênio limitado, tal como na ausência de oxigênio molecular (disponível), de forma a  
15 prevenir ou reduzir a produção de peróxido de hidrogênio dentro do dito produto embalado.

Um método alternativo é o fornecimento da composição da invenção em um ambiente com água controlada, em que o nível de água seja suficientemente baixo para prevenir ou reduzir a produção de peróxido de  
20 hidrogênio dentro da composição ou de um produto embalado. De forma adequada o nível de água em tal composição pode ser menor que aproximadamente 2%, tal como menor que aproximadamente 1%, tal como menor que aproximadamente 0,5%, tal como menor que aproximadamente 0,2% ou menor que aproximadamente 0,1%.

25 Alternativamente a reação pode ser prevenida de ocorrer prematuramente separando fisicamente os componentes de enzima e de substrato um dos outros através de métodos de compartimentalização bem-conhecidos na arte. Em uma modalidade, a reação é prevenida através da separação do primeiro substrato do compartimento da composição compreendendo  
30 a primeira oxidase e a oxidoredutase adicional. O primeiro substrato pode ser adicionado para ativar a composição ou pode fazer parte da matriz de aplicação, na forma de um ingrediente de rotina da dita matriz de aplicação

antes, durante ou depois da adição da composição. A invenção fornece, portanto, ainda uma primeira composição que compreende a primeira oxidase (tal como a poliol oxidase) e a oxidoredutase adicional, como referido aqui, em um kit de partes, com uma composição adicional compreendendo o dito primeiro substrato, em que as ditas primeira e segunda composições são separadas uma da outra.

Embora seja imaginado que a composição da invenção pode ser fornecida na forma de dois ou mais sistemas de reator, para combinação no uso, é também considerado que tecnologias tais como encapsulamento ou microencapsulamento podem ser empregadas para manter o componente de enzima da composição separado dos substratos. A liberação das microcápsulas pode ser ativada, por exemplo, através de força mecânica ou diluição no uso da composição da invenção.

Em um aspecto, a composição de acordo com a invenção compreende um kit de partes compreendendo pelo menos dois recipientes, em que o primeiro recipiente compreende a primeira oxidase e a oxidoredutase adicional e um segundo recipiente que compreende o primeiro substrato.

Nas aplicações descritas aqui, tais como nas aplicações cosméticas (também na aplicação para cuidado oral), em uma modalidade é vantajoso compartimentalizar a composição da invenção, de forma que a produção de peróxido de hidrogênio seja conseguida na aplicação, por exemplo, por fricção mecânica permitindo a liberação do sistema enzimático e deixando que este entre em contato com o primeiro substrato *in situ* durante a aplicação, mas não durante o armazenamento.

Em um aspecto da invenção, o pH da composição fica entre 5 e 9, preferencialmente entre 6 e 8. Quando a composição de acordo com a invenção for um produto para cuidado oral é preferido utilizar a primeira oxidase tal como uma poliol oxidase, tal como SOX e uma oxidoredutase, que é substancialmente ativa no pH prevalecente na boca, isto é, em um pH entre (aproximadamente) 5 e (aproximadamente) 9, preferencialmente entre aproximadamente 6 e aproximadamente 8. É, além disso, preferido que a primeira oxidase tal como a poliol oxidase, tal como a sorbitol oxidase e a



oxidorreductase sejam ativas à temperatura ambiente ou à temperatura corporal.

Em uma modalidade, a primeira oxidase e/ou a oxidorreductase adicional e quaisquer outras enzimas presentes podem ser imobilizadas.

#### 5 Enzimas Adicionais e sistemas enzimáticos

A composição de acordo com a invenção pode compreender enzimas adicionais tais como uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste em: peroxidases tais como lactoperoxidase, laccases, amiloglucosidase, amilases tais como amilases maltogênicas e não maltogênicas, tais como Novamil®, glucoamilase, dextranase, protease, lisozime, mutanase, lipase, acil-transferase, tais como as acil-transferases descritas na WO2004064537 e xilanase.

Em uma modalidade, a composição da invenção, tal como a composição oral da invenção ou composições alternativas que são referidas aqui, compreendem tiocianato, permitindo assim a conversão do tiocianato em hipotiocianato devido à produção de peróxido de hidrogênio. Para os produtos para cuidado oral, há, tipicamente, lactoperoxidase suficiente presente na saliva na boca para converter tiocianato em hipotiocianato na presença de peróxido de hidrogênio. Entretanto, a composição de acordo com a invenção também pode compreender lactoperoxidase, para facilitar esta conversão, permitindo assim a produção de um agente antibacteriano eficiente *in situ*.

É reconhecido que a taxa da liberação de peróxido de hidrogênio pode ficar limitada se a disponibilidade de oxigênio for limitante. É, portanto, considerado que o acoplamento do presente sistema enzimático a um sistema de produção de oxigênio pode ser apropriado.

#### Aplicações

A composição de acordo com a invenção pode ser utilizada para tratar qualquer tipo de material em que o branqueamento e/ou o alveijamento seja desejado, por exemplo, dentes, papel e tecidos.

Uma vantagem do uso desta combinação de enzimas para alvejar e/ou branquear é que o efeito alvejante e/ou alvejante é obtido através do

uso de materiais não prejudiciais comparados com o uso anterior de agentes alvejantes, por exemplo, nos produtos para cuidado oral.

A composição de acordo com a invenção possui, além disso, um efeito antimicrobiano causado pelo peróxido de hidrogênio resultante. Um  
5 aspecto adicional da invenção se refere ao uso da composição de acordo com a invenção na fabricação de um produto para cuidado oral para o tratamento ou para a prevenção de efeitos microbianos que se relacionam ao mau hálito ou à periodontite.

Outros usos benéficos da presente composição são na conservação de alimentos em que a composição atua como um absorvedor de oxigênio utilizando dois mols de  $O_2$  toda vez que um mol de açúcar for utilizado.  
10

Na área de cuidados pessoais, a composição da presente invenção pode ser adicionada à pasta de dentes, em particular, que clareiam os dentes, às soluções para limpeza bucal, aos produtos de limpeza de dentaduras, a sabão líquido, aos cremes e às loções para cuidado da pele, às  
15 formulações para cuidado dos cabelos e para o cuidado do corpo e às soluções para limpeza de lentes de contato em uma quantidade eficiente para atuar como um agente antibacteriano. A composição da presente invenção pode ainda ser um componente de uma composição detergente para roupas ou de uma composição detergente para lavagem de louças e pode ser utilizada como uma fonte de peróxido de hidrogênio. A composição detergente para roupas pode compreender um tensoativo, a dita composição da presente invenção. A composição detergente para lavagem de louças pode compreender a dita composição da presente invenção e um precursor de alvejamento ou peroxiácido. A composição da presente invenção pode ser particularmente útil para a remoção de manchas.  
20  
25

#### Detergentes

O detergente (produto) de acordo com a invenção compreende a composição de acordo com a invenção. Portanto, em uma modalidade a invenção fornece o uso da composição da invenção em um produto detergente, tal como uma composição para limpeza, uma formulação para limpeza,  
30 uma composição detergente ou uma formulação detergente.

O detergente (produto) pode ser utilizado como um agente alvejante ou alvejante ou pode ser utilizado como um agente desinfetante ou tanto um agente alvejante/alvejante quanto desinfetante.

5 O detergente (produto) pode compreender enzimas adicionais ou sistemas enzimáticos, como descrito aqui, em particular, peroxidases, proteases, amilases, lipases, acil-transferases e lactoperoxidases (opcionalmente na presença de tiocianato).

Em uma modalidade, o produto detergente pode estar na forma de uma composição para limpeza ou de uma formulação para limpeza.

10 Em uma modalidade, o produto detergente pode estar na forma de uma composição detergente ou de uma formulação detergente.

O produto detergente pode ser uma composição para lavagem de louças.

15 Preferencialmente, o produto detergente de acordo com a invenção possui um maior desempenho de lavagem, sob as condições de lavagem relevantes, quando comparado com um produto equivalente que não compreende a composição da invenção.

20 Em algumas modalidades, as formulações detergentes que compreendem a composição da invenção e um agente de reforço do alvejamento são utilizadas para produzir espécies de oxigênio ativas no líquido de lavagem de roupas para alvejar as manchas.

25 Em algumas modalidades, a composição detergente compreende ainda uma acil-transferase e seu substrato e é utilizada para produzir espécies de oxigênio ativas no líquido de lavagem de roupas para alvejar as manchas.

Em um aspecto, a composição é uma composição comestível, tal como uma composição para cuidado oral, uma composição para medicamento (administrada de forma oral) ou uma composição de alimento humano e animal.

30 O termo 'composição comestível' se refere a composições que são para administração oral ou para consumo através da cavidade oral.

As composições comestíveis podem compreender um ou mais

agentes aromatizantes, conservantes, ingredientes para obtenção de textura, emulsificantes, adoçantes, umectantes e/ou agentes de ligação que (tipicamente) foram aprovados para o consumo humano (ou de animais).

#### Cuidado Oral

5                   Em um aspecto da invenção, é fornecido um produto para cuidado oral que compreende uma composição de acordo com a invenção e ingredientes utilizados nos produtos para cuidado oral.

                  Em um aspecto adicional da invenção, é fornecido o produto para cuidado oral de acordo com a invenção compreende uma primeira enzima, tal como uma poliol oxidase, tal como a sorbitol oxidase, uma enzima adicional, tal como uma oxidoredutase adicional e um poliol, tal como sorbitol e ingredientes utilizados nos produtos para cuidado oral em que o efeito antimicrobiano e/ou alvejante e/ou alvejante é desejado.

10

                  Os exemplos de produtos para cuidado oral incluem pasta de dentes, creme dental, gel ou pó dental, odôntico, colutórios, sprays bucais, formulações pré- ou pós-escovação, goma de mascar, pastilhas e bala.

15

                  O produto para cuidado oral pode compreender ainda ingredientes ativos tais como tiocianato, gluconato de zinco, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase e amiloglucosidase. Os ingredientes adicionais estão listados na WO97/06775 e incluem mediadores redox.

20

                  Em uma modalidade, a composição para cuidado oral/produto de acordo com a invenção compreende ainda fluoreto.

                  As pastas de dentes e os géis dentais incluem tipicamente ingredientes tais como materiais de polimento abrasivo, agentes formadores de espuma, agentes aromatizantes, umectantes, aglutinantes, espessantes, agentes adoçantes, agentes alvejantes/alvejantes/de remoção de manchas, água e opcionalmente enzimas.

25

                  As soluções para limpeza bucal, incluindo líquidos para remoção de placa, compreendem tipicamente ingredientes tais como uma solução de água/álcool, aroma, agente umectante, adoçante, agente de formação de espuma, corante e opcionalmente enzimas.

30

                  Goma de mascar: As composições adequadas para a prepara-

ção de uma goma de mascar são descritas na WO2005/006872 e na Patente U.S. Nº 4.564.519.

Quanto utilizada nos produtos para cuidado oral, a quantidade da primeira oxidase tal como uma poliol oxidase, tal como a sorbitol oxidase e a enzima adicional (tal como a oxidorreductase adicional) deve ser uma  
5 quantidade segura e eficiente que significa uma quantidade alta o suficiente para modificar significativamente o estado de saúde que será tratado ou o efeito do resultado alvejante e/ou alvejante desejado, mas baixa o suficiente para evitar efeitos colaterais graves.

10 Em um aspecto adicional, a invenção fornece um método para alvejar e/ou branquear os dentes, que compreende o contato dos dentes com um produto para cuidado oral que compreende uma composição de acordo com a invenção em uma quantidade e um período de tempo adequado para alvejar e/ou branquear os dentes.

15 A presente invenção fornece uma composição para branqueamento dos dentes segura que possui a vantagem sobre a da técnica anterior por fornecer o uso de uma primeira oxidase tal como uma poliol oxidase, tal como a sorbitol oxidase que pode atuar sobre os substratos que não são cariogênicos (isto é, substratos que não se degradam em açúcares cariogênicos tais como sacarose, glicose, frutose, maltose etc.).  
20

#### Alimento e Produto Alimentício

A composição da invenção pode ser utilizada na desinfecção geral de alimentos e de ambientes de alimentos humanos e animais, tais como nas estruturas de produção, processamento de uma preparação, tais  
25 como salas de ordenha, unidades de produção de queijo, fábricas de processamento de carne, plantas de lavagem e processamento de vegetais e frutas, em restaurantes etc.

Nas fábricas de processamento de carne (isto é, carne animal, incluindo peixe), a composição da invenção pode ser utilizada na lavagem e  
30 na desinfecção de carcaças de animais e produtos alimentícios derivados das mesmas. O uso de um sistema de poliol oxidase/enzima adicional é particularmente preferido uma vez que reduz o nível de açúcares fermentáveis

dentro ou na superfície dos produtos de carne, reduzindo o crescimento de micro-organismos indesejáveis. A composição de acordo com a invenção pode compreender ainda silicatos alcalinos (US2004062851, incorporada aqui como referência), tais como composições que são consideradas particularmente úteis na descontaminação de produtos de carne. O uso de silicatos alcalinos também aumentou as propriedades de retenção de água da carne e dos produtos de carne e pode ser feito para aumentar a retenção da composição da invenção na carne e nos produtos de carne.

Uma vantagem adicional é a diminuição do pH causada pela produção de produtos ácidos adicionais, o que inibe também a produção de micro-organismos dentro ou na superfície da carne. Benefícios similares são observados nas unidades de lavagem e processamento de vegetais e frutas.

A composição da invenção também pode ser utilizada nos alimentos humanos e alimentícios. O peróxido de hidrogênio é utilizado extensivamente como um agente antimicrobiano na produção de produtos laticínios e produtos de ovos. De forma adequada, a composição de acordo com a invenção pode ser adicionada ou pode ser um produto alimentício selecionado do grupo que consiste em: produtos laticínios, tais como leite, creme, queijo, soro do leite, iogurte, manteiga ou ovo, tal como gema do ovo ou clara do ovo.

A diminuição do pH causada pelo acúmulo de produtos ácidos adicionais é também uma vantagem considerável em outros tipos de alimentos, tal como na produção de queijo, em que a diminuição rápida do pH aumenta a taxa de maturação do queijo, tal como queijos cheddar e queijos duros italianos, reduzindo o tempo de maturação e de armazenamento. O pH mais baixo, portanto, contribui ainda para um sabor melhorado do queijo.

Em uma modalidade a composição da invenção é utilizada em uma bebida, tal como um suco de fruta. Os sucos de fruta compreendem tipicamente os primeiros substratos adequados, portanto, pode ser desnecessário adicionar o primeiro substrato adicional no suco de fruta ou alternativamente podem ser suplementado com os primeiros substratos referidos aqui.

- Além disso, o  $O_2$  é eliminado pela produção de xilose, que pode prevenir que o alimento estrague. Um benefício adicional é a diminuição do pH comparado com o de um sistema em que a SOX é utilizada isoladamente, em que nenhuma diminuição do pH é observada – a diminuição do pH também pode prevenir ou reduzir a deterioração dos alimentos.

#### Produtos para Cuidado Pessoal

- Na área de cuidados pessoais, a composição da presente invenção pode ser adicionada em um produto para cuidado pessoal sem ser os produtos para cuidado oral, tais como produto de limpeza de dentaduras, sabão líquido, cremes e loções para cuidado da pele, formulações para cuidado dos cabelos e para cuidado do corpo e soluções para limpeza de lentes de contato em uma quantidade eficiente para atuar como um agente antibacteriano.

#### Produção de papel

- A composição da invenção pode também ser utilizada para a limpeza de moinhos de papel, o peróxido de hidrogênio produzido oxida os carboidratos nos ácidos correspondentes, que por sua vez acredita-se que quelam a parte catiônica dos sais inorgânicos de acordo com a quantidade. Isto possibilita uma melhor limpeza e/ou controle de sedimentos e para correntes de água leva a uma redução na turbidez, a um melhor comportamento de assentamento, assim como uma redução na coloração, dos quais todos tornam os procedimentos de limpeza e controle de efluentes mais fáceis e menos caros (ver a WO06/061018).

#### Cosméticos

- A glicose oxidase foi utilizada como a base de um sistema conservante comercial para cosméticos e artigos de higiene. Entretanto, a presente invenção fornece um substituto adequado para o uso da glicose oxidase uma vez que fornece um sistema mais eficiente para a produção de peróxido de hidrogênio e/ou pode fornecer uma ação antimicrobiana/antibacteriana eficiente quando em uso. Pode também fornecer um produto com função dual, que é um cosmético que clareia ou branqueia a pele durante o uso.

O sistema de lactoperoxidase é utilizado em vários produtos

cosméticos. A composição cosmética ou o produto de acordo com a invenção pode, portanto, compreender ainda lactoperoxidase e tiocianato.

Os polióis, tais como o sorbitol é tipicamente um componente principal dos cosméticos ou pode ser adicionado nos cosméticos para fornecer um substrato adequado para a poliol oxidase na composição de acordo com a invenção.

O uso da composição da invenção nos produtos cosméticos pode fornecer um ou mais dos benefícios a seguir: conservação do cosmético e da atividade microbiana/bacteriana quando aplicado na pele, efeito alvejante/alvejante da pele.

Os ingredientes cosméticos incluem: antioxidantes, agentes de ligação, emolientes, emulsificantes, umectantes, pigmentos, lubrificantes, conservantes, solventes, fragrâncias, tensoativos, substâncias de veículo, tais como um material com base inerte, estabilizantes e espessantes.

A composição/o produto da invenção pode ser utilizado na forma de um ou mais dos produtos cosméticos selecionados do grupo que consiste em: batom, brilho labial, lápis labial e Tinta labial; base líquida; base em creme; pó; Rouge (blush ou blusher); bronzeador; Máscara; Delineador de olhos e sobra de olhos; Esmalte para unhas; Corretores de manchas da pele; produtos para cuidado da pele tais como cremes e loções, por exemplo, para hidratar a face e o corpo; protetores solares e loções solares; produtos de tratamento para reparar ou esconder imperfeições da pele.

Os cosméticos também podem ser descritos pela forma do produto, assim como pela área para aplicação. Os cosméticos podem ser emulsões líquidas ou em creme; pós, tanto pressionados como livres; dispersões; e cremes ou bastões anidros.

A composição/ões produtos de acordo com a invenção podem ainda ser utilizados em técnicas cosméticas tal como alveijamento e/ou branqueamento da pele.

### 30 Alvejamento da pele

A hidroquinona tem sido utilizada como um ingrediente nas preparações para alvejamento da pele. Entretanto, recentemente a US Envi-



ronmental Protection Agency emitiu uma notificação de estabelecimento de regras proposto que estabeleceria que os produtos de fármacos para alve-  
jamento da pele vendidos no balcão (OTC) baseados em hidroquinona são  
potencialmente carcinogênicos e não são reconhecidos de forma geral como  
5 seguros e eficientes (GRAS) e têm a marca falsificada.

As composições e os produtos de acordo com a invenção po-  
dem ser utilizados para a preparação de produtos à base de enzimas para o  
alveijamento da pele e, portanto, fornecem uma alternativa segura para o uso  
da hidroquinona.

10 Os produtos para o alveijamento da pele podem compreender  
outros agentes alvejantes, tais como extrato de alcaçuz, extrato de amora,  
arbutina, ácido cójico, extrato de uva-ursina, misturas de AHA, ácidos salicí-  
clicos, ácido aloeléico, ácidos cítricos, ácidos lácticos, assim como matrizes  
e protetores solares com base adequada.

#### 15 Alveijamento dos cabelos

Para o alveijamento da coloração dos pelos é utilizado um agen-  
te oxidante químico. Os agentes oxidantes adequados são persulfatos, clore-  
tos e, acima de tudo, peróxido de hidrogênio ou produtos de adição dos  
mesmos com uréia, melamina e borato de sódio. Portanto, a composição da  
20 presente invenção também pode ser utilizada como uma fonte alternativa  
segura de peróxido de hidrogênio para o alveijamento dos pelos.

De forma adequad,a uma composição para alveijamento dos ca-  
belos também pode ser utilizada para corar fibras de queratina e pode, por-  
tanto, conter pelo menos um precursor de corante assim como a composição  
25 da presente invenção. A presente invenção se refere ainda a um processo  
para a coloração de fibras contendo queratina utilizando a composição da  
presente invenção.

#### Tinta

O termo 'tinta' como utilizado aqui no contexto da presente in-  
30 venção se refere à família de produtos utilizados para proteger e/ou adicio-  
nar cor a um objeto ou superfície cobrindo a mesma com um revestimento  
pigmentado ou não pigmentado e incluem verniz, tintas para madeira, goma

laca, laca e esmalte. A tinta pode ser aplicada em quase todo o tipo de objeto. A tinta é um produto semiacabado, uma vez que o produto final é o próprio artigo pintado.

5 A tinta pode ser utilizada na aplicação em que a tinta seca é exposta a um ambiente de água natural, tal como uma tinta marítima. As tintas marítimas são utilizadas para prevenir ou reduzir a formação de sujeira sobre os cascos de barcos e navios causado pelo crescimento de organismos tais como algas, estrelas do mar e similares.

10 A tinta pode ser uma tinta decorativa, por exemplo, utilizada no interior ou no exterior de construções e outros objetos.

A tinta pode ser uma tinta protetora, que previne ou reduz o estrago por micro-organismos da superfície ou do material sobre o qual a tinta é aplicada, tal como decomposição seca ou decomposição úmida.

15 A composição de acordo com a invenção pode ser utilizada como um conservante na tinta. Alternativamente ou em adição, a composição pode ser utilizada em uma tinta para reduzir a formação de sujeira, tal como na tinta marítima, em que a produção de peróxido de hidrogênio produz uma camada oxidativa que previne ou reduz a adesão ou o crescimento de organismos que se depositam sobre a superfície. Tais tintas que compreendem a  
20 composição de acordo com a invenção oferecem uma solução de enzimas benéfica para este problema uma vez que o peróxido de hidrogênio é produzido sem a adição ou o acúmulo significativo de substratos que podem ser fermentados dentro da tinta, que podem realmente favorecer a antiformação de sujeira, especialmente se as enzimas dentro da tinta ficarem inativadas.

## 25 Pesticidas

Os produtos pesticidas contêm geralmente não mais que 35% de peróxido de hidrogênio, que são então geralmente diluídos a 1% ou menos quando aplicados na forma de um spray ou de um líquido. O peróxido de hidrogênio é utilizado para muitas plantas de cultivo não alimentares e ali-  
30 mentares (por exemplo, frutas, nozes e vegetais), tanto internas quanto externas e antes e depois da colheita e para a desinfecção das unidades de armazenamento de alimentos. As pragas-alvo são tipicamente micro-orga-

nismos, incluindo fungos e bactérias que causam doenças às plantas. Os pesticidas contendo peróxido de hidrogênio, utilizados para prevenir e controlar os agentes patogênicos de plantas, são tipicamente aplicados na forma de um spray sobre a folhagem ou na forma de um banho de imersão nas mudas e nas raízes ou na forma de um tratamento do solo pré-plantio.

A composição de acordo com a invenção pode, portanto, ser utilizada como um pesticida, diretamente, permitindo a produção de peróxido de hidrogênio *in situ* ou na forma de um sistema para a produção de peróxido de hidrogênio que pode ser subsequentemente aplicado na superfície apropriada.

Modalidades adicionais:

1. Uma composição que compreende uma sorbitol oxidase, um primeiro substrato e uma oxidoredutase,
  - em que o primeiro substrato é oxidável pela sorbitol oxidase para formar peróxido de hidrogênio e um segundo substrato e o segundo substrato é oxidável pela oxidoredutase para formar peróxido de hidrogênio e um produto.
2. A composição de acordo com a invenção tal como na modalidade 1, em que o primeiro substrato é um ou mais selecionados do grupo que consiste em D-sorbitol, D-xilitol, D-manitol, D-arabitol, glicerol, inositol, 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol e 1,4-butanodiol.
3. A composição de acordo com a invenção tal como na modalidade 2, em que o primeiro substrato é um ou mais selecionados do grupo que consiste em D-sorbitol ou D-xilitol.
4. A composição de acordo com a invenção tal como na modalidade 3, em que o primeiro substrato é D-sorbitol.
5. A composição de acordo com a invenção tal como na modalidade 1, em que a oxidoredutase é uma ou mais selecionadas do grupo que consiste em hexose oxidase, glicose oxidase, carboidrato oxidase e oligossacarídeo oxidase.
6. A composição de acordo com a invenção tal como na modali-

dade 5, em que a oxidorreductase é uma ou mais selecionadas do grupo que consiste em uma carboidrato oxidase, uma hexose oxidase ou uma glicose oxidase.

5 7. A composição de acordo com a invenção tal como na modalidade 6, em que a oxidorreductase é uma hexose oxidase.

8. A composição de acordo com a invenção tal como na modalidade 1, em que a sorbitol oxidase é derivada de uma cepa de *Streptomyces*.

9. A composição de acordo com a invenção tal como em qualquer uma das modalidades 1-8, em que o pH da composição fica entre 5 e 9.

10 10. A composição de acordo com a invenção tal como em qualquer uma das modalidades 1-9, em que o pH da composição fica entre 6 e 8.

11. A composição de acordo com a invenção tal como em qualquer uma das modalidades 1-10, em que a sorbitol oxidase e a oxidorreductase são ativas à temperatura ambiente.

15 12. Um produto para cuidado oral que compreende uma composição de acordo com a invenção tal como em qualquer uma das modalidades 1-11 e os ingredientes utilizados nos produtos para cuidado oral.

13. O uso de uma sorbitol oxidase para branquear e/ou alvejar.

20 14. O uso de uma composição de acordo com a invenção tal como em qualquer uma das modalidades 1-10 para branquear e/ou alvejar.

15. O uso de acordo com a invenção tal como em qualquer uma das modalidades 13-14 para branquear e/ou alvejar os dentes.

25 16. Um método para alvejar e/ou branquear os dentes, que compreende o contato dos dentes com um produto para cuidado oral que compreende uma composição de acordo com a invenção tal como em qualquer uma das modalidades 1-10 em uma quantidade e um período de tempo adequados para alvejar e/ou branquear os dentes.

17. Sorbitol oxidase e D-xilitol para uso como um medicamento.

30 18. Um medicamento de acordo com a invenção tal como na modalidade 17, em que a sorbitol oxidase é derivada de uma cepa de *Streptomyces*.

19. Um produto para cuidado oral que compreende sorbitol oxi-

dase e D-xilitol e ingredientes utilizados nos produtos para cuidado oral.

20. O uso de uma sorbitol oxidase e D-xilitol para branquear e/ou alvejar os dentes.

### EXEMPLOS

5 Os exemplos a seguir são fornecidos com a finalidade de demonstrar e ilustrar adicionalmente certas modalidades e aspectos preferidos da presente invenção e não devem ser interpretados como limitantes do âmbito da mesma.

Na descrição experimental a seguir, são aplicadas as abreviações a seguir: °C (graus Centígrados); rpm (revoluções por minuto); H<sub>2</sub>O (água); HCl (ácido clorídrico); aa (aminoácido); pb (par de bases); kb (par de quilobases); kD (quilodáltons); g (gramas); µg e ug (microgramas); mg (miligramas); ng (nanogramas); µL e uL (microlitros); mL (mililitros); mm (milímetros); nm (nanômetros); µm e um (micrômetro); M (molar); mM (milimolar); 10 µM e uM (micromolar); U (unidades); V (volts); PM (peso molecular); s (segundos); min (minutos); h (horas); MgCl<sub>2</sub> (cloreto de magnésio); NaCl (cloreto de sódio); DO<sub>280</sub> (densidade óptica em 280 nm); DO<sub>600</sub> (densidade óptica em 600 nm); EFT ("tempo de fermentação eficiente"); HDL (Líquido Detergente para Trabalho Pesado); EtOH (etanol); PBS (solução salina tamponada com fosfato [NaCl a 150 mM, tampão fosfato de sódio a 10 mM, pH 7,2]); SDS (dodecil sulfato de sódio); Tris (tris(hidroximetil)aminometano); TAED (N,N,N'N'- tetra-acetiletilenodiamina); p/v (peso em relação ao volume); v/v (volume em relação ao volume); GOX e GOx (glicose oxidase); AOX e AOx (álcool oxidase); COX e Cox (colina oxidase); HOX e HOx (hexose oxidase); 15 SOX e Sox (sorbitol oxidase); AATCC (American Association of Textile and Coloring Chemists); WFK (wfk Testgewebe GmbH, Bruggen-Bracht, Alemanha); Testfabrics (Testfabrics Inc, Pittston PA); ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA); Geneart (Geneart, Regensburg, Alemanha); Invitrogen (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA); Baker (J.T.Baker, Phillipsburg, 20 NJ); NAEF (NAEF, Press and Dies, Inc., Bolton Landing, NY); Fluka (Fluka Chemie AG, Buchs, Suíça); Prometric (Prometic Biosciences, Wayne NJ); 25 Minolta (Konica Minolta, Glen Cove, NY); e Sigma (Sigma-Aldrich Chemical

Co., St. Louis, MO).

EXEMPLO 1: Construção de Cepas que Expressam Sorbitol Oxidase de *Streptomyces* sp. h-7775 em *Streptomyces lividans*

A sequência de proteína (SEQ ID NO: 1) da sorbitol oxidase foi obtida a partir da sequência de aminoácidos publicada (Ver, por exemplo, Hiraga e outros, Biosci. Biotechnol. Biochem., 62: 4347-353 [1998]). A sequência sinal da via de argininas em par do gene SCO6772 de *Streptomyces coelicolor* (SEQ ID NO: 3) foi obtida a partir da sequência genômica completa de *Streptomyces coelicolor*.

A sorbitol oxidase foi expressa em *Streptomyces* na forma de uma proteína de fusão da sequência sinal da proteína SCO6772 (SEQ ID NO: 3) e a sorbitol oxidase (SEQ ID NO: 1). Um sítio de restrição para *Nco*I foi introduzido na extremidade a 5' do DNA para as finalidades de clonagem, que resultou na adição de resíduos do aminoácido glicina na posição 2 (Ver, SEQ ID NO: 4).

Um sítio de restrição para *Bam*HI também foi introduzido na extremidade a 3' do DNA para as finalidades de clonagem. Os códons do gene de fusão foram otimizados para a expressão em *Streptomyces lividans*. O DNA foi sintetizado pela Geneart. O fragmento de DNA abrangendo os dois sítios de restrição (isto é, de *Nco*I até *Bam*HI (SEQ ID NO: 5)) foi clonado no plasmídeo de expressão em *Streptomyces* pKB105 (Ver, o Pedido de Patente U.S. Nº de Série 11/303.650, depositado em 16 de dezembro de 2005, incorporado como referência em sua totalidade) que foi cortado com *Bam*HI completamente e com *Nco*I parcialmente.

O plasmídeo de expressão (pKB105-TAT-SOX-7775; Figura 1) foi transformado na cepa g3s3 de *Streptomyces lividans* (Ver, o Pedido de Patente U.S. Nº de Série 11/305.650, *supra*) e três transfectantes foram selecionados e cultivados em meio TS durante 2-3 dias na presença de 50 ug/mL de tiostreptona a 30°C. As células foram então transferidas para um meio de produção isento de agentes antimicrobianos e o cultivo foi continuado durante mais três dias. Então, 1 mL da cultura foi transferido para cada um de dois tubos de cultura e as células foram removidas por centrifugação

sob condições suficientes para separar as células dos sobrenadantes. Os sobrenadantes obtidos partindo destes dois tubos de cultura foram testados em ensaios da atividade enzimática. Dois oligos (SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 7) foram obtidos na Invitrogen.

- 5 GCGCTAGCCGGCCCCCGGCACAGGCCATGACCCCGGCCGAGAAGAA  
CTGGG (SEQ ID NO: 6)  
CAGGAAACAGCTATGAC (SEQ ID NO: 7)

Os iniciadores foram utilizados na PCR para a amplificação do gene da sorbitol oxidase e para fundir o gene da sorbitol oxidase com a sequência sinal *celA*. A mistura da reação da PCR contendo DNA, dNTPs, iniciador e 4% de DMSO em 1x tampão foi aquecida a 98°C durante 4 minutos para desnaturar os moldes de DNA. A enzima Herculase® II (Stratagene) foi adicionada no tubo e a reação da PCR foi realizada em 30 ciclos de 98°C durante 30 segundos, 62°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto e 8 segundos. A extensão final a 72°C foi feita durante 5 minutos e a reação foi resfriada a 4°C.

O fragmento da PCR resultante continha uma parte da sequência sinal *celA*, o gene da sorbitol oxidase e uma parte da sequência do vetor contendo dois sítios de enzimas de restrição (SEQ ID NO: 8).

20 O fragmento da PCR foi digerido com as enzimas de restrição *NheI* e *BamHI* para remover a parte da sequência do vetor. O fragmento resultante foi então clonado no vetor de expressão pKB105 para gerar o plasmídeo "pKB105-*CelA*-Sox7775" (Ver, a Figura 2). O plasmídeo de expressão foi transformado na cepa g3s3 de *Streptomyces lividans* e três transformantes foram selecionados e cultivados em meio TS durante 2-3 dias na presença de 50 µg/mL de tiostreptona a 30°C. As células foram então transferidas para um meio de produção isento de antibióticos e o cultivo foi continuado durante mais três dias. Então, 1 mL da amostra foi transferido para cada um dos dois novos tubos de cultura e as células foram removidas e a enzima foi purificada como descrito no Exemplo 2.

30 EXEMPLO 2: Expressão do gene da sorbitol oxidase de *Streptomyces* sp. H-7775 na cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli*.

A sequência de aminoácidos do gene da sorbitol oxidase do gene SOX de *Streptomyces* sp. H-7775, publicada por Hiraga e outros 1998. Bioscience Biotech Biochem. 61: 1699-1704, 1998 foi recuperada do banco de dados de sequências.

- 5 Um gene sintético (com códons neutros) codificando o gene SOX de H-7775 foi utilizado para expressar o gene da sorbitol oxidase na cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli*. O vetor de expressão pET 24a com o gene SOX foi clonado na forma do fragmento de NdeI + Bam HI. O plasmídeo resultante (Figura 5a) foi transformado e propagado nas células de *E. coli*
- 10 Top10 (Invitrogen, USA). Os transformantes resistentes à canamicina contendo o gene SOX de 1,2 kb foram identificados através do método de PCR direto com colônias. Os transformantes positivos em relação a SOX foram cultivados e o DNA plasmideal foi isolado. O DNA plasmideal contendo o gene SOX clonado foi então utilizado para transformar a cepa hospedeira
- 15 BL21(DE3)pLysS. A reação de transformação inteira foi utilizada diretamente para inocular frascos de 250 mL contendo 25 mL de LB + o antibiótico canamicina (50 ug/mL) e cloranfenicol (34 ug/mL). As culturas foram incubadas durante a noite com agitação a 37°C. Um frasco de 2 litros contendo 500 mL de LB contendo canamicina (50 ug/mL) e cloranfenicol (34 ug/mL) foi inocu-
- 20 lado com 25 mL da cultura mantida durante a noite e foi adicionalmente permitida que crescesse durante 2 horas até atingir aproximadamente uma DO<sub>600</sub> de 0,4-0,6 fase logarítmica média. O IPTG em uma concentração final de 1 mM foi adicionado nas culturas. As culturas foram adicionalmente incubadas durante mais 2 horas e então coletadas por centrifugação. Os péletes
- 25 resultantes foram ressuspensas em tampão fosfato e as células foram passadas através de uma prensa de French para o rompimento/lise das células. Os lisados de células diferentes foram analisados em relação à atividade de sox (ver a Tabela 1 abaixo) e fracionados por eletroforese em gel (condições nativas & desnaturantes). Os lisados de células foram fracionados em um
- 30 gel nativo que foi adicionalmente testado em um ensaio de atividade de cobertura em gel utilizando sorbitol como o substrato e um ensaio baseado na redução mediada por PMS de NBT. A figura 5b mostra a presença de uma



- banda de proteína corada distinta correspondente a uma flavoproteína, a proteína SOX que possui atividade em relação ao sorbitol. O PMS/NBT é um ensaio para diagnóstico para flavoproteínas em que PMS = metossulfato de fenazina é um mediador redox que é reduzido por FAD reduzido. A glicose oxidase também é uma flavoproteína na faixa 1 figura 5b, mas não é ativa em relação ao sorbitol, assim, a ausência da banda corada. P10 é um transformante com o vetor pET24a vazio (sem o gene SOX) mostrando a ausência da banda da proteína ativa de SOX. A ausência de uma banda corada na faixa 1 mostrou que a glicose oxidase não é ativa em relação ao sorbitol, o substrato utilizado na mistura para o ensaio de cobertura. Este ensaio pode, portanto, ser utilizado para determinar se a primeira oxidase tal como a poliol oxidase da invenção não possui atividade significativa sobre o segundo substrato.

1. Reagente de ensaio (100 mM de Kpi, pH 7, 1% de Sorbitol, ABTS a 5 mM, 10U7 mL de HRP)
2. 37°C, 990 µL do reagente de ensaio
3. 3 minutos
4. controle P10 = 0,2 U/mg
5. P18 = 1,2 U/mg
6. P6 = 1,05 U/mg
7. P6H = 1,49 U/mg
8. P19 = 0,69 U/mg
9. P19H = 1,17 U/mg
10. 1,1 U/mg. Expressão de *E. coli* Oda & Hiraga da SOx na fase de extração celular

- Tabela 1:** Atividade de SOX utilizando o (ensaio de ABTS/HRP) com 6 extratos diferentes de *E. coli*. O extrato P10 é um controle negativo com atividade de fundo.

- A Tabela 1 mostra a produção da sorbitol oxidase com uma enzima ativa em *E. coli* BL21(DE3)pLysS. O controle negativo mostrou uma atividade de fundo de 0,2 U/mg. A atividade enzimática foi aumentada através do aquecimento (H) dos extratos isentos de células P6H & P19H, indi-

cando que uma etapa de tratamento térmico pode ser utilizada para a purificação da proteína SOX. A SOX expressa por *E. coli* tem uma atividade específica similar à do trabalho previamente realizado por Kohei Oda & Kazumi Hiraga (Biosci Biotech Biochem 61: 1699-1704, 1997).

5                    EXEMPLO 3: Expressão do suposto gene da sorbitol oxidase de *Streptomyces coelicolor/lividans* na cepa S3G3 de *Streptomyces lividans*

A gi|28380233|sp|Q92BU1|XYOA\_STRCO de *Streptomyces coelicolor* comentada com uma provável *xilitol oxidase* (XOX) foi identificada por buscas em blast como sendo mais próxima em relação à identidade de  
10 sequência (entre 54-60% dependendo do alinhamento) ao gene da sorbitol oxidase de *Streptomyces* sp. H-7775. O local contendo o suposto gene XOX de *Streptomyces coelicolor*, SCO6147, a sequência ORFNames=SCIA9.11c, foi recuperado do banco de sequências e vários iniciadores gênicos específicos & e iniciadores flanqueadores foram utilizados para isolar o gene correspondente de *S. lividans* pela PCR. A sequência do genoma completo de  
15 *Streptomyces lividans* ainda não está disponível, mas é quase idêntica à do genoma totalmente sequenciado de *S. coelicolor*. A reação final da PCR consistia nos Iniciadores us-sco1 5'gcccatatgaggcgacatcacggtcacc (SEQ ID NO: 9) e ls-sco1 5'ggatcctcagcccgcgagcaccccc (SEQ ID NO: 10), o DNA genômico de *S. lividans* com o molde resultando na síntese de um fragmento da PCR de 1,269 kb. As condições da PCR utilizadas nesta etapa final da PCR consistiam em 30 ciclos: desnaturação a 94°C durante 55 segundos, anelamento a 55°C durante 55 segundos, extensão durante 1-2 minutos a 68°C. A polimerase utilizada é a Platinum Pfx DNA polimerase mais a solu-  
20 ção intensificadora da Invitrogen. O produto da PCR resultante foi clonado diretamente em um vetor de *E. coli* PCR Blunt TOPO. Os iniciadores us-s1 5'gccatgggcgacatcacggtcaccaac (SEQ ID NO: 11) e ls-s1 5' atggatcctcagc cgcgagcaccccc (SEQ ID NO: 12), foram utilizados em uma reação da PCR utilizando as mesmas condições como acima. O produto da PCR de 1,268  
25 kb foi digerido com NcoI-BamHI e o fragmento resultante foi clonado diretamente em um vetor pK105 de *Streptomyces* digerido com NcoI + Bam HI. O constructo final é o vetor de expressão denominado pSMM-SOX (*S. lividans*)  
30

na figura 6. O SOX clonado no PCR Blunt TOPO foi utilizado para verificar a sequência de nucleotídeos do suposto gene SOX. Os 5 µL do DNA plasmídeo (figura 6) foram utilizados para transformar protoplastos de *Streptomyces* g3s3. A reação de transformação foi plaqueada em placas R5 e incubada a 32°C durante 18 horas. Uma cobertura de ágar nutritivo mole contendo tiostreptona foi vertida sobre as placas que foram adicionalmente incubadas durante 3 dias. As colônias isoladas foram utilizadas para inocular um frasco de 250 mL com 20 mL de meio TS-G contendo tiostreptona. Após 3 dias de cultivo com agitação a 30°C, alíquotas de 2 mL foram utilizadas para inocular um frasco de 250 mL contendo o meio de produção. Os péletes de células foram coletados por centrifugação, ressuspensos em tampão e rompidos. A Tabela 2 mostra as atividades de SOX presentes nos extratos isentos de células provenientes de transformantes diferentes de *Streptomyces*.

Transformante	17	20	22	24
1	11,38	8,03	10,89	13,60
2	6,77	13,14	12,38	10,38
3	8,88	16,81	8,85	17,3
4	9,37	12,32	16,30	18,28
5	7,34	11,68	0,02	18,14

Tabela 2. Atividades de SOX dos extratos isentos de células provenientes de 20 transformantes diferentes de *Streptomyces* que exibem quantidades de atividade variáveis. Ensaio da Atividade do Suposto SOX (ABTS/HRP) (U/mg).

O DNA e as sequências de proteínas da sorbitol oxidase de *S. coelicolor* (SCO6147) são mostrados como as SEQ ID NOs: 2 e 13, respectivamente.

#### EXEMPLO 4: Purificação da Sorbitol Oxidase

Neste Exemplo, são descritos os métodos utilizados para a purificação da sorbitol oxidase produzida por *S. lividans* (Ver, Exemplos 1 – 4). A sorbitol oxidase de *Streptomyces lividans* fica localizada nos micélios. Assim, a enzima foi isolada através da lise celular utilizando uma prensa de French partindo do extrato celular em tampão de Kpi a 100 mM, fosfato de potássio, pH 7,0. O extrato celular foi aquecido a 50°C durante uma hora, seguida pela

centrifugação suficiente para remover os restos celulares. O sobrenadante do lisado de células foi então misturado com sulfato de amônio a uma saturação de 32% para precipitar a fração de proteína contendo a sorbitol oxidase. O precipitado de proteína foi mantido a 4°C durante a noite e então separado do líquido principal por centrifugação a 10.000 RPM utilizando uma centrífuga Sorvall e um rotor SLA-1500 da Sorvall.

O precipitado de proteína foi então lavado com uma solução de sulfato de amônio saturada a 32%. O precipitado de proteína lavado foi dissolvido novamente em tampão de Kpi e o material insolúvel foi descartado. A fração solúvel foi submetida à diálise contra tampão de Kpi a 25 mM, pH 7,0, durante a noite e então adicionalmente purificada utilizando cromatografia por afinidade na resina laranja reativa (Prometic). Esta preparação de sorbitol oxidase parcialmente purificada e o lisado de células do caldo de fermentação (EFT de 108 h) foram utilizados como amostras nos experimentos para o bioalvejamento. O peso molecular da enzima foi determinado como sendo de ~45.000 Da por eletroforese em gel de SDS-PAGE. O grupo prostético é um FAD ligado covalentemente (1 mol de FAD para 1 mol de SOX).

#### EXEMPLO 5: Estabilidade e Desempenho de Alvejamento de SOX em Condições de Lavagem de Roupas HDL

Neste Exemplo, são descritos métodos para a determinação da estabilidade e do desempenho de alvejamento de SOX nas condições de lavagem de roupas com detergente líquido da AATCC. Nestes experimentos, é utilizado o detergente padronizado da AATCC (American Association of Textile Chemists and Colorists Heavy Duty Liquid Detergent Version 2003 sem agente de brilho; os componentes-chave incluem alceno sulfonato linear, álcool etoxilado, propanodiol, ácido cítrico, ácido graxo, soda cáustica e água; Testfabrics).

São utilizadas três amostras de tecido de algodão que podem ser alvejadas com suco (STC CFT CS-15), vinho (STC CFT CS-3) e chá (STC CFT BC-3). As amostras de tecido são cortadas em círculos de 15 mm com um furador de tecidos (Modelo B equipado com um cortador de molde de 1,58 cm (5/8"); Modelo 93046; NAEF).

Os discos isolados de amostras de tecido são colocados em cada poço de uma microplaca de 24 poços (Costar 3526). Um (1) mL de solução de lavagem pH 8, contendo por litro, 1,5 mL de detergente AATCC HDL, sorbitol a 75-100 mM, dureza de 6 gpg (diluído da solução de dureza estoque de 15000 gpg contendo cloreto de cálcio a 1,735 M e cloreto de magnésio a 0,67 M) e 0,05% de TAED (tetra-acetiletilenodiamina, Fluka) é adicionado em cada poço. Cinco até quinze (5-50 µL) microlitros de sorbitol oxidase parcialmente purificada ou de sorbitol oxidase obtida partindo de uma corrida de fermentação tardia (108 h EFT "tempo de fermentação eficiente") produzidos como descrito nos Exemplos 1 e 2, são adicionados com uma pipeta de deslocamento positivo em 3-8 poços em uma coluna. A hexose oxidase ou a glicose oxidase é adicionada a 0,5, 5, 50, 500, 1000 e 1500 U. Os poços de controle não continham enzima. A microplaca foi coberta com uma tampa de plástico e folha de alumínio a 37°C com rotação suave a 100 rpm durante 14 h. As placas são então removidas do agitador e testadas em relação à presença de peróxido de hidrogênio com tiras de teste para peróxido (Baker).

Cem microlitros (100 µL) de carbonato de sódio a 0,1 mM são adicionados em cada poço para aumentar o pH para 10. As microplacas são incubadas com rotação durante mais 90 min e os sobrenadantes removidos por aspiração. Cada poço é lavado três (3) vezes com 1,5 mL de PBS de Dulbecco, pH 7,3 e três (3) vezes com 1,5 mL de água destilada. Cada disco é removido de seu poço e seco durante a noite entre folhas de toalhas de papel e não expostos à luz direta. Os discos são inspecionados visualmente e então analisados com um Refletometer CR-200 (Minolta) calibrado em um ladrilho branco padronizado. Os valores médios de L são calculados como a porcentagem de liberação de sujeira ( $\% \text{ de SR} = 100\% \times (\text{Refletância final} - \text{Refletância inicial}) / (\text{Refletância de um padrão branco} - \text{Refletância inicial})$ ).

Os resultados preliminares confirmam que a composição de sorbitol oxidase/hexose oxidase é estável em um sistema de detergente líquido típico e é capaz de produzir uma concentração eficiente de peróxido de hidrogênio na presença de seu substrato sorbitol misturado com o detergente

e oxigênio atmosférico disponível. Em adição, o peróxido de hidrogênio gerado pela composição na presença de um agente de reforço de alvejamento (isto é, TAED) é capaz de auxiliar no alvejamento de manchas coradas típicas tais como mirtilo, chá e vinho.

#### 5 EXEMPLO 6: Estudo da Faixa de Substratos da Sorbitol Oxidase

A sorbitol oxidase obtida utilizando os métodos descritos nos Exemplos 3 – 4, foi testada para observar sua atividade com vários substratos de poliol. Todos os substratos utilizados no ensaio estavam a 55 mM em tampão fosfato a 100 mM pH 7,0 a 25°C. A atividade relativa utilizando sorbitol como (++++++) = 100%) é mostrada abaixo na Tabela 1. Em adição a estes substratos, é considerado que outros substratos, incluindo, mas não limitados ao glicerol, encontrarão uso na presente invenção.

Composto	Atividade Relativa (+, 0)
D-Sorbitol	++++++
D-Xilitol	++++
D-Manitol	+++
D-Ribitol	+
Mio-Inositol	+
Glicerol	+
1,3-propanodiol	+1/2
1,2-propanodiol	+1/2
Propileno glicol	0
Etileno glicol	0

#### EXEMPLO 7: Determinação da atividade de SOX, HOX e GOX.

As glicose oxidases possuem a capacidade de oxidar a glicose para produzir peróxido de hidrogênio. Os exemplos são carboidrato oxidase, gluco-oligossacarídeo oxidase e glicose oxidase. A hexose oxidase também pode ser classificada como uma glicose oxidase, embora esta tenha tipicamente uma especificidade mais ampla, com atividade significativa sobre outras hexoses assim como dissacarídeos, tal como a maltose.

#### 20 Definições de unidade

1 unidade de poliol (POX) corresponde à quantidade de enzima, que sob as condições especificadas resulta na conversão de 1  $\mu\text{mol}$  do poliol especificado por minuto, com a produção resultante de 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

1 unidade de sorbitol oxidase (SOX) corresponde à quantidade de enzima, que sob as condições especificadas resulta na conversão de 1  $\mu\text{mol}$  de sorbitol por minuto, com a produção resultante de 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

- 5 Definição: 1 unidade de hexose oxidase (HOX) corresponde à quantidade de enzima que sob as condições especificadas resulta na conversão de 1  $\mu\text{mol}$  de glicose ou de um açúcar hexose alternativo, por minuto, com a produção resultante de 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

- 10 Definição: 1 unidade de glicose oxidase (gluOX) corresponde à quantidade de enzima que sob as condições especificadas resulta na conversão de 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto, com a produção resultante de 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Ensaio da atividade de SOX, HOX ou GOX em placas para microtitulação (300  $\mu\text{L}$ )

- 15 Os substrato ABTS corante da peroxidase da rábano silvestre comumente utilizado foi incorporado no ensaio, medindo a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  obtida por HOX ou GOX, respectivamente. ABTS serve como um substrato cromogênico para a peroxidase. A peroxidase em combinação com  $\text{H}_2\text{O}_2$  facilita o transporte de elétrons do corante cromogênico, que é oxidado
- 20 em um composto intensamente verde/azul.

#### Ensaio *in vitro*

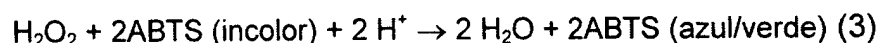
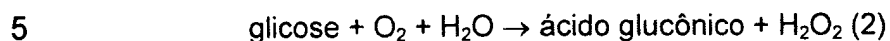
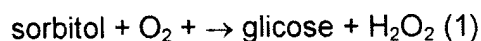
- 25 Uma mistura de ensaio continha 266  $\mu\text{L}$  de sorbitol (Sigma P-5504, 0,055 M em tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 6,3), (ou um substrato alternativo, por exemplo, xilitol), 12  $\mu\text{L}$  de ácido 2,2'-Azino-bis(3-etil-benzotiozolína-6-Sulfônico) (ABTS) (Sigma A-9941, 5 mg/mL de solução aquosa), 12  $\mu\text{L}$  de peroxidase (POD) (Sigma P-6782, 0,1 mg/mL em tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 6,3) e 10  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de enzima (SOX ou HOX).

#### O ensaio é realizado a 25°C.

- 30 A incubação foi iniciada pela adição de glicose. A absorbância foi monitorada em 405 nm em uma leitora de ELISA. Uma curva padrão, baseada nas concentrações variáveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , foi utilizada para o cálculo da

atividade enzimática de acordo com a definição anterior.

As reações que são ilustradas utilizando sorbitol podem ser descritas da maneira a seguir:



A reação (1) é catalisada pela enzima (SOX).

A reação (2) é catalisada pela enzima (HOX ou GOX).

A reação (3) é catalisada pela enzima (POD).

Em relação à reação (2) GOOX e MnCO são também enzimas capazes de catalisar esta reação.

Para os ensaios '*in situ*' pode ser necessário diluir a matriz antes de realizar o ensaio, de forma que o efeito de substâncias interferentes que reagem de forma inespecífica com os componentes do ensaio fique pequeno o suficiente para ser omitido. Alternativamente, a composição de matriz pode ser preparada excluindo a(s) substância(s) interferente(s).

#### EXEMPLO 8: Atividade relativa sobre xilitol e sorbitol

A finalidade era medir a diferença na atividade da sorbitol oxidase sobre D-sorbitol e D-xilitol. O ensaio de ABTS foi utilizado como descrito anteriormente para medir a taxa de produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em que tanto o D-sorbitol quanto o D-xilitol estavam em excesso. A mesma quantidade de enzima, que é preparada nos exemplos anteriores foi utilizada em ambos os casos. A tabela abaixo mostra a atividade relativa sobre os dois substratos (fornecida em valores percentuais). A enzima utilizada era como a preparada nos Exemplos 3 & 4.

Substrato	Atividade relativa %
D-sorbitol	100
D-xilitol	47,6

#### EXEMPLO 9. Sinergia entre as duas enzimas

As Três Enzimas Utilizadas Neste Exemplo eram:

1. Hexose oxidase: Hoxypure®, disponível na Danisco A/S.
2. A sorbitol oxidase de *S. coelicolor* (SCO6147) foi obtida co-



mo descrito nos exemplos 3-4 anteriores.

### 3. Glicose oxidase: Sigma G7141.

No exemplo abaixo, as quantidades de enzima são fornecidas como quantidades unitárias.

5 Uma unidade de HOX é a quantidade de enzima que produziu 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /min quando os substratos estavam em excesso.

Uma unidade de GOX é a quantidade de enzima que produziu 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /min quando os substratos estavam em excesso.

10 Uma unidade de SOX é a quantidade de enzima que produziu 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /min quando os substratos estavam em excesso.

Observação. Nos exemplos abaixo, apenas a SOX terá substratos em excesso. O açúcar gerado será o fator limitante para a enzima secundária. Como citado acima a atividade é fornecida na forma de uma porcentagem do valor de SOX que catalisa D-sorbitol quando tanto o D-sorbitol quanto o oxigênio estão em excesso.

15 As velocidades iniciais foram medidas ao longo de 5 minutos em um ensaio de 300  $\mu\text{L}$  de ABTS (como descrito anteriormente). A produção da taxa de produção de peróxido de hidrogênio foi extrapolada partindo de uma curva padrão. A atividade medida, mostrada na Figura 3 e na Figura 4 é fornecida na forma de um valor percentual. 100% é definido como a taxa de produção de peróxido de hidrogênio pela sorbitol oxidase isoladamente, quando os substratos D-sorbitol e oxigênio estão em excesso (Curvas de velocidade linear).

#### EXEMPLO 10: COMPRIMIDO MASTIGÁVEL

25 A composição de enzima é preparada através da adição de 1 unidade de SOX (como preparada nos Exemplos 1-4) e a hexose oxidase ou a glicose oxidase é adicionada a 0,5, 5, 50, 500, 1000 e 1500 U por microlitro de tampão fosfato de sódio a 100 mM, pH 6,7, sorbitol a 50 mM. A composição aquosa de enzima é utilizada para preparar um comprimido mastigável. Um comprimido contendo a composição de enzima e composições para goma são preparados utilizando ingredientes de base convencionais como apresentado abaixo (os ingredientes listados em termos de % em pe-

30

so).

Um comprimido contendo a composição de enzima e as composições para goma são preparados utilizando os ingredientes de base como apresentado abaixo (os ingredientes listados em termos de % em peso).

5	Composição de enzima	0,5% (fornecida como parte do componente de água)
	Lycasin a 75%	48,9%
	Isomalte ou xilitol	23,1%
	Óleo vegetal hidrogenado	8,7 %
10	Água	4,8%
	Gelatina (solução a 40%)	2,9%
	Fosfato dicálcico revestido com amido	8,7%
	Mistura de mono-diglicerídeos	0,8%
15	Lecitina	0,3%
	Aspartame	0,05%
	Aspartame K	0,05%
	Vanilina	0,05%
	Glicerina	0,1%
20	Bicarbonato de sódio	0,10%
	Sabor de hortelã	0,19%

O comprimido mastigável é preparado através da fervura de Isomalte, Lycasin, água, gordura, mistura de mono e diglicerídeos, glicerina e lecitina a 131°C após o que a glicerina é adicionada e a mistura é resfriada a 30°C (HOX) ou a 60°C (GOX). Depois disso, o bicarbonato de sódio, a composição de enzima, o fosfato dicálcico e o restante dos ingredientes são adicionados. Depois disso, a mistura resfriada à temperatura ambiente (23°C) foi moída em pó e comprimida em um comprimido utilizando uma prensa para comprimidos.

### 30 Eficiência da Redução de Placa *In Vivo*

O comprimido mastigável é testado em relação à redução de placa em 2 e em 5 horas após a mastigação por voluntários humanos utili-

zando placa cultivada *in vivo* em um aparato de retenção intraoral sobre placas de hidroxiapatita. A microscopia confocal é utilizada para visualizar e quantificar as alterações na cobertura da placa e na ultraestrutura da placa. A remoção de placa também foi medida através de microscopia luminosa convencional corando a placa antes e depois do tratamento com o indicador cristal violeta e medindo as alterações na intensidade de cor. O Image Pro Analysis Software é utilizado para realizar a análise das imagens e as medições quantitativas. A intensidade de cor foi medida e utilizada para determinar a remoção de manchas. Quanto maior a intensidade maior é a eficiência de limpeza.

#### EXEMPLO 11: GOMA DE MASCAR

Os ingredientes a seguir podem ser combinados para preparar uma goma de mascar que compreende a composição da invenção:

	Base para goma	31,20%
15	Sorbitol	28,08%
	xilitol	5,23%
	Composição de enzima	1,00% (ver o exemplo anterior)
	Acessulfame K	0,16%
	Aspartame	0,16%
20	Pó de mentol	1,00%
	Aroma líquido	0,47%
	Isomalte PF	11,70%
	Isomalte DC	16,00%
	Agentes antif formação de torta*	4,00%
25	Aroma	2,00%

\* Estearato de magnésio, talco, sílica-gel.

#### EXEMPLO 12: TINTA À BASE DE ÁGUA

Os ingredientes a seguir podem ser combinados para preparar uma tinta à base de água que compreende a composição da invenção:

30	Composição de enzima	0,5%
	Sorbitol	0,5%
	Pigmento	15%

Agente aglutinante acrílico	25%
Água	50%
Outros aditivos*	9,5%

- 5 \*podem incluir os seguintes dependendo do tipo de tinta: agente de dispersão, agente de suspensão, dispersante, desespumante, agente umectante, agente de coalescência, vários materiais de enchimento, tensoativo, cobioicidas, espessantes, coconservantes, látex.

### EXEMPLO 13: TINTA À BASE DE ÓLEO

- 10 Os ingredientes a seguir podem ser combinados para preparar uma tinta à base de óleo que compreende a composição da invenção:

Composição de enzima 0,5%, dissolvida em 80% de sorbitol

Pigmento TiO <sub>2</sub>	20%
Aglutinante alquídico	40%
Solvente hidrocarboneto	20%
15 outros aditivos*	19,5%

\*podem incluir os seguintes dependendo do tipo de tinta: agente de dispersão, agente de suspensão, dispersante, desespumante, agente umectante, agente de coalescência, materiais de enchimento, tensoativo, cobioicidas, espessantes, coconservantes, látex.

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Danisco A/S

<120> COMPOSIÇÃO QUE COMPREENDE UM SISTEMA ENZIMÁTICO ACOPLADO

<130> 16318PCT00

<160> 13

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 420

<212> PRT

<213> Streptomyces sp. H7775

<400> 1

```

Met Thr Pro Ala Glu Lys Asn Trp Ala Gly Asn Ile Thr Phe Gly Ala
1          5          10          15

Lys Arg Leu Cys Val Pro Arg Ser Val Arg Glu Leu Arg Glu Thr Val
20        25        30

Ala Ala Ser Gly Ala Val Arg Pro Leu Gly Thr Arg His Ser Phe Asn
35        40        45

Thr Val Ala Asp Thr Ser Gly Asp His Val Ser Leu Ala Gly Leu Pro
50        55        60

Arg Val Val Asp Ile Asp Val Pro Gly Arg Ala Val Ser Leu Ser Ala
65        70        75        80

Gly Leu Arg Phe Gly Glu Phe Ala Ala Glu Leu His Ala Arg Gly Leu
85        90        95

Ala Leu Ala Asn Leu Gly Ser Leu Pro His Ile Ser Val Ala Gly Ala
100       105       110

Val Ala Thr Gly Thr His Gly Ser Gly Val Gly Asn Arg Ser Leu Ala
115       120       125

Gly Ala Val Arg Ala Leu Ser Leu Val Thr Ala Asp Gly Glu Thr Arg
130       135       140

Thr Leu Arg Arg Thr Asp Glu Asp Phe Ala Gly Ala Val Val Ser Leu
145       150       155       160

Gly Ala Leu Gly Val Val Thr Ser Leu Glu Leu Asp Leu Val Pro Ala
165       170       175

Phe Glu Val Arg Gln Trp Val Tyr Glu Asp Leu Pro Glu Ala Thr Leu
180       185       190

Ala Ala Arg Phe Asp Glu Val Met Ser Ala Ala Tyr Ser Val Ser Val
195       200       205

Phe Thr Asp Trp Arg Pro Gly Pro Val Gly Gln Val Trp Leu Lys Gln
210       215       220

Arg Val Gly Asp Glu Gly Ala Arg Ser Val Met Pro Ala Glu Trp Leu
225       230       235       240

```

Gly	Ala	Arg	Leu	Ala	Asp	Gly	Pro	Arg	His	Pro	Val	Pro	Gly	Met	Pro
				245						250				255	
Ala	Gly	Asn	Cys	Thr	Ala	Gln	Gln	Gly	Val	Pro	Gly	Pro	Trp	His	Glu
		260						265					270		
Arg	Leu	Pro	His	Phe	Arg	Met	Glu	Phe	Thr	Pro	Ser	Asn	Gly	Asp	Glu
		275					280					285			
Leu	Gln	Ser	Glu	Tyr	Phe	Val	Ala	Arg	Ala	Asp	Ala	Val	Ala	Ala	Tyr
	290					295					300				
Glu	Ala	Leu	Ala	Arg	Leu	Arg	Asp	Arg	Ile	Ala	Pro	Val	Leu	Gln	Val
305					310					315					320
Ser	Glu	Leu	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Asp	Asp	Leu	Trp	Leu	Ser	Pro	Ala
			325						330					335	
His	Gly	Arg	Asp	Ser	Val	Ala	Phe	His	Phe	Thr	Trp	Val	Pro	Asp	Ala
			340					345					350		
Ala	Ala	Val	Ala	Pro	Val	Ala	Gly	Ala	Ile	Glu	Glu	Ala	Leu	Ala	Pro
		355					360					365			
Phe	Gly	Ala	Arg	Pro	His	Trp	Gly	Lys	Val	Phe	Ser	Thr	Ala	Pro	Glu
	370					375					380				
Val	Leu	Arg	Thr	Leu	Tyr	Pro	Arg	Tyr	Ala	Asp	Phe	Glu	Glu	Leu	Val
385					390					395					400
Gly	Arg	His	Asp	Pro	Glu	Gly	Thr	Phe	Arg	Asn	Ala	Phe	Leu	Asp	Arg
				405					410					415	
Tyr	Phe	Arg	Arg												
			420												
<210>			2												
<211>			418												
<212>			PRT												
<213>			Streptomyces coelicolor												
<400>			2												
Met	Gly	Asp	Ile	Thr	Val	Thr	Asn	Trp	Ala	Gly	Asn	Ile	Thr	Tyr	Thr
1				5					10					15	
Ala	Lys	Glu	Leu	Leu	Arg	Pro	His	Ser	Leu	Asp	Ala	Leu	Arg	Ala	Leu
			20					25					30		
Val	Ala	Asp	Ser	Ala	Arg	Val	Arg	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	His	Ser	Phe
		35					40					45			
Asn	Glu	Ile	Ala	Glu	Pro	Gly	Asp	Gly	Gly	Val	Leu	Leu	Ser	Leu	Ala
	50					55					60				
Gly	Leu	Pro	Ser	Val	Val	Asp	Val	Asp	Thr	Ala	Ala	Arg	Thr	Val	Arg
65					70					75					80
Val	Gly	Gly	Gly	Val	Arg	Tyr	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Val	Val	His	Ala
				85					90					95	
Arg	Gly	Leu	Ala	Leu	Pro	Asn	Met	Ala	Ser	Leu	Pro	His	Ile	Ser	Val
			100					105					110		
Ala	Gly	Ser	Val	Ala	Thr	Gly	Thr	His	Gly	Ser	Gly	Val	Gly	Asn	Gly
			115				120					125			

Ser Leu Ala Ser Val Val Arg Glu Val Glu Leu Val Thr Ala Asp Gly  
 130 135 140  
 Ser Thr Val Val Ile Ala Arg Gly Asp Glu Arg Phe Gly Gly Ala Val  
 145 150 155 160  
 Thr Ser Leu Gly Ala Leu Gly Val Val Thr Ser Leu Thr Leu Asp Leu  
 165 170 175  
 Glu Pro Ala Tyr Glu Met Glu Gln His Val Phe Thr Glu Leu Pro Leu  
 180 185 190  
 Ala Gly Leu Asp Pro Ala Thr Phe Glu Thr Val Met Ala Ala Ala Tyr  
 195 200 205  
 Ser Val Ser Leu Phe Thr Asp Trp Arg Ala Pro Gly Phe Arg Gln Val  
 210 215 220  
 Trp Leu Lys Arg Arg Thr Asp Arg Pro Leu Asp Gly Phe Pro Tyr Ala  
 225 230 235 240  
 Ala Pro Ala Ala Glu Lys Met His Pro Val Pro Gly Met Pro Ala Val  
 245 250 255  
 Asn Cys Thr Glu Gln Phe Gly Val Pro Gly Pro Trp His Glu Arg Leu  
 260 265 270  
 Pro His Phe Arg Ala Glu Phe Thr Pro Ser Ser Gly Ala Glu Leu Gln  
 275 280 285  
 Ser Glu Tyr Leu Met Pro Arg Glu His Ala Leu Ala Ala Leu His Ala  
 290 295 300  
 Met Asp Ala Ile Arg Glu Thr Leu Ala Pro Val Leu Gln Thr Cys Glu  
 305 310 315 320  
 Ile Arg Thr Val Ala Ala Asp Ala Gln Trp Leu Ser Pro Ala Tyr Gly  
 325 330 335  
 Arg Asp Thr Val Ala Ala His Phe Thr Trp Val Glu Asp Thr Ala Ala  
 340 345 350  
 Val Leu Pro Val Val Arg Arg Leu Glu Glu Ala Leu Val Pro Phe Ala  
 355 360 365  
 Ala Arg Pro His Trp Gly Lys Val Phe Thr Val Pro Ala Gly Glu Leu  
 370 375 380  
 Arg Ala Leu Tyr Pro Arg Leu Ala Asp Phe Gly Ala Leu Ala Gly Ala  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Pro Ala Gly Lys Phe Thr Asn Ala Phe Val Arg Gly Val Leu  
 405 410 415  
 Ala Gly

<210> 3  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 3  
 Met Thr Glu Val Ser Arg Arg Lys Leu Met Lys Gly Ala Ala Val Ser  
 1 5 10 15

Gly Gly Ala Leu Ala Leu Pro Ala Leu Gly Ala Pro Pro Ala Thr Ala  
 20 25 30

Ala Pro Ala Ala Gly Pro Glu Asp Leu Pro Gly Pro Ala Ala Ala  
 35 40 45

<210> 4  
 <211> 468  
 <212> PRT  
 <213> Streptomyces sp. H7775

<400> 4

Met Gly Thr Glu Val Ser Arg Arg Lys Leu Met Lys Gly Ala Ala Val  
 1 5 10 15

Ser Gly Gly Ala Leu Ala Leu Pro Ala Leu Gly Ala Pro Pro Ala Thr  
 20 25 30

Ala Ala Pro Ala Ala Gly Pro Glu Asp Leu Pro Gly Pro Ala Ala Ala  
 35 40 45

Met Thr Pro Ala Glu Lys Asn Trp Ala Gly Asn Ile Thr Phe Gly Ala  
 50 55 60

Lys Arg Leu Cys Val Pro Arg Ser Val Arg Glu Leu Arg Glu Thr Val  
 65 70 75 80

Ala Ala Ser Gly Ala Val Arg Pro Leu Gly Thr Arg His Ser Phe Asn  
 85 90 95

Thr Val Ala Asp Thr Ser Gly Asp His Val Ser Leu Ala Gly Leu Pro  
 100 105 110

Arg Val Val Asp Ile Asp Val Pro Gly Arg Ala Val Ser Leu Ser Ala  
 115 120 125

Gly Leu Arg Phe Gly Glu Phe Ala Ala Glu Leu His Ala Arg Gly Leu  
 130 135 140

Ala Leu Ala Asn Leu Gly Ser Leu Pro His Ile Ser Val Ala Gly Ala  
 145 150 155 160

Val Ala Thr Gly Thr His Gly Ser Gly Val Gly Asn Arg Ser Leu Ala  
 165 170 175

Gly Ala Val Arg Ala Leu Ser Leu Val Thr Ala Asp Gly Glu Thr Arg  
 180 185 190

Thr Leu Arg Arg Thr Asp Glu Asp Phe Ala Gly Ala Val Val Ser Leu  
 195 200 205

Gly Ala Leu Gly Val Val Thr Ser Leu Glu Leu Asp Leu Val Pro Ala  
 210 215 220

Phe Glu Val Arg Gln Trp Val Tyr Glu Asp Leu Pro Glu Ala Thr Leu  
 225 230 235 240

Ala Ala Arg Phe Asp Glu Val Met Ser Ala Ala Tyr Ser Val Ser Val  
 245 250 255

Phe Thr Asp Trp Arg Pro Gly Pro Val Gly Gln Val Trp Leu Lys Gln  
 260 265 270

Arg Val Gly Asp Glu Gly Ala Arg Ser Val Met Pro Ala Glu Trp Leu  
 275 280 285



Gly Ala Arg Leu Ala Asp Gly Pro Arg His Pro Val Pro Gly Met Pro  
290 295 300

Ala Gly Asn Cys Thr Ala Gln Gln Gly Val Pro Gly Pro Trp His Glu  
305 310 315 320

Arg Leu Pro His Phe Arg Met Glu Phe Thr Pro Ser Asn Gly Asp Glu  
325 330 335

Leu Gln Ser Glu Tyr Phe Val Ala Arg Ala Asp Ala Val Ala Ala Tyr  
340 345 350

Glu Ala Leu Ala Arg Leu Arg Asp Arg Ile Ala Pro Val Leu Gln Val  
355 360 365

Ser Glu Leu Arg Thr Val Ala Ala Asp Asp Leu Trp Leu Ser Pro Ala  
370 375 380

His Gly Arg Asp Ser Val Ala Phe His Phe Thr Trp Val Pro Asp Ala  
385 390 395 400

Ala Ala Val Ala Pro Val Ala Gly Ala Ile Glu Glu Ala Leu Ala Pro  
405 410 415

Phe Gly Ala Arg Pro His Trp Gly Lys Val Phe Ser Thr Ala Pro Glu  
420 425 430

Val Leu Arg Thr Leu Tyr Pro Arg Tyr Ala Asp Phe Glu Glu Leu Val  
435 440 445

Gly Arg His Asp Pro Glu Gly Thr Phe Arg Asn Ala Phe Leu Asp Arg  
450 455 460

Tyr Phe Arg Arg  
465

<210> 5  
<211> 1415  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<223> Sequência de nucleotídeos da fusão entre a sequência-sinal e  
SEQ ID N° 1.  
<400> 5

ccatggggcac cgaggtctcc cgccgcaagc tgatgaaggc cgcggcggtg tcgggcggcg 60  
cgctggcgct gccggccctc ggcgccccgc ccgccaccgc ggcgcccggc gccggccccg 120  
aggacctccc gggccccgcc gccgccatga ccccggccga gaagaactgg gccggcaaca 180  
tcaccttcgg cgccaagcgc ctgtgcgtcc cgcgctccgt ccgcgagctg cgcgagaccg 240  
tgggcgccctc cggcgcgctg cgcgcgctgg gcaccgcga ctcgttcaac accgtcgccg 300  
acacctccgg cgaccacgtg tcgctggccg gcctgccgcg cgtcgtcgac atcgacgtcc 360  
cgggccgggc cgtgtccctg tccgccggcc tgcgcttcgg cgagttcgcc gccgagctgc 420  
acgcccgcgg cctggccctg gccaacctgg gctccctgcc gcacatctcc gtggcgggcg 480  
cggtcgccac cggcaccac ggctccggcg tcggcaaccg ctccctggcg ggcgcccgtc 540  
gcgcctctgc cctggtcacc gccgacggcg agaccgcac cctgcgccgc accgacgagg 600  
acttcgccgg cgccgtcgtg tccctgggcg ccctgggctg cgtcacctcc ctggagctgg 660  
acctggtccc ggccttcgag gtccgccagt gggctctacga ggacctgcc gagggcacc 720

tggccgcccc cticgacgag gtcatgtccg ccgcctactc cgtgtccgtg ttcaccgact 780  
 ggcgccccggg cccggtcggc caggtctggc tgaagcagcg cgtcggcgac gagggcgccc 840  
 gctccgtcat gccggccgag tggctgggcg cccgcctggc cgacggcccc cgccacccgg 900  
 tccccggcat gcccgcgggc aactgcaccg cccagcaggg cgtccccggc ccgtggcacg 960  
 agcgctgcc gcaacttcgc atggagtcca ccccgctcaa cggcgacgag ctgcagtccg 1020  
 agtacttctg cgcccgcgcg gacgccgtcg cggcctacga ggcgctggcc cgctgcgcg 1080  
 accgcatcgc cccggtcctg caggtctccg agctgcgcac cgtcgcgcgc gacgacctgt 1140  
 gggtgtcccc ggcccacggc cgcgactccg tcgccttcca cttcacctgg gtccccggacg 1200  
 ccgcccgggt cgccccggtc gccggcgcca tcgaggaggc cctggccccg ttcggcgccc 1260  
 gcccgcaactg gggcaagggt ttctccaccg cccccgaggt cctgcgcacc ctgtaccgcg 1320  
 gctacgccga cticgaggag ctggtcggcc gccacgaccc cgagggcacc ttccgcaacg 1380  
 ccttcctcga ccgctacttc cgccgctgag gatcc 1415

<210> 6  
 <211> 52  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> iniciador PCR  
 <440> 6

gcgctagccg gccccccggc acaggccatg accccgggcc agaagaactg gg 52

<210> 7  
 <211> 52  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> iniciador PCR

caggaaacag ctatgac 17

<210> 8  
 <211> 1370  
 <212> DNA  
 <213> Sequência de nucleotídeos codificando a fusão entre a sequência-sinal e SEQ ID N° 1 com sítios RE introduzidos

<400> 8  
 gcgctagccg gccccccggc acaggccatg accccgggcc agaagaactg ggccggcaac 60  
 atcaccttcg gcgccaagcg cctgtgcgtc ccgcgctccg tccgcgagct gcgcgagacc 120  
 gtggcgcgct ccggcgccgt gcgcccgtcg ggcacccgcc actcgttcaa caccgtcgcc 180  
 gacacctccg gcgaccacgt gtcgctggcc ggcctgcgcg gcgtcgctga catcgacgtc 240  
 ccgggcccggg ccgtgtccct gtccgcccgc ctgcgcttcg gcgagttcgc cgccgagctg 300  
 cacgcccgcg gcctggccct ggccaacctg ggctccctgc cgcacatctc cgtggcgggc 360

gcgggtcgcca ccggcaacca cggtccggc gtcggcaacc gtcacctggc gggcgccgtc 420  
 cgcgccctgt ccctgggtcac cgccgacggc gagaccgcga ccctgcgcgc caccgacgag 480  
 gacttcgccc gcgcccgtgt gtccctgggc gccctgggcg tcgtcacctc cctggagctg 540  
 gacctgggtcc cggccttcga ggtccgccag tgggtctacg aggacctgcc cgaggccacc 600  
 ctggccgccc gtttcgacga ggtcatgtcc gccgcctact ccgtgtccgt gttcaccgac 660  
 tggcgcccgc gcccggtcgc ccaggtctgg ctgaagcagc gcgtcggcga cgagggcgcc 720  
 cgctccgtca tgccggccga gtggctgggc gccgcctgg ccgacggccc gcgccacccg 780  
 gtccccggca tgcccgccgc caactgcacc gccagcagg gcgtccccgg cccgtggcac 840  
 gagcgctgc cgcacttcgc catggagtgc acccgtcca acggcgacga gctgcagtcc 900  
 gagtacttcg tcgcccgcgc ggacgccgtc gcggcctacg aggcgctggc ccgcctgcgc 960  
 gaccgcatcg ccccggtcct gcaggtctcc gagctgcga ccgtcgccgc cgacgacctg 1020  
 tggctgtccc cggccacagg ccgcgactcc gtgccttcc acttcacctg ggtcccgac 1080  
 gccgcgcgc tcgccccggt cgccggcgcc atcgaggagg ccctggcccc gttcggcgcc 1140  
 cgccgcact ggggcaaggt gttctccacc gccccgagg tcctgcgcac cctgtacctg 1200  
 cgctacgccc acttcgagga gctggtcggc cgccacgacc ccgagggcac cttccgcaac 1260  
 gccttcctcg accgtactt ccgcgcgtga ggatccgagc tccagctttt gttcccttta 1320  
 gtgaggggta attgcgcgct tggcgtaatc atgggtcatag ctgtttcctg 1370

<210> 9  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> iniciador PCR

<400> 9  
 gcccatatga gcgacatcac ggtcacc 27

<210> 10  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> iniciador PCR

<400> 10  
 ggatcctcag cccgcgagca cccc 24

<210> 11  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> iniciador PCR

<400> 11  
 gccatgggcg acatcacggt caccaac 27

<210> 12  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador PCR  
  
 <400> 12  
 atggatcctc agcccgcgag cacccc 26  
  
 <210> 13  
 <211> 1268  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> SOX de Streptomyces lividans e Streptomyces coelicor com a adi-  
 ção dos sítios de clonagem NCO<sub>1</sub> na metionina inicial  
 <400> 13  
 gccatgggcg acatcacggt caccaactgg gccggcaaca tcacgtacac ggcgaaggaa 60  
 ctgctgctgg cgcaactcct ggacgcgctg cgggccctgg tggcggacag cgccaggggtg 120  
 cgggtgctgg gcagcgggca ctccttcaac gagatcgccg agccgggcca cgggggtgtc 180  
 ctgctgtcgc tggcgggctt gccgtccgtg gtggacgtgg acacggcggc ccgtacgggtg 240  
 cgggtcggcg gcggtgtgcg gtacgcggag ctggcccggg tggtgacgc gcggggcctg 300  
 gcgctgccga acatggcctc gctgccgcac atctcggtcg ccgggtcggg gccaccgggc 360  
 acccacgggt cgggggtggg caacggttcg ctggcctcgg tggtgccgca ggtggagctg 420  
 gtcaccgcgg acggttcgac cgtggtgatc gcgcggggcg acgagcgggt cggcggggcg 480  
 gtgacctcgc tcggcgcgct gggcggtgtg acgtcgctca cactcgacct ggagccggcg 540  
 tacgagatgg aacagcacgt cttcaccgag ctgccgctgg ccgggttgga cccggcgacg 600  
 ttcgagacgg tgatggcggc ggcgtacagc gtgagtctgt tcaccgactg gcgggcccc 660  
 gggttccggc aggtgtggct gaagcggcg accgaccggc cgctggacgg tttcccgtac 720  
 gcggccccgg ccgccgagaa gatgcatccg gtgccgggca tgcccgcggg gaactgcacg 780  
 gagcagttcg ggggtgccgg gccctggcac gagcggctgc cgcaactccg cgcggagttc 840  
 acgcccagca gcggtgccga gttgcagtcg gactacctga tgccccggga gcacgccctg 900  
 gccgccctgc acgcgatgga cgcgatacgg gagacgctcg cgccggtgct ccagacctgc 960  
 gagatccgca cggtcgccgc cgacgcgcag tggctgagcc cggcgtacgg gcgggacacc 1020  
 gtggccgcgc acttcacctg ggtcgaggac acggcggcgg tgctgccggt ggtgcggcgg 1080  
 ctggaggagg cgctcgtccc cttcgcggcc cgtccgcaact gggggaagggt gttcaccgtc 1140  
 ccggcgggcg agctgcgtgc gctgtaccgg cggtggccg acttcggggc gctggccggg 1200  
 gcgctggacc cggcggggaa gttcaccaac gcgttcgtgc gcggggtgct cgcgggctga 1260  
 ggatccat 1268

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição que compreende uma primeira oxidase, um primeiro substrato e pelo menos uma oxidorredutase adicional, em que o primeiro substrato é oxidável pela primeira oxidase para formar peróxido de hidrogênio e um segundo substrato; e o segundo substrato pode ser convertido por pelo menos uma oxidorredutase adicional para formar um produto;  
em que o segundo substrato é oxidável pela oxidorredutase adicional para formar peróxido de hidrogênio e o dito produto.
2. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que o primeiro substrato é um poliol.
3. Composição de acordo com a reivindicação 2 ou 3, em que o poliol é um pentitol ou um hexitol.
4. Composição de acordo com a reivindicação 2 ou 3, em que o poliol é selecionado do grupo que consiste em hexitol, pentitol, sorbitol, xilitol, maltitol, manitol, galactitol, isomalte, lactitol, arabitol, eritritol e ribitol.
5. Composição de acordo com a reivindicação 4, em que o poliol é xilitol.
6. Composição de acordo com a reivindicação 4, em que o poliol é sorbitol.
7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o segundo substrato é um açúcar.
8. Composição de acordo com a reivindicação 7, em que o açúcar é um monossacarídeo ou um dissacarídeo.
9. Composição de acordo com a reivindicação 8, em que o açúcar é selecionado do grupo que consiste em glicose, xilose, maltose, manose, galactose, isomaltose, lactose, arabinose, eritrose e ribose.
10. Composição de acordo com a reivindicação 9, em que o açúcar é xilose ou glicose.
11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que a primeira oxidase é uma poliol oxidase.
12. Composição de acordo com a reivindicação 11, em que a primeira oxidase é selecionada do grupo que consiste em hexitol oxidase,

pentitol oxidase, sorbitol oxidase, xilitol oxidase, maltitol oxidase, manitol oxidase, galactitol oxidase, isomalte oxidase, lactitol oxidase, arabitol oxidase, eritritol oxidase e ribitol oxidase.

13. Composição de acordo com a reivindicação 11 ou 12, em que a primeira oxidase possui uma atividade de poliol oxidase (específica) de pelo menos 5 unidades/g de proteína quando se utiliza o respectivo substrato de poliol.

14. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, em que a poliol oxidase é sorbitol oxidase ou xilitol oxidase.

15. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 14, em que a poliol oxidase possui uma taxa de atividade específica sobre o respectivo poliol no açúcar correspondente maior que 1.

16. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 15, em que a poliol oxidase possui uma taxa de atividade específica sobre o respectivo poliol em glicose maior que 1.

17. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 16, em que a poliol oxidase possui uma atividade específica maior sobre o sorbitol quando comparada com aquela sobre o xilitol.

18. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 17, em que a poliol oxidase é derivada de uma cepa de *Streptomyces* ou *Xanthomonas*.

19. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, em que a primeira oxidase compreende uma sequência de polipeptídeo SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2 ou um homólogo, uma variante ou um fragmento da mesma.

20. Composição de acordo com a reivindicação 19, em que a primeira oxidase consiste em uma sequência de polipeptídeo SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 19.

21. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 20, em que o nível de atividade da primeira oxidase presente na composição (ou adicionada à composição) fica entre aproximadamente 0,1 e aproximadamente 200.000 unidades por kg da dita composição.

22. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, em que a oxidorreductase adicional é uma açúcar oxidase.

23. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que a açúcar-oxidase é selecionada do grupo que consiste em: carboidrato oxidase, oligossacarídeo oxidase, maltose oxidase, hexose oxidase, glicose oxidase, manose oxidase, galactose oxidase, isomaltulose oxidase, lactose oxidase, arabinose oxidase, eritrose oxidase, pentose oxidase, xilose oxidase e triose oxidase.

24. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 ou 23, em que a açúcar-oxidase é selecionada do grupo que consiste em: EC 1.1.3.4 glicose oxidase, EC 1.1.3.5 hexose oxidase, EC 1.1.3.9 galactose oxidase, EC 1.1.3.10 piranose oxidase, EC 1.1.3.11 L-sorbose oxidase e EC 1.1.3.40 D-manitol oxidase.

25. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, em que a quantidade de pelo menos uma oxidorreductase adicional comparada à quantidade da primeira oxidase tal como a poliol oxidase presente na dita composição é maior que 1, como medida pelo número respectivo de unidades de enzima presentes na dita composição.

26. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, em que a presença do produto obtido partindo do segundo substrato não reduz a taxa de produção de peróxido de hidrogênio a partir da oxidação do primeiro substrato pela primeira oxidase.

27. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, em que o produto obtido partindo do segundo substrato é uma lactona, uma dialdose ou um desidro açúcar.

28. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, em que a composição é comestível, preferencialmente uma composição alimentícia.

29. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28 para uso como um medicamento.

30. Produto para cuidado oral que compreende uma composição como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 29 e pelo menos um

ingrediente adicional utilizado nos produtos para cuidado oral.

31. Produto para cuidado oral de acordo com a reivindicação 30, em que o produto para cuidado oral está na forma selecionada do grupo que consiste em: goma de mascar, um líquido para limpeza bucal, um spray bu-  
5 cal, um trocisco, uma pastilha, um produto refrescante bucal, um spray nasal e uma pasta oral.

32. Produto para cuidado oral de acordo com a reivindicação 30 ou 31, que compreende xilitol e/ou sorbitol.

33. Produto cosmético que compreende a composição como de-  
10 finido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28 e pelo menos um ingredi-  
ente adicional utilizado nos produtos cosméticos.

34. Produto para alveamento da pele, dos pelos ou dos dentes que compreende a composição como definido em qualquer uma das reivindi-  
cações 1 a 28 e pelo menos um ingrediente adicional utilizado nos produtos  
15 para alveamento e/ou branqueamento da pele, dos cabelos ou dos dentes.

35. Processo cosmético para alvejar e/ou branquear tecido ex-  
terno de mamífero, que compreende o contato do tecido externo de mamífe-  
ro com uma composição como definido em qualquer uma das reivindicações  
1 a 28 ou um produto como definido em qualquer uma das reivindicações 30  
20 a 34 em uma quantidade e uma duração adequadas para alvejar e/ou bran-  
quear o tecido externo de mamífero.

36. Processo cosmético de acordo com a reivindicação 35, em que o tecido externo de mamífero é selecionado do grupo que consiste em dentes, cabelos e pele.

25 37. Detergente ou produto alvejante, adequado para uso em tecido que não é vivo, que compreende a composição como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28 e pelo menos um ingrediente adicional utilizado em detergente ou produtos alvejantes.

30 38. Produto de tinta, tal como uma tinta marítima, decorativa ou protetora, que compreende a composição como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28 e pelo menos um ingrediente adicional utilizado em tinta.



39. Pesticida que compreende a composição como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28 e pelo menos um ingrediente adicional utilizado em pesticidas.

5 40. Alimento humano ou animal que compreende a composição como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28.

41. Uso de uma composição como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28 ou de um produto para cuidado oral de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 32, para a produção de peróxido de hidrogênio.

10 42. Uso de acordo com a reivindicação 41, em que o dito uso ocorre em um produto para cuidado oral para fornecer efeitos de alveijamento e/ou branqueamento dos dentes e/ou vida útil estendida e/ou efeitos antimicrobianos/antibacterianos antes ou durante o uso.

15 43. Uso de acordo com a reivindicação 41, em que o dito uso ocorre em um produto comestível para fornecer efeitos pré-bióticos benéficos quando consumido por um indivíduo mamífero e/ou uma vida útil prolongada.

20 44. Uso de acordo com a reivindicação 41, em que o dito uso ocorre em um produto cosmético para fornecer uma vida útil prolongada e/ou é capaz de alvejar e/ou branquear tecido externo de mamífero e/ou possui um efeito antimicrobiano/antibacteriano quando aplicado na pele humana.

25 45. Uso de acordo com a reivindicação 41, em que o dito uso ocorre em um detergente para aumentar as capacidades alvejantes, alvejantes ou desinfetantes do detergente quando utilizado em um material que não é vivo.

46. Uso de acordo com a reivindicação 41, em que o dito uso ocorre em um produto de tinta que exibe melhor conservação antes ou após a aplicação.

30 47. Uso de acordo com a reivindicação 41, em que o dito uso ocorre em um produto pesticida que exibe maior capacidade de prevenir, reduzir ou matar pragas microbianas.

48. Uso de acordo com a reivindicação 41, em que o dito uso

ocorre em um produto alimentício, tal como produtos laticínios, tais como leite, creme, queijo, soro de leite, iogurte, manteiga ou ovo, tal como gema de ovo ou clara de ovo.

49. Uso de acordo com a reivindicação 41, em que a composição é utilizada para a desinfecção geral de alimento humano ou animal ou ambientes de alimentos humanos ou animais, tais como a lavagem de frutas e vegetais ou a lavagem e a desinfecção de carcaças de animais e produtos alimentícios derivados das mesmas.

50. Processo para a preparação de uma composição como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, que compreende a mistura de uma primeira oxidase como definida em qualquer uma das reivindicações anteriores e um primeiro substrato como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores e pelo menos uma oxidoredutase adicional como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores e uma matriz adequada.

51. Processo de acordo com a reivindicação 50, em que a matrix é comestível.

52. Processo de acordo com a reivindicação 50 ou 51, em que a composição é selecionada do grupo que consiste em um medicamento, um produto para cuidado oral e uma bebida.

53. Processo de acordo com a reivindicação 50 ou 51, em que a composição é um produto alimentício, tal como produtos laticínios, tais como leite, creme, queijo, soro de leite, iogurte, manteiga ou ovo, tal como gema de ovo e clara de ovo.

54. Processo de acordo com a reivindicação 50, em que a matriz é um ingrediente ou um produto detergente ou alvejante.

55. Processo de acordo com a reivindicação 50, em que a matriz é uma tinta, tal como uma tinta marítima ou decorativa.

56. Processo de acordo com a reivindicação 50, em que a matriz é uma matriz pesticida.

57. Uso de uma composição como definida nas reivindicações 1 a 28, na produção de um medicamento para o tratamento ou para a preven-

ção de um distúrbio médico selecionado dentre: doença gengival, gengivite, síndrome do intestino irritável, intolerância à lactose, câncer de cólon, alto teor de colesterol no sangue, alta pressão sanguínea, hipertensão, infecção, inflamação e deficiências nutricionais.

5                    58. Produto embalado que compreende a composição como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28, em que a dita composição é mantida em um ambiente com oxigênio limitado dentro do dito produto embalado de forma a prevenir ou reduzir a produção de peróxido de hidrogênio dentro do dito produto embalado.

10                   59. Kit de partes que compreende os componentes a seguir: primeira enzima, pelo menos uma enzima adicional e um primeiro substrato, em que a primeira enzima e o primeiro substrato estão isolados um do outro, em que o primeiro substrato é oxidável pela primeira oxidase para formar peróxido de hidrogênio e um segundo substrato; e o segundo substrato pode  
15 ser convertido por pelo menos uma oxidorreductase adicional para formar um produto; em que o segundo substrato é oxidável pela oxidorreductase adicional para formar peróxido de hidrogênio e o dito produto.

20                   60. Processo de produção de peróxido de hidrogênio, o processo compreendendo a mistura de uma primeira oxidase e um primeiro substrato e pelo menos uma oxidorreductase adicional e uma matriz adequada, sob condições adequadas para a produção tanto de peróxido de hidrogênio quanto de um segundo substrato a partir da oxidação do primeiro substrato devido à atividade da primeira oxidase, em que o segundo substrato pode ser convertido por pelo menos uma oxidorreductase adicional em peróxido de  
25 hidrogênio adicional e o produto.

61. Processo de acordo com a reivindicação 60, em que a etapa de mistura compreende a mistura dos componentes do kit de partes como definido na reivindicação 59.

30                   62. Processo de acordo com a reivindicação 60 ou 61, em que o dito processo compreende a exposição da composição contida dentro do produto embalado como definido na reivindicação 57 a um fornecimento exógeno de oxigênio.

## RESUMO

Patente de Invenção: "COMPOSIÇÃO QUE COMPREENDE UM SISTEMA ENZIMÁTICO ACOPLADO".

5 A presente invenção refere-se a uma composição que compreende um sistema enzimático acoplado para a produção rápida e eficiente de peróxido de hidrogênio através do acoplamento de um primeiro sistema enzimático capaz de gerar peróxido de hidrogênio, a um segundo sistema enzimático que utiliza o produto sem ser peróxido de hidrogênio do primeiro sistema enzimático e opcionalmente é capaz de gerar peróxido de hidrogênio adicional.

10