



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

**(11) BR 112014010222-8 B1**



**(22) Data do Depósito: 31/10/2012**

**(45) Data de Concessão: 12/04/2022**

**(54) Título:** FORMULAÇÃO DE ENZIMA LÍQUIDA E PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO

**(51) Int.Cl.:** C12N 9/10.

**(73) Titular(es):** VALIO LTD.

**(72) Inventor(es):** KIRSI RAJAKARI; KAI HOTAKAINEN; PÄIVI MYLLÄRINEN.

**(86) Pedido PCT:** PCT FI2012051048 de 31/10/2012

**(87) Publicação PCT:** WO 2013/064736 de 10/05/2013

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 28/04/2014

**(57) Resumo:** FORMULAÇÃO DE ENZIMA LÍQUIDA E PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO. A presente invenção refere-se a uma formulação de enzima líquida, particularmente a uma formulação líquida e estável que compreende uma enzima de reticulação e/ou uma enzima modificadora de proteínas do leite. Particularmente, a presente invenção refere-se a uma formulação de transglutaminase líquida e estável. Em adição, a presente invenção refere-se a um método para a preparação de uma formulação de enzima líquida.

**“FORMULAÇÃO DE ENZIMA LÍQUIDA E PROCESSO PARA  
SUA PREPARAÇÃO”**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[0001] A presente invenção refere-se a uma formulação de enzima líquida, particularmente a uma formulação líquida e estável que compreende uma enzima de reticulação e/ou uma enzima modificadora de proteínas do leite. Particularmente, a presente invenção está relacionada a uma formulação de transglutaminase líquida e estável. Em adição, a presente invenção está relacionada a um método para a preparação de uma formulação de enzima líquida.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[0002] As formulações de enzima que compreendem uma enzima de reticulação e/ou uma enzima modificadora de proteínas do leite, como lacase, tirosinase, peroxidase, sulfidril oxidase ou glicose oxidase estão comercialmente disponíveis em formulações em pó ou líquidas. No entanto, a transglutaminase e produtos de proteína glutaminase, no momento, estão no mercado apenas em forma de pó. O uso de produtos de enzima em pó não é totalmente aceito devido à formação de poeira em todas as instalações de produção. Os riscos à saúde que resultam da poeira têm causado preocupação, especialmente entre os trabalhadores.

[0003] Uma transglutaminase derivada da cepa de *Streptoverticillium mobaraense* e um processo para a sua preparação foi revelada na patente europeia de número 0 379 606 B1. Além disto, um método para a produção de uma transglutaminase utilizando um gene isolado da cepa de *Streptomyces lydicus* é revelado na patente europeia de número 0 777 726 B1.

[0004] Um dos problemas associados à formulação de uma enzima, como uma transglutaminase em forma líquida é a falta de estabilidade da formulação. Além disto, uma das desvantagens associadas

às presentes formulações de enzima líquida é que elas contêm, pelo menos, um conservante.

### **BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

[0005] Deste modo, um objetivo da presente invenção é fornecer uma formulação de enzima líquida que compreende transglutaminase e/ou outra enzima de modificação e/ou reticulação de proteína do leite como lacase, tirosinase, peroxidase, sulfidril oxidase, glicose oxidase ou proteína glutaminase, que são estáveis e podem ser armazenadas pelo período de tempo requerido de uma formulação comercial em temperatura ambiente ou em temperaturas de uma geladeira e/ou um freezer.

[0006] Outro objetivo da presente invenção é fornecer uma formulação líquida que compreende uma transglutaminase que é estável e pode ser armazenada pelo período de tempo requerido de uma formulação comercial em temperatura ambiente ou em temperaturas de uma geladeira e/ou um freezer.

[0007] Um objetivo adicional da presente invenção é fornecer um método para a preparação de uma formulação estável de enzima líquida que compreende transglutaminase e/ou outra enzima de modificação e/ou reticulação de proteína do leite.

[0008] Ainda outro objetivo da presente invenção é fornecer um método para a preparação de uma formulação líquida e estável que compreende uma transglutaminase.

[0009] Os objetivos da invenção são alcançados pelas formulações e métodos expostos nas reivindicações independentes. As modalidades preferenciais da invenção são descritas nas reivindicações dependentes.

[0010] Outros objetivos, detalhes e vantagens da presente invenção se tornarão aparentes a partir da descrição detalhada a seguir e dos exemplos.

## DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0011] As enzimas de modificação e/ou reticulação de proteína do leite como transglutaminase, lacase, tirosinase, peroxidase, sulfidril oxidase e modificações de proteína do leite de catalisador de proteína glutaminase. Parece haver sinergismo na ação destas enzimas e também com a ação da glicose oxidase. Sem se ater a qualquer teoria, a glicose oxidase e/ou peroxidase parecem catalisar reações em que o oxigênio é liberado através da formação de peróxido de hidrogênio. O oxigênio pode, então, catalisar (oxidar) a reticulação de tirosinase.

[0012] As enzimas de modificação e/ou reticulação de proteína do leite como transglutaminase, lacase, tirosinase, peroxidase, sulfidril oxidase e a proteína glutaminase, opcionalmente junto com glicose oxidase são usadas na produção de peixe processado, carne, produtos à base de ovos, pastas e patês, frutas, grãos, vegetais, produtos de soja, produtos cereais, pão e produtos de padaria.

[0013] As enzimas de modificação e/ou reticulação de proteína do leite a seguir são todas relevantes no processamento de alimentos lácteos ou outras categorias de alimento.

[0014] As transglutaminases são uma família de enzimas (EC 2.3.2.13) que catalisam a geração de ligações covalentes entre a glutamina e os resíduos de aminoácido lisina presentes nas moléculas de proteína. Quando as ligações são formadas, a amônia é liberada.

[0015] As lacases (EC 1.10.3.2) derivadas de fungos e bactérias, como o fungo *Trametes hirsute*, catalisam a reticulação entre carboidratos e proteínas (oxidação de componentes aromáticos e cisteína) com aplicações no processamento de alimento para redução de potencial alergênico, por exemplo.

[0016] As tirosinases (EC 1.14.18.1) são enzimas que catalisam a oxidação de fenóis como a tirosina, com aplicações no processamento de alimento para redução de potencial alergênico, por exemplo.

[0017] As peroxidases (EC 1.11.1.7) são uma família de enzimas que catalisam a oxidação de compostos aromáticos com aplicações no processamento de alimento para redução de potencial alergênico, por exemplo.

[0018] A sulfidril oxidase (EC 1.8.3.3) catalisa a formação de ligações de dissulfeto, oxidação de glutationa.

[0019] A proteína glutaminase catalisa a desamidação da glutamina de ligação de proteína, e a glutamina é convertida em ácido glutamínico.

[0020] A glicose oxidase catalisa a formação de reticulações de proteína e a gelificação oxidativa de pentosanos.

[0021] As enzimas de modificação e/ou reticulação de proteína do leite como transglutaminase, lacase, tirosinase, peroxidase, sulfidril oxidase e proteína glutaminase são utilizadas em indústrias de laticínios para estabilizar a estrutura de produtos à base de leite. Além do uso em indústrias de laticínio, estas enzimas são utilizadas na produção de peixe processado, carne e produtos à base de ovo, pastas e patês, frutas, grãos e vegetais, produtos de soja, produtos de cereais, pão e produtos de padaria. Consequentemente, uma formulação de enzima líquida é adequada para a produção de laticínios, peixe processado, carne, ovo, pastas e patês, frutas, grãos e vegetais, soja, cereais, pão e produtos de padaria, por exemplo. O uso de uma preparação de enzima líquida seria mais prático e vantajoso que o uso de formulação em pó, especialmente na fabricação em escala industrial.

[0022] As transglutaminases são mais ativas na variação de pH de 5,2 a 8. Quando uma transglutaminase líquida é armazenada com pH 5,2 ou com pH 8, a enzima perde sua atividade muito rápido. Após armazenar uma transglutaminase com pH 5,2 por 7 dias à temperatura ambiente ou com a temperatura de uma geladeira, permanece apenas metade da atividade.

[0023] A invenção é baseada na descoberta de que, quando uma transglutaminase, tirosinase ou proteína glutaminase é armazenada em uma suspensão de um poliol, como glicerol ou sorbitol, e água na variação de pH de 4,4 a 5,1, sua atividade permanece moderadamente durante armazenamento em temperatura ambiente e excelente durante armazenamento em temperaturas de uma geladeira e/ou um freezer. Além disso, a invenção é baseada na descoberta de que, quando uma transglutaminase junto com uma proteína glutaminase é armazenada em uma suspensão de glicerol e água com pH 4,6, a atividade das enzimas permaneceu moderada durante armazenamento em temperatura ambiente e excelente durante armazenamento em temperaturas de uma geladeira e/ou um freezer. Além disto, a invenção é baseada na descoberta de que, quando uma transglutaminase junto com uma proteína glutaminase e tirosinase é armazenada em uma suspensão de glicerol e água com pH 4,6, a atividade das enzimas permaneceu moderada durante armazenamento à temperatura ambiente e excelente durante armazenamento nas temperaturas de uma geladeira e/ou um freezer. Além disso, as preparações líquidas da presente invenção também são microbiologicamente estáveis durante o armazenamento em temperatura ambiente e em temperaturas de uma geladeira e/ou um freezer. Além disto, observou-se, de forma inesperada, que a formulação de enzima líquida da presente invenção manteve sua atividade enzimática e pureza microbiológica (sem crescimento microbiano) sem qualquer conservante na formulação nas temperaturas de uma geladeira e/ou um freezer.

[0024] Em uma modalidade, a formulação de enzima líquida em suspensão de poliol-água tem valor de pH que varia de 4,4 a 5,1. Em outra modalidade da presente invenção, o pH da formulação de enzima situa-se na faixa de 4,4 a 4,8. Em uma modalidade da presente invenção, o pH da formulação de enzima é de 4,4. Em outra modalidade da presente invenção, o pH da formulação de enzima é de 4,6. Em outra modalidade da presente

invenção, o pH da formulação de enzima é de 4,8. Em ainda outra modalidade da presente invenção, o pH da formulação de enzima é de 5,1.

[0025] Os polióis, como glicerol, sorbitol, xilitol e/ou manitol podem ser utilizados na formulação de enzima líquida da presente invenção. Misturas de polióis, como as misturas de glicerol e de outros polióis também são operáveis.

[0026] A suspensão de um poliol e água ou uma mistura de dois ou mais polióis e água adequada para formular a preparação de enzima da presente invenção pode conter o(s) poliol(óis), como glicerol, sorbitol, xilitol e/ou manitol de 25% até 100%, preferencialmente de 50% até 100% (p/p%). Em uma modalidade da presente invenção, a enzima é dissolvida em uma suspensão de 25% de poliol/ 75% de água (p/p). Em outra modalidade da presente invenção, a enzima é dissolvida em uma suspensão de 50% de poliol/ 50% de água (p/p). Em ainda outra modalidade da presente invenção, a enzima é dissolvida em uma suspensão de 75% de poliol/25% de água (p/p).

[0027] A suspensão de glicerol e água adequada para a formulação da preparação de enzima da presente invenção pode conter glicerol de 25% até 100%, preferencialmente de 50% até 100%. Em uma modalidade da presente invenção, a enzima é dissolvida em uma suspensão de 25% de glicerol/75% de água. Em outra modalidade da presente invenção, a enzima é dissolvida em uma suspensão de 50% de glicerol/50% de água. Em ainda outra modalidade da presente invenção, a enzima é dissolvida em uma suspensão de 75% glicerol/25% de água. Além disto, a suspensão de sorbitol e água adequada para a formulação da preparação de enzima da presente invenção pode conter sorbitol de 25% até 100%, preferencialmente de 50% até 100%. Em uma modalidade da presente invenção, a enzima é dissolvida em uma suspensão de 25% de sorbitol/75% de água. Em outra modalidade da presente invenção, a enzima é dissolvida em uma suspensão de 50% de sorbitol/50% de água. Em ainda outra modalidade da presente

invenção, a enzima é dissolvida em uma suspensão de 75% de sorbitol/25% de água.

[0028] O pH da suspensão pode ser ajustado para a variação desejada com um ácido aprovado para uso alimentício, como ácido láctico, GDL (glucono-deltalactona), ácido cítrico, ácido acético, ácido oxálico, ácido málico, ácido pantotênico, ácido propanoico e/ou ácido clorídrico, ou quaisquer misturas/combinações dos mesmos sob a forma de ácido ou sal. Em uma modalidade da presente invenção, ácido láctico é utilizado para o ajuste de pH.

[0029] A preparação de enzima líquida da presente invenção também pode conter, opcionalmente, um conservante como benzoato de sódio. Em uma modalidade, a preparação da enzima líquida da presente invenção não contém quaisquer conservantes adicionais, ou seja, a formulação é livre de conservantes. Em outra modalidade, a preparação da enzima líquida da presente invenção contém um conservante adicional. Em outra modalidade, a preparação da enzima líquida da presente invenção contém benzoato de sódio com um conservante. Em ainda outra modalidade, a preparação de enzima líquida da presente invenção contém benzoato de sódio em quantidade de 0,1 a 1 %, preferencialmente em uma quantidade de 0,7% como um conservante.

[0030] A preparação de enzima líquida da presente invenção mantém sua atividade em temperatura ambiente por mais ou menos duas semanas, em uma geladeira por mais ou menos 1,5 a seis meses, pelo menos, e em freezer por um mínimo de 5 meses até 24 meses.

[0031] Em uma modalidade da invenção, a formulação líquida compreende uma enzima de modificação e/ou reticulação de proteína do leite. Em outra modalidade da invenção, a formulação líquida compreende duas ou mais enzimas de modificação e/ou reticulação de proteína do leite. Em uma modalidade, a enzima de modificação e/ou reticulação de proteína do leite na formulação da presente invenção é transglutaminase. Em outra

modalidade, a enzima de modificação e/ou reticulação de proteína do leite na formulação da presente invenção é tirosinase. Em outra modalidade, a enzima de modificação e/ou reticulação de proteína do leite na formulação da presente invenção é proteína glutaminase. Em outra modalidade, enzimas de modificação e/ou reticulação de proteína do leite na formulação da presente invenção são transglutaminase e proteína glutaminase. Em outra modalidade, as enzimas de modificação e/ou reticulação de proteína do leite na formulação da presente invenção são transglutaminase e tirosinase. Em outra modalidade, enzimas de modificação e/ou reticulação de proteína do leite na formulação da presente invenção são transglutaminase e lacase. Em ainda outra modalidade, enzimas de modificação e/ou reticulação de proteína do leite na formulação da presente invenção são transglutaminase, proteína glutaminase e lacase. Em ainda outra modalidade, as enzimas de modificação e/ou reticulação de proteína do leite na formulação da presente invenção são transglutaminase, proteína glutaminase e tirosinase.

[0032] A presente invenção também se refere a um método para preparar uma formulação de enzima líquida em que uma enzima de modificação e/ou reticulação de proteína do leite é adicionada a uma suspensão de poliol-água que tem um valor de pH na faixa de 4,4 a 5,1. Em uma modalidade da presente invenção, o pH da suspensão de água-poliol é ajustada a um valor que varia de 4,4 a 5,1. Em uma modalidade da presente invenção, o pH da suspensão de poliol-água é ajustado para um valor que varia de 4,4 a 4,8. Em uma modalidade da presente invenção, o pH da formulação de enzima é ajustado para pH 4,4. Em outra modalidade da presente invenção, o pH da suspensão de poliol-água é ajustado para pH 4,6. Em ainda outra modalidade da presente invenção, o pH da suspensão de poliol-água é ajustado para pH 4,8. Em ainda outra modalidade da presente invenção, o pH da formulação de enzima líquida é ajustado para pH 5,1.

[0033] A suspensão de poliol e água adequada para o método da presente invenção pode conter poliol de 25% até 100% (%, em peso). Em

uma modalidade da presente invenção, a enzima é dissolvida em de suspensão de 25% de poliol-água. Em outra modalidade da presente invenção, a enzima é dissolvida em uma suspensão de 50% de poliol-água. Em ainda outra modalidade da presente invenção, a enzima é dissolvida em uma suspensão de 75% de poliol-água. Em uma modalidade da invenção, o poliol é glicerol. Em outra modalidade da presente invenção, o poliol é sorbitol.

[0034] No presente método, o pH da suspensão pode ser ajustado para a gama desejada com um ácido aprovado para uso alimentício (classificação alimentícia, GRAS), como ácido lático, GDL, ácido cítrico, ácido acético, ácido oxálico, ácido málico, ácido pantotênico, ácido propanoico e/ou ácido clorídrico ou quaisquer misturas/combinações dos mesmos sob a forma de ácido ou sal. Em uma modalidade, o ácido lático é utilizado no método da presente invenção para o ajuste de pH.

[0035] No método da presente invenção, também um conservante, como benzoato de sódio, pode ser incluído opcionalmente na formulação de enzima líquida. Em uma modalidade, o método da presente invenção não compreende a adição de um conservante. Em outra modalidade, o método da presente invenção compreende a adição de benzoato de sódio como um conservante. Em ainda outra modalidade, o método da presente invenção compreende adição de benzoato de sódio, em uma quantidade de 0,1 a 1%, preferencialmente em uma quantidade de 0,7% como um conservante.

[0036] Em uma modalidade, o método da presente invenção compreende os passos a seguir:

- a) o pH de uma suspensão de poliol-água é ajustado com ácido(s) de classificação alimentar para um valor que varia de 4,4 a 5,1;
- b) uma enzima de modificação e/ou reticulação de proteína do leite é adicionada à suspensão;
- c) Um conservante é adicionado, opcionalmente.

[0037] Em outra modalidade, o método da presente invenção compreende os passos a seguir:

- a) uma enzima de modificação e/ou reticulação de proteína do leite é adicionada à suspensão de poliol-água;
- b) o pH da suspensão é ajustado com ácido(s) da classificação alimentar para um valor que varia de 4,4 a 5,1;
- c) um conservante é adicionado, opcionalmente.

[0038] Em uma modalidade pra presente invenção, uma enzima de modificação e/ou reticulação de proteína do leite é adicionada à suspensão. Em outra modalidade da presente invenção, duas ou mais enzimas de modificação e/ou reticulação de proteína do leite são adicionadas à suspensão. Em uma modalidade, a enzima de modificação e/ou reticulação de proteína do leite é transglutaminase. Em outra modalidade, a enzima de modificação e/ou reticulação de proteína do leite é tirosinase. Em outra modalidade, a enzima de modificação e/ou reticulação de proteína do leite é proteína glutaminase. Em outra modalidade, as enzimas de modificação e/ou reticulação de proteína do leite são transglutaminase e proteína glutaminase. Em outra modalidade, as enzimas de modificação e/ou reticulação de proteína do leite são transglutaminase e tirosina. Em outra modalidade, as enzimas de modificação e/ou reticulação de proteína do leite são transglutaminase e lacase. Em ainda outra modalidade, as enzimas de modificação e/ou reticulação de proteína do leite são transglutaminase, proteína glutaminase e lacase. Em ainda outra modalidade, as enzimas de modificação e/ou reticulação de proteína do leite são transglutaminase, proteína glutaminase e tirosinase.

[0039] A invenção será descrita em mais detalhes através dos exemplos a seguir. Os exemplos não são construídos para limitar as reivindicações de qualquer maneira, seja qual for.

## **EXEMPLOS**

### **EXEMPLO COMPARATIVO 1**

Preparação da transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em suspensão de glicerol-água de pH 5,2 a 4°C.

[0040] A transglutaminase derivada da cepa de *Streptoverticillium mobaraense* que tem atividade de 16.300 nkat/g (Activa® TG, Ajinomoto), foi dissolvida em atividade de 274 nkat/g em 50% de suspensão glicerol-água (p/p) em que o pH foi ajustado para 5,2 com ácido láctico. A atividade da enzima foi monitorada por 7 dias. Adicionalmente, foi monitorada a pureza microbiológica da preparação.

[0041] No 7º dia, apenas 50% da atividade da transglutaminase havia restado. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservação de sete dias.

#### EXEMPLO COMPARATIVO 2

Preparação da transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em água com pH 5,2 a 4°C.

[0042] A transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) foi dissolvida em atividade de 274 nkat/g em água que tem pH 5,2 ajustado com ácido láctico. A suspensão também continha 0,7% de benzoato de sódio como um conservante.

[0043] A atividade da enzima foi monitorada por 50 dias. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0044] No 50º dia, apenas 43% da atividade da transglutaminase havia restado. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservante de 50 dias.

#### EXEMPLO 1

Preparação da transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em suspensão de glicerol-água com pH 4,6 a 4°C.

[0045] A transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) foi dissolvida em atividade de 274 nkat/g em 50% de suspensão de glicerol-água (p/p) que teve pH 4,6 ajustado com ácido láctico.

[0046] A atividade da enzima foi monitorada por 7 dias. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0047] No 7º dia, 100% da atividade da transglutaminase havia restado. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservação de sete dias.

#### EXEMPLO 2

Preparação da transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em suspensão de glicerol-água com pH 4,6 a 4°C.

[0048] A transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) foi dissolvida em atividade de 326 nkat/g em suspensão de glicerol-água de 50% (p/p) que tem pH 4,6 ajustado com ácido lático. A suspensão também continha 0,7% de benzoato de sódio como um conservante.

[0049] A atividade da enzima foi monitorada por 50 dias. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0050] No 50º dia, 100% da atividade da transglutaminase havia restado. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservação de cinquenta dias.

#### EXEMPLO 3

Preparação da transglutaminase Activa® TG-YG (Ajinomoto) em suspensão de glicerol-água com pH 4,6 a 4°C.

[0051] A formulação líquida da transglutaminase foi preparada pela dissolução da preparação da transglutaminase da Ajinomoto Activa® TG-YG, que contém uma transglutaminase derivada de cepa de *Streptoverticillium mobaraense* e glutatona em suspensão de 50% de glicerol-água (p/p) e que tem pH 4,6 ajustado com ácido lático.

[0052] A atividade da enzima foi monitorada por 50 dias. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0053] No 50º dia, 100% da atividade da transglutaminase havia restado. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservação de cinquenta dias.

#### EXEMPLO 4

Preparação da transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em suspensão de glicerol-água com pH 4,4 a 4°C.

[0054] A preparação líquida da transglutaminase foi preparada pela dissolução da transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em atividade de 274 nkat/g em suspensão de 50% de glicerol-água (p/p) em que o pH foi ajustado com ácido lático para um pH 4,4.

[0055] A atividade da enzima foi monitorada por 50 dias. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0056] No 50º dia, 100% da atividade da transglutaminase havia restado. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservação de 50 dias.

#### EXEMPLO 5

Preparação da transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em suspensão de glicerol-água com pH 4,8 a 4°C.

[0057] A preparação líquida de transglutaminase foi preparada pela dissolução de transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em atividade de 274 nkat/g em suspensão de 50% de glicerol-água (p/p), em que o pH foi ajustado com ácido lático para pH 4,8.

[0058] A atividade da enzima foi monitorada por 50 dias. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0059] No 50º dia, 100% da atividade da transglutaminase havia restado. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservante de 50 dias.

#### EXEMPLO 6

Preparação da transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em suspensão de glicerol-água com pH 5,1 a 4°C.

[0060] A preparação líquida da transglutaminase foi preparada pela dissolução de transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em atividade de

274 nkat/g em suspensão de 50% de glicerol-água (p/p) em que o pH foi ajustado com ácido lático para pH 5,1 a 4°C.

[0061] A atividade da enzima foi monitorada por 50 dias. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0062] No 50º dia, 100% da atividade da transglutaminase havia restado. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservante de cinquenta dias.

#### EXEMPLO 7

Preparação da transglutaminase Saprona TG (Yiming Biological Products Co, China) em suspensão glicerol-água em pH 4,6 a 4°C.

[0063] A preparação líquida da transglutaminase foi preparada pela dissolução da transglutaminase Yiming Saprona TG derivada da cepa de *Streptoverticillium mobaraense* em suspensão de 50% de glicerol-água (p/p), em que o pH foi ajustado com ácido lático para pH 4,6.

[0064] A atividade da enzima foi monitorada por 50 dias. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0065] No 50º dia, 100% da atividade da transglutaminase havia restado. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservante de 50 dias.

#### EXEMPLO 8

Preparação da transglutaminase Reactyn CL 1000 TG (Campus SpA, Itália) em suspensão de glicerol-água em pH 4,6 a 4°C.

[0066] A preparação líquida da transglutaminase foi preparada pela dissolução da transglutaminase Campus Reactyn CL 1000 TG em suspensão de 50% de glicerol-água (p/p), em que o pH foi ajustado com ácido lático para pH 4,6.

[0067] A atividade da enzima foi monitorada por 50 dias. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0068] No 50º dia, 100% da atividade da transglutaminase havia restado. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservante de 50 dias.

#### EXEMPLO 9

Preparação da transglutaminase TG-PG (Ajinomoto) em suspensão de glicerol-água em pH 4,6 a 4°C.

[0069] A preparação líquida foi preparada pela dissolução em suspensão de 50% de glicerol-água (p/p) que tem pH 4,6 ajustado com ácido lático, uma preparação de enzima TG-PG (Ajinomoto). A preparação TG-PG (Ajinomoto) contém uma transglutaminase derivada da cepa de *Streptoverticillium mobaraense* e uma proteína glutaminase derivada de *Chryseobacterium proteolyticum*.

[0070] A atividade da transglutaminase da preparação líquida foi de 100 U/g e a atividade de proteína glutaminase da preparação líquida foi de 100 U/g.

[0071] A atividade da enzima foi monitorada por 50 dias. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0072] No 50º dia, 100% da atividade da transglutaminase e 100% da atividade da proteína glutaminase haviam restado. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservação de 50 dias.

#### EXEMPLO 10

Preparação da transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em suspensão de 75% de glicerol/25% de água com pH 4,6 a 4°C.

[0073] A transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) foi dissolvida em atividade de 326 nkat/g em suspensão de 75% de glicerol/25% de água (p/p) que tem pH 4,6 ajustado com ácido lático.

[0074] A atividade da enzima foi monitorada por 50 dias a uma temperatura de 4°C. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0075] No 50º dia, 100% da atividade da transglutaminase havia restado. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservação.

#### EXEMPLO 11

Preparação da transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em suspensão de 25% de glicerol/75% de água com pH 4,6 a 4°C.

[0076] A transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) foi dissolvida em atividade de 326 nkat/g em suspensão de 25% de glicerol/75% de água (p/p) que tem pH 4,6 ajustado com ácido lático.

[0077] A atividade da enzima foi monitorada por 50 dias a uma temperatura de 4°C. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0078] No 50º dia, 72% da atividade da transglutaminase havia restado. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservação.

#### EXEMPLO 12

Preparação da transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em suspensão de glicerol-água com pH de 4,4 a 4,8 a 22°C.

[0079] As preparações líquidas da transglutaminase foram preparadas pela dissolução de transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em atividade de 2789 nkat/g em suspensão de 50% de glicerol-água (p/p), em que o pH foi ajustado com ácido lático para pH 4,4 a 4,8.

[0080] A atividade enzimática das preparações foi monitorada por 13 semanas à temperatura de 22°C. Adicionalmente, a pureza microbiológica das preparações foi monitorada.

[0081] Depois de duas semanas de armazenamento, a atividade da enzima nas preparações começou a diminuir. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservação.

#### EXEMPLO 13

Preparação da transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em suspensão de glicerol-água em pH 4,4 – 4,8 a 4°C.

[0082] A preparação líquida da transglutaminase foi preparada pela dissolução de transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em atividade de 2789 nkat/g em suspensão de 50% de glicerol-água (p/p), em que o pH foi ajustado com ácido lático para pH 4,4 a 4,8.

[0083] A atividade das preparações da enzima foi monitorada por 26 semanas com a temperatura de 4°C. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0084] Após 26 semanas de armazenamento, havia restado 89% da atividade da enzima. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservante.

#### EXEMPLO 14

Preparação da transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em suspensão de glicerol-água com pH 4,4 a 4,8 a -20°C.

[0085] A preparação líquida da transglutaminase foi preparada pela dissolução de transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em atividade de 2789 nkat/g em suspensão de 50% de glicerol-água (p/p), em que o pH foi ajustado com ácido lático para pH 4,4 – 4,8.

[0086] A atividade de enzima das preparações foi monitorada por 26 semanas com a temperatura de -20°C. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0087] Após 26 semanas de armazenamento, havia restado 97% da atividade da enzima. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservante.

#### EXEMPLO 15

Preparação da tirosinase em suspensão de glicerol-água com pH 4,6 a 4°C.

[0088] A enzima tirosinase foi dissolvida em atividade de 100 U/g em suspensão de 50% de glicerol-água (p/p), em que o pH foi ajustado com ácido lático para pH 4,6.

[0089] A atividade da enzima foi monitorada por 50 dias. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0090] Após o 50º dia de armazenamento, havia restado 97% da atividade da tirosinase. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservante.

#### EXEMPLO 16

Preparação da proteína glutaminase em suspensão de glicerol-água com pH 4,6 a 4°C.

[0091] A proteína glutaminase foi dissolvida em atividade de 100 U/g em suspensão de 50% de glicerol-água (p/p), em que o pH foi ajustado com ácido lático para pH 4,6.

[0092] A atividade da enzima foi monitorada por 50 dias. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0093] Após o 50º dia de armazenamento, 96% da atividade da proteína glutaminase havia restado. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservante.

#### EXEMPLO 17

Preparação da transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em suspensão de sorbitol-água com pH 4,6 a 4°C.

[0094] A preparação líquida da transglutaminase foi preparada pela dissolução de transglutaminase Activa® TG (Ajinomoto) em atividade de 274 nkat/g em suspensão de 50% de sorbitol-água (p/p), em que o pH foi ajustado com ácido lático para pH 4,6.

[0095] A atividade da enzima foi monitorada por 50 dias. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0096] No 50º dia, 100% da atividade da transglutaminase havia restado. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante os 50 dias do teste de conservante.

#### EXEMPLO 18

Preparação de enzima líquida que contém TG-PG (Ajinomoto) e tirosinase em suspensão de glicerol-água com pH 4,6 a 4°C.

[0097] A preparação líquida foi preparada pela dissolução em suspensão de 50% de glicerol-água (p/p) que tem pH 4,6 ajustado com ácido láctico, uma preparação de enzima TG-PG (Ajinomoto) e tirosinase. A atividade de transglutaminase da preparação líquida foi de 100 U/g, a atividade da proteína glutaminase da preparação líquida foi de 100 U/g e a atividade da tirosinase da preparação líquida foi de 100 U/g.

[0098] A atividade da enzima foi monitorada por 50 dias. Adicionalmente, a pureza microbiológica da preparação foi monitorada.

[0099] No 50º dia, 100% da atividade da transglutaminase, 100% da atividade da proteína glutaminase e 98% da atividade da tirosinase haviam restado. Nenhum crescimento microbiano foi detectado durante o teste de conservante.

[0100] Será óbvio para um versado na técnica que, conforme a tecnologia avança, o conceito moderno pode ser implementado de diversas formas. A invenção e suas modalidades não se limitam aos exemplos descritos acima, mas podem variar dentro do escopo das reivindicações.

## REIVINDICAÇÕES

1. Formulação de enzima líquida **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende pelo menos uma enzima de reticulação e/ou modificação de proteína do leite, selecionada a partir de transglutaminase, tirosinase ou proteína glutaminase, em suspensão de poliol-água que compreende de 25% a 100% (p/p) de poliol, selecionado a partir de glicerol e sorbitol, e que tem um valor de pH na faixa de 4,4 a 5,1.

2. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a suspensão de poliol-água compreende de 50% a 75% de poliol.

3. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o pH é de 4,6.

4. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a formulação compreende transglutaminase e proteína glutaminase.

5. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a formulação compreende, também, lacase e/ou tirosinase.

6. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a formulação é livre de conservantes.

7. Método para a preparação de uma enzima líquida, conforme definida na reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma enzima de modificação e/ou reticulação de proteína de leite, selecionada a partir de transglutaminase, tirosinase ou proteína glutaminase, é adicionada a uma suspensão de poliol-água que compreende de 25% a 100% (p/p) de poliol, selecionado a partir de glicerol e sorbitol, e que tem um valor de pH que varia na faixa de 4,4 a 5,1.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a suspensão de poliol-água compreende de 50% a 75%

de poliol.

9. Método, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pH é de 4,6.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a enzima é transglutaminase e proteína glutaminase.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que também é adicionada lacase e/ou tirosinase.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 11, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a formulação é livre de conservantes.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o método compreende os passos a seguir:

a) o pH da suspensão de poliol-água é ajustado com ácido de qualidade alimentar para um valor na faixa de 4,4 a 5,1;

b) pelo menos uma enzima de modificação e/ou de reticulação de proteína do leite é adicionada à suspensão,

c) um conservante é adicionado, opcionalmente.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o método compreende as etapas a seguir:

a) pelo menos uma enzima de modificação e/ou reticulação de proteína do leite é adicionada a uma suspensão de poliol-água que compreende de 25% a 100% de poliol,

b) o pH da suspensão é ajustado com ácido(s) de qualidade alimentar para um valor na faixa de 4,4 a 5,1,

c) um conservante é adicionado, opcionalmente.