



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

(21) **PI0707327-5 A2**

(22) Data de Depósito: 23/01/2007
(43) Data da Publicação: 03/05/2011
(RPI 2104)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 9/10
C12N 9/38

(54) Título: **GALACTOSIDADE COM ATIVIDADE ALFA-GALACTOSILTRANSFERASE**

(30) Prioridade Unionista: 31/01/2006 GB 0601901.2

(73) Titular(es): Clasado Inc.

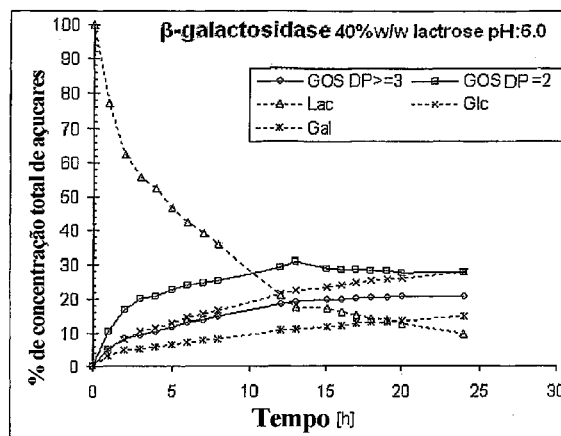
(72) Inventor(es): Athanasios K. Goulas, Georgios Tzortzis, Theodoros Goulas

(74) Procurador(es): Nellie Anne Daniel Shores

(86) Pedido Internacional: PCT GB2007000178 de 23/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/088324 de 09/08/2007

(57) **Resumo:** GALACTOSIDASE COM ATIVIDADE ALFA-GALACTOSILTRANSFERASE. A presente invenção refere-se a β -galactosidase com atividade trans-galactosilação isolada de *Bifidobacterium bifidum*. A β -galactosidase é capaz de converter lactose numa mistura de oligossacarídeos que são ligados na posição β , e produzem, inesperadamente o dissacarídeo α -ligado, galactobiose. A mistura pode ser incorporada em numerosos produtos alimentares ou alimentos para animais com a finalidade de melhorar a saúde intestinal promovendo o crescimento de bifidobactérias no intestino, e reprimindo o crescimento da microflora patogênica.



"GALACTOSIDASE COM ATIVIDADE ALFA-GALACTOSILTRANSFERASE"
PRODUTO E PROCESSO

A presente invenção refere-se a uma β -galactosidade com atividade trans-galactosilação capaz de converter lactose numa mistura de oligossacarídeos os quais são ligados em β e produzem, inesperadamente o dissacarídeo α -ligado α 1-6 galactobiose. Em particular, ela refere-se a uma β -galactosidase isolada de uma cepa recentemente descoberta de *Bifidobacterium bifidum*.

A invenção refere-se, particularmente, a seqüências de Dna codificando a enzima β -galactosidade isolada na enzima codificada por uma seqüência de DNA e a uma célula hospedeira compreendendo a seqüência de DNA ou um vetor recombinante incorporando a seqüência de DNA. A invenção também se refere ao uso da enzima codificada por uma seqüência de DNA, ou da célula hospedeira contendo uma seqüência de DNA ou um vetor recombinante para produzir oligossacarídeos.

Bifidobactérias colonizam naturalmente o trato intestinal inferior, um meio que é rico em mono- e dissacarídeos visto esses açúcares serem referencialmente consumidos pelo hospedeiro e micróbios presentes no trato intestinal superior. De modo a sobreviver no trato intestinal inferior, as bifidobactérias produzem várias espécies de exo- e endoglicosídes na superfície ligada e/ou formas extracelulares, pelas quais elas pode utilizar diversos carboidratos.

Além da atividade hidrolase, algumas enzimas das bifidobactérias demonstram atividade transferase. Esta atividade de transglicosilação das glicosídes é extensivamente usada para a síntese enzimática de vários oligossacarídeos, que provaram agir como fatores promotores de crescimento das bifidobactérias.

Sabe-se que, membros das bifidobactérias produzem enzimas β -galactosídes, que estão envolvidas no metabolismo bacteriano da lactose. Møller, P.L et al., em Appl & Environ Microbial, 2001) 62, (5), 2276-2283, descreve o isolamento e caracterização de três genes β -galactosídes de uma cepa de *Bifidobacterium bifidum*. Eles descobriram, que todas as três β -galactosídes eram capazes de catalisar a formação de galacto-oligossacarídeos β -ligados por trans-galactosilação.

Dumortier et al, em Carbohydrate Research 201, (1990), 115-123 descreveu a formação de oligossacarídeos beta-ligados por uma reação de trans-galactosilação durante a hidrólise da lactose com *Bifidobacterium bifidum*, DSM 20456. Sua análise da estrutura da mistura de oligossacarídeos produzida demonstrou que, as ligações eram ligações β -(1 $\rightarrow$ 3), β -(1 $\rightarrow$ 6) e β (1 $\rightarrow$ 4)-D-galactosil. Dumortier sugeriu que, os compostos produzidos por *Bifidobacterium bifidum* estavam envolvidos na aderência das bactérias no intestino grosso.

Uma cepa de *Bifidobacterium bifidum* foi encontrada que é capaz de produzir uma atividade enzimática galactosídes que converte a lactose numa mistura nova de galacto-

oligossacarídeos que, contém inesperadamente até 35% dos dissacarídeos incluindo galabiose (Gal (α 1-6), Gal. Este dissacarídeo é conhecido (ver Paton, J C e Paton, A W (1998) Clin Microbiol, Revs. 11 450-479; Carlsson, K A (1989), Ann. Reviews Biochem. 58, 309-350) por ser um antiadesivo capaz de prevenir a aderência de toxinas por exemplo, toxina Shiga e patógenos tais como *E. coli* à parede do intestino.

Esta cepa de *B Bifidum* foi depositada sob número de acesso NCIMB 41171 no National Collection of Industrial & Marine Bactéria, Aberdeen UK em 31 de março de 2003. está ainda descrita na Patente Britânica n° 2 412 380.

Foi agora descoberto que, esta cepa de *B bifidum* produz várias β -galactosidases, uma das quais, apresentou inesperadamente atividade α -galactosiltransferase. Esta enzima produz uma série de diferentes oligossacarídeos que são β -ligados, porém ela produz também o dissacarídeo α -ligado, galabiose.

De acordo com a invenção é proporcionada uma seqüência de DNA que codifica uma proteína com uma seqüência de aminoácido conforme se vê na SEQ ID NO: 2 ou hibridiza sob condições rigorosas à seqüência do DNA que codifica esta proteína. A seqüência de DNA é dada em SEQ ID NO: 1 ou pode compreender um fragmento ou degenerativos desta.

A frase "degenerativo" significa uma seqüência de DNA que é pelo menos 50% homóloga à SEQ ID NO: 1, preferivelmente de 50 a 98% de homologia, mais preferivelmente de 75 a 95% de homologia.

Essa seqüência de DNA pode compreender substituições, adições ou deleções de nucleotídeo que resultam em menos que 60%, preferivelmente menos que 45%, mais preferivelmente menos que 25% de alteração na seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO: 2. substituições de nucleotídeo podem resultar em substituições de aminoácido conservadoras.

De acordo com um segundo aspecto da invenção, é proporcionada uma enzima codificada por uma seqüência de DNA conforme acima. Uma tal enzima pode compreender a seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO: 2 ou um seu fragmento.

De acordo com um terceiro aspecto da invenção, é proporcionado um vetor recombinante preferivelmente um vetor de expressão, compreendendo uma seqüência de DNA conforme supra. Um tal vetor pode ser incorporado numa célula hospedeira tal como célula bacteriana, de levedura ou de fungo. Alternativamente, a seqüência de DnA pode ser incorporada numa célula hospedeira como essa. Uma célula hospedeira adequada pode ser selecionada de *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, por exemplo, *Bacillus subtilis* ou *Bacillus circulans*, *Escherichia* e *Aspergillus*, por exemplo, *Aspergillus niger*.

Usando lactose como um substrato, a enzima codificada por uma seqüência de DNA como indicado acima produz uma mistura de dissacarídeos composto Gal(β 1-3) Glc,

Gal (β 1-3), Gal, Gal (β 1-6) Gal, e Gal(α 1-6)Gal. Também está presente na mistura de oligossacarídeos, os trissacarídeos Gal(β 1-6) Gal (β 1-4) Glc, Gal(β 1-3) Gal(β 1-4) Glc, tetrassacarídeo Gal (β 1-6)Gal (β 1-4) Glc e pentassacarídeo Gal (β 1-6) Gal(β 1-6) Gal(β 1-6) Gal(β 1-4) Glc.

5 A enzima ou a célula hospedeira conforme descrito supra pode ser empregada para produzir uma mistura de dissacarídeos, incluindo Gal (α 1-6 Gal (galabiose) que pode fazer parte de um produto para melhorar a saúde do intestino. Um tal produto pode ser selecionado do grupo consistindo de produtos do leite, (por exemplo, leite em natura, leite em pó tal como leite em pó integral, leite em pó desnatado, leite em pó acrescido de gordura, soro em
10 pó, leite para crianças, fórmula infantil, sorvete, iogurte, queijo, laticínios fermentados), bebidas tais como suco de fruta, alimentos infantis, cereais, pão, biscoitos, confeitos, bolos, suplementos alimentares, suplementos dietéticos, produtos comestíveis simbióticos, produtos comestíveis prebióticos,. alimentos de animais, ração para aves ou de fato, qualquer outro alimento ou bebida.

15 Alternativamente, o oligossacarídeo assim produzido pode ser usado para preparação de um medicamento por exemplo, na forma de comprimido ou cápsula, para prevenção da aderência de patógenos ou toxinas produzidos por patógenos à parede do intestino. O medicamento pode ser administrado a um paciente, por exemplo, seguinte a um curso de tratamento com antibiótico, o qual freqüentemente, altera ou até mesmo destrói a flora intestinal saudável normal.
20

De acordo com um aspecto adicional da invenção, é proporcionado um processo para produzir uma enzima conforme acima, compreendendo a cultura de uma célula hospedeira conforme indicado acima num meio de cultura adequado sob condições que permite a expressão da enzima e recuperar a enzima resultante da cultura.

25 A invenção também se dirige a um processo para produzir uma mistura de oligossacarídeos, incluindo o dissacarídeo Gal (α 1-6) – Gal (galabiose), compreendendo o contato da enzima conforme acima ou uma célula hospedeira conforme acima com um material contendo lactose sob condições que levem à formação da mistura de oligossacarídeos.

Material adequado contendo lactose pode ser selecionado de lactose comercialmente disponível, leite integral, leite semi-desnatado, leite desnatado, leite acrescido de
30 gordura e soro, permeado de soro, Tais produtos de leite podem ser obtidos de vacas, búfalos, ovelhas ou cabras. Leite acrescido de gordura é tido como um leite integral, que foi desnatado para remover a gordura do leite, que é a seguir substituída por adição de gordura ou óleo vegetal.

35 Descrição Sucinta dos Desenhos

A Figura 1 mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO: 1) de β -galactosidase de *Bifidobacterium bifidum* da invenção, e

A figura 2 mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 2) correspondente à sequência de nucleotídeo da Figura 1.

A Figura 3 é um gráfico mostrando o decurso de tempo da reação durante a síntese de galacto-oligossacarídeo com β -galactosidase e 40% (peso/peso) de lactose em tampão de fosfato a 0,1M a pH 6,0, como substrato, e

A Figura 4 mostra uma cromatografia de troca de anion de alto desempenho da mistura de galacto-oligossacarídeo sintetizada pela β -galactosidase de *B. bifidum* NCIMB 41171 usando 40% (p/p) de lactose em tampão de fosfato 0,1M a pH 6,0, como substrato. (Glc = glicose, Gal = galactose, Lac = lactose, $\alpha(1,6)$ galactobiose, DP = grau de polimerização).

DNA genômico foi isolado da cepa *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) usando o método de Lawson et al., (1989) Ferns Microbiol Letter, 65 (1-2), 41-45. O DNA foi digerido com enzimas e fragmentos de restrição com um tamanho máximo de 15 kbp foram ligados com vetor pSP72 que tinha sido digerido com a mesma enzima de restrição. células de *E. coli* foram transformadas com um vetor contendo inserções consistindo de DNA cromossomal digerido PstI, Eco RI, Bam HI, KpnI, SmaI ou HindIII de *B. bifidum*. Os clones com atividade β -galactosidase foram selecionados de placas de agar-agar Luria Bertani contendo para-nitrofenil, X- β -Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo) e isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG). As misturas de ligação com DnA cromossomal Bam HI deram origem a sete clones β -galactosidase positivos, um dos quais é identificado como pB1.

O seqüenciamento de DNA do fragmento de DNA inserido B1 foi realizado usando o método de terminação de cadeia dideóxi de Sanger (Russel P., 2002 iGenetics, Pearson Education, Inc, San Francisco, 187-189) usando o kit de seqüenciamento BigDye Terminator ciclo V.3.0 (Applied Biosystems, USA). A sequência de DNA de B1 é mostrada na Figura 1 (SEQ ID NO: 1).

O quadro de leitura aberto (ORF) foi localizado usando o descobridor ORF de NCBI (National Center of Biotechnology Information). A sequência de nucleotídeo da Figura 1 foi traduzida em todas os seis possíveis quadros de leitura e um quadro de leitura aberto de 1052 aminoácidos codificando uma β -galactosidase putativa foi identificado. A tradução está mostrada na Figura 2 (SEQ ID NO: 2).

A presente invenção será ainda descrita à guisa de referência aos seguintes exemplos:

EXEMPLO 1

Materiais e Métodos

Todas as preparações de reagentes químicos e meio usados por todo este teste foram obtidos de Sigma (Dorset, UK) Invitrogen (Paisley, UK), Oxoid (Basingstoke, UK), Qia-gen (West Sussex, UK) e Promega (Southampton UK).

Cepas Bacterianas

A cepa *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) foi mantida em pérolas criogênicas em tubos de Microbank a -70°C. Para experimentos posteriores, a cepa foi ressuscitada em agar Wilkinson Chalgren (WC) (Oxoid, UK) e meio TPY (meio de extrato de levedura tripti-
 5 case fitona) sendo cultivadas anaerobicamente CO₂ e N₂ (composição 80% e 20% respectivamente.) a 37°C por 48 horas. A morfologia da colônia e a ausência de contaminação foram testados por manchamento gram-

Cepas de *E. coli*

10 A cepa DH5a de *Escherichia coli* usada neste teste foi incubada de modo normal, sob condições aeróbicas a 37°C em agar-agar Luria Bertani (B) ou caldo (Sambrook J e Russel W. D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) e quando necessário, foi suplementado com antibióticos (100 µg/mL de ampicilina e/ou 15 µg/ml de cloranfenicol) e 40 µL de X-β-Gal a 2%, 7 µL de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo) IPTG que foi aplicado na superfície de uma placa de agar de 90 mm
 15 pré-fabricada.

A cepa DH5a de *E. coli* (Invitrogen, Paisley, UK) (genótipo: F ϕ 80*lacZ*Δ(*lacH*YA-argF)U169 recA1 extremidade A1 hsdR17(rk, mk)*phoA supE44 thi-1gyrA96relA1*λ⁻) é uma cepa positiva de α-galactosidase que foi usada em experimentos de expressão e para outras manipulações genéticas.

20 Extração de DNA Genômico de *Bifidobacterium bifidum*

DNA genômico foi isolado da cepa *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) usando o seguinte método em que foi preparado DNA cromossomal de pelota de célula coletada de 100 mL de caldo WC anaeróbico. As células foram ressuspensas em 10 mL de tampão TES (10 mM de Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM de NaCl, pH8) sendo tratadas com 200 µL de mistura lisozima/mutanolisina (4:1, lisozima 10 mg/mL mutanolisina 1 mg/mL) durante 30 minu-
 25 tos a 37°C. As células foram então tratadas com 200 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 200 µL de RNase (ambas 10 mg/mL) misturadas e incubadas por uma hora a 65°C. Finalmente as células foram tratadas com 2 mL de SDS a 10% e incubadas por 15 minutos a 65°C. 12 mL de fenol/clorofórmio foi adicionado, repetindo-se a extração até que a fase aquosa pudes-
 30 se ser facilmente separada da interfase. O DNA genômico foi precipitado com isopropanol e ressuspenso em 10 mM de Tris-HCl – 1mM de EDTA (pH8). O DNA genômico foi então digerido com enzimas de restrição, ligado ao pSP72 digerido com as mesmas enzimas e tratado com fosfatase alcalina. A digestão de DNA genômico de *B. bifidum* foi realizada usando *EcoRI*, *PstI*, *BamHI*, *SmaI* e *KpnI*. Misturas da ligação foram usadas para transforma-
 35 ção de clones positivos de *E. coli* DH5a e clones positivos de β-galactosidase foram identifi- cados como colônias azuis em placas contendo X-Gal.

Preparação de DNA Vetor

O vetor usado para a clonagem e expressão por todo este teste foi o pSP72 (Promega, Reino Unido) (Krieg, P.A. e Melton, D.A. (1987). In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods in Enzymology*. 155: 397-415).

Este vetor foi escolhido devido à falta de atividade complementar do α -fragmento de β -galactosidade que não é codificado em pSP72. Este vetor não porta o segmento curto de DNA de *E. coli* contendo a seqüência reguladora e a informação de codificação para os primeiros 146 aminoácidos de β -galactosidase, que, em combinação com cepas de *E. coli* (ou seja, DH5a) que expressam a parte carboxi-terminal desta β -galactosidase é conferida uma β -galactosidase ativa (complementação α).

O vetor foi digerido com as seguintes enzimas de restrição: *Pst*I, *Bam*HI, *Hind*III, *Sma*I, *Kpn*I e *Eco*RI de acordo com as instruções do fabricante usando um excesso de dez vezes da enzima sobre o DNA (unidades de enzima: μ gr DNA igual a dez unidades da enzima por um μ gr do DNA de plasmídeo ou dez unidades de enzima por 0,5 pmol do DNA de plasmídeo). Após inativação da enzima por calor (20 minutos a 65°C) os padrões de restrição foram analisados por análise de eletroforese de gel horizontal. A presença de um único fragmento no gel indicou a digestão completa do vetor e a única digestão de restrição dele.

A digestão suficiente do vetor foi testada ainda, por transformação de moléculas não ligadas para células DH5a de *E. coli* competente. O número de colônias formadas em placas agar-agar LB suplementado com ampicilina (100 μ g/ml) era um indicador das moléculas não digeridas e da referência esperada durante experimentos subsequentes.

Os vetores foram ainda desfosforilados com fosfatase alcalina intestinal de bezerro (CIAP (Promega, Southamptons, UK) de acordo com as instruções do fabricante. A eficiência do tratamento foi testada por auto-ligação (com DNA ligase de Bacteriófago T4 de acordo com as instruções do fabricante) seguinte a transformação em células DH5a. O número de colônias formadas mostrou o número de moléculas recirculadas (vetor não clonado) e uma subtração dos acima com as colônias formadas sem tratamento do vetor com CIAP mostrou o número de vetores não-desfosforilados.

Construção de Biblioteca de DNA Genômico

DNA genômico foi parcialmente digerido com seis enzimas de restrição que reconhecem, freqüentemente a ocorrência de seqüências hexanucleotídeo dentro de DNA procariótico. *Eco*RI, *Bam*HI, *Pst*I, *Kpn*I, *Sma*I e *Hind*III são endonucleases de restrição tipo II que reconhecem, especificamente, as seqüências 5'G/AATTC'3', 5'G/GATCC'3', 5'CTGCA/G'3', 5'GGTAC/C'3', 5'CCC/GGG'3' e 5'A/AGCTT'3', respectivamente, e fazem rupturas de dupla fita dentro dessas seqüências gerando projeções 5' de quatro nucleotídeos, AATT, GATC, AGCT para *Eco*RI, *Bam*HI e *Hind* III, respectivamente, e projeções 3' ACGT, GTAC para *Pst*I e *Kpn*I, respectivamente e extremidades obtusas para *Sma*I.

Todas essas enzimas eram ativas e capazes de clivar DNA apenas na presença de íons magnésio divalentes. Esses íons eram o único co-fator necessário.'

Digestão de Restrição de DNA

Todas as digestões de restrição das amostras de DNA genômico foram incubadas por 2 horas a 37°C e, finalmente inativadas pelo calor a 65°C por 20 minutos. As reações foram então resfriadas à temperatura ambiente e a quantidade apropriada de tampão de carregamento foi adicionado, seguido por mistura suave com um tubo capilar de vidro vedado. As soluções então foram introduzidas aos poços de um gel de agarose a 0,8% (suprimento de energia 4-5 volts/cm durante 14-16 horas) e o tamanho do DNA digerido foi estimado com aquele dos padrões de DNA de 1 kbp (Promega, Reino Unido) (Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2002)).

Purificação dos fragmentos gerados após digestão de restrição

A purificação do fragmento das misturas de reação e dos geles de agarose foi feita mediante uso do kit de extração de gel QIAEX da Qiagen (West Sussex, UK). Os protocolos estão descritos com detalhes no manual do fabricante.

Ligação do DNA e Transformação

Após purificação dos fragmentos de DNA com o kit de extração de gel Qiaex, eles foram ligados com vetor pSP72 tratado com CIAP. Para a ligação, quantidades apropriadas de DNA foram transferidas para tubos de microcentrifuga de 0,5 mL estéreis como mostrado na Tabela 1.

Tubo	DNA
A	Vetor (15 fmoles [~ 29,7 ng])
B	Vetor (15 fmoles ~29,7 ng DNA) mais inserto (estranho 15 fmoles ~69,3 ng)
C	controle pUC (0.056 fmoles [~100 pg])

A relação molar do vetor do DNA de plasmídeo para inserir fragmento de DNA deve ser ~1:1 na reação de ligação. A concentração do DNA final deve ser ~10 ng/μl.

Tabela 1: Misturas de ligação. O Tubo A mostra o número de Dna de vetor auto-ligado, que deve ser subtraído do número total de transformantes após transformação. O Tubo B mostra a ligação do vetor com os fragmentos de DNA e o tubo C mostra o controle na ordem que a eficiência de transformação deve ser calculada.

Antes de cada ligação os fragmentos de Dna foram aquecidos a 45°C por 5 minutos para liquefazer e qualquer terminal coeso que recozeu durante a preparação do fragmento. Uma relação molar do DNA vetor:inserto de 1:1 foi escolhida para todas as reações de ligação e o conjunto de reação foi feito de acordo com as instruções da Promega.

Aos tubos A e B 1,0 μL de tampão de ligação 10X e 0,5 unidades Weiss de ligase

DNA T4 (Promega, UK) foram adicionados e o volume de ligação foi ajustado para 10 µL com água grau de biologia molecular. Aos tubos C 1,0 µl de tampão de ligação 10X foram adicionados e o volume de ligação foi ajustado em 10 µ com água grau de biologia molecular.

Fragmentos de DnA foram adicionados aos tubos juntamente com a água e a seguir aquecidos a 45°C por 5 minutos para fundir qualquer terminal coeso que tivesse recozido durante a preparação. O DNA foi resfriado para 0°C antes do restante dos reagentes de ligação serem adicionados e as misturas de reação foram incubadas durante a noite a 16°C (Sambrook e Russell, 2001).

Após precipitação do etanol e purificação dos fragmentos ligados (de modo a remover a mistura de ligação que ocasiona redução da eficiência de transformação) as transformações foram realizada de acordo com as instruções de Hanahan. ~50 ng do DNA ligado em solução 5 µl foi adicionado para 100 µl de células DH5a de E. coli competente. Após tratamento térmico e expressão do gene resistente para ampicilina, as células foram espalhadas sobre a superfície das placas LB contendo ampicilina (100 µgr/mL), X-α-Gal (40 µl de 2% X-β-Gal) e IPTG (7µl de 20% IPTG).

Mediu-se o número de transformantes de cada reação de ligação. O número de transformantes normalmente obtidos do tubo C foi de $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ cfu/µg enquanto o tubo A foi 500-6009 cfu/µg. O número de transformantes no tubo A era uma indicação do tratamento eficiente do DNA vetor. O número de transformantes no tubo B estava numa faixa de $2-4 \times 10^4$ cfu/µg.

Número de Transformantes

As misturas de ligação com DNA cromossomal *Pst*I deu origem a clones positivos para β-galactosidase de ~2500 transformantes selecionados enquanto com *Bam*HI deu origem a 7 clones positivos (~1500 scr. transformantes), *Eco*RI deu origem a 3 clones positivos (~1300 scr. transformantes), *Kpn*I deu origem a 7 clones positivos (~2000 scr. transformantes), *Sma*I deu origem a 3 clones positivos (~1600 scr transformantes) e *Hind*III deu origem a 2 clones positivos (~1200 scr transformantes).

Digestão Positiva do Clone

De modo a identificar os diferentes genes β-galactosidase, os plasmídeos isolados dos clones positivos foram digeridos de acordo com a seguinte tabela.

N.T. : copiar a fórmula da página 11, onde:

Digestion = digestão

Samples = amostras

Enzymes = enzimas

A primeira letra (p) indica plasmídeo e o gene de inserto, enquanto a segunda letra (P,B,E,S,K) indica a enzima de restrição que foi usada para isolamento do respectivo clone

do DNA genômico.

A análise por eletroforese de gel dos fragmentos gerados após digestão demonstrou que os plasmídeos pB1, pP1, pP2 e pPO11 tem cada um, um inserto, que codifica uma diferente β -galactosidase. Os clones contendo pB1 foram usados para análise futura.

5 Seqüenciamento do DNA

O seqüenciamento do DNA foi realizado com o método de terminação de cadeia di-deóxi de Sanger mediante emprego do kit de seqüenciamento de ciclo BigDye Terminator v.3.0 (Applied Biosystems, (USA) e analisado com o ABI Prism, 3100, um sistema de análise de DNA com base na fluorescência, que incorpora eletroforese capilar.

10 As extremidades 5'e 3' dos fragmentos de DNA inserido foram seqüenciadas com iniciadores específicos para vetor. Os insertos foram ainda seqüenciados mediante uso de Genome Priming System (GPS-1) (New England Biolabs, UK), GPS-1 é um sistema in vitro com base no Transposon TN7 que utiliza TnsABC Transposase para inserir o Transposon aleatoriamente ao DNA alvo. A relação de massa doador: DNA alvo de 1:4 foi usada de acordo com as instruções do fabricante. O número de plasmídeos isolados para seqüenciamento após inserção do Transiniciador ao plasmídeo alvo foi 25. Este número foi calculado de acordo com as instruções do fabricante e presume-se uma profundidade de 5 vezes de cobertura.

20 Para a inserção do plasmídeo pB1 de um transposon-inserto de $\cong$ 1699 pares de base (bp) na posição a jusante 973 pares de base do sítio de clonagem múltiplo do vetor usado, eliminou completamente atividade β -galactosídeo indicando que o códon inicial estava posicionado entre o MCS (sítio de clonagem múltipla) do vetor e o sítio do transposon, enquanto a inserção do inserto na posição a jusante 841 pares de base do MCS levou à formação de uma β -galactosidade ativa indicando que o códon inicial existe entre 841 pares de base e 973 pares de base a jusante do MCS. A atividade enzimática foi eliminada completamente com a inserção do inserto na posição 3565 pares de base a jusante do MCS indicando que o códon de interrupção fica a jusante desta posição. Além disso, as inserções nas posições 1239 pb, 1549 pb, 1683 pb, 1832 pb, 2108 pb, 2189 pb, 2270 pb, 2340 pb, 2414 pb, 2574 pb, 2648 pb, 2734 pb, 2807 pb e 3410 pb eliminam completamente a atividade enzimática.

A mistura da reação de seqüenciamento continha aproximadamente 400-600ng de DNA de plasmídeo, 3.2 pmol da solução do iniciador e 4 μ l da solução BygDye Terminator.

Identificação do Quadro de Leitura Aberto

35 O quadro de leitura aberto (ORF) de B1 foi localizada mediante uso do descobridor ORF de NCBI. O código genético bacteriano foi usado e o comprimento do quadro foi determinado em 100 pb. A seqüência de nucleotídeo foi traduzida em todas os seis possíveis quadros e um quadro de leitura aberto de 1052 aminoácidos codificando uma β -

galactosidase putativa foi identificado (A tradução é mostrada na Figura 2).

Exemplo 2

Síntese com a enzima clonada β -galactosidase isolada de *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 4117 em hospedeiro *E. coli* (cepa DH5a)

5 A síntese descrita a seguir, a menos que de outro modo indicado, foi realizada com as células hospedeiras DH5a de *E. coli* totais após tratamento da biomassa de *E. coli* (coletada por centrifugação a 10.000 g) com tolueno a uma concentração de 2000 ppm de modo a aumentar a permeabilidade celular e também a tornar as células inviáveis por destruição de suas membranas citoplasmáticas. A biomassa de *E. coli* foi preparada conforme descrito
10 no Exemplo 1, sob "cepas de *E. coli*".

Síntese com a enzima clonada

A síntese com β -galactosidase foi realizada a uma concentração do substrato de 40% (p/p) de concentração inicial de lactose. A solução de síntese foi preparada em tampão de fosfato a 0,1 M a pH 6,8 (ou tampão de citrato a 0,1M pH 6,2 ou tampão de fosfato de
15 potássio pH 6,8)). A síntese foi realizada a 40°C em banho de água com agitação a 150 rpm. O pH ótimo para a enzima específica foi escolhido com base nas medições da atividade (usando o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo como substrato) de uma preparação enzimática específica a valores variados de pH.

Para a síntese galacto-oligossacarídeo, 5 mL de uma suspensão de célula DH5a de
20 *E. coli* (com uma atividade de 2,2 U/mL) foi centrifugado a (10.000 g) para coleta da biomassa sendo descartado o sobrenadante. Esta biomassa foi ressuspensa com 10 g de solução de substrato (p/p) a 40% de modo a realizar a síntese.

As concentrações dos diferentes açúcares presentes na mistura durante a síntese são mostrada na Figura 3. A cromatografia de troca de anion com alto desempenho acoplada com cromatogramas de detecção por amperimetria pulsada (HPAEC-PAD) de misturas
25 de galacto-oligossacarídeos sintetizada pela β -galactosidase clonada de *B. bifidum* (NCIMB 41171 são mostrada s na figura 4. As concentrações de açúcar na mistura galacto-oligossacarídeos no ponto de tempo ótimo da síntese são dadas na Tabela 1.

Tabela 1

30 Composição de carboidrato da síntese galacto-oligossacarídeo a 40% (p/p) da concentração inicial de lactose no ponto de tempo onde se observou a concentração máxima de oligossacarídeo.

Síntese inicial do substrato	GOS DP $\geq$ 3	GOS DP = 2	Lac	Glc	Gal
% (p/p)	Concentração (% de açúcares totais)				
40	20,45	27,64	12,73	25,90	13,28

Lac: Lactose, Glc: glicose, Gal: galactose, DP: grau de polimerização

Listagem de Sequência

<110> LINDSAY, Clare L

<120> **"Produto e Processo"**

<130> 13906WO:GH

<150> GB 0601901.2

<151> 31-01-2006

<160> 2

<170> PatentIn **versão** 3.4

<210> 1

<211> 7281

<212> DNA

<213> Bifidobacterium bifidum

<220>

<221> gene

<222> (1)..(7281)

<400> 1

ggatccggtg aacgcgccga gcgcggtgta cgtgctgcgc tcgtgcgagt cggaggagat	60
cgcgggggatc atgccccagt aggagatgtc gcgcagcgag tagatcacgt cgagcaggat	120
gaacacgatg acgaacagga ccatgaacac gccggtgttc acatccacga ggccgaacag	180
gccggtgaac accatgatca gcaggatgcc aggcacgatg ccgccaatga actgccacgg	240
gcggaaccgg ccccagcggg tgttcgtgtt gtccacgagg ttgccgagca gcgggtcgag	300
aaagatctcc gcgatgcgga tgaccaccac gagtccggtg atcaccgcga tgaggcgttt	360
ggcaagcgtc ttgtccacgt cgatgaacag cgcggtggtc acgaacgtga tgaagaacgt	420
gctcattgtg ttgtagaacg cggcctggcc caggttaccg aatgcgtatg cgatcttctg	480
acccgtgttc cgcgtgggct gcggccttcc ggtcgtttcc gtgtgttgtg tgggtggatcc	540
gctcatggtg tgggtggcctc cttgcgacct gtaaagaatc cgtgcgcgtg aaccgctccg	600
atcccgcaaa gcgtgagtat agaactttct tgaaaaagta gaaaactata ccgcgtgtcg	660
caaatcatgc caacgttctg caaccggcac tccgtgtgga tgagtaaggt ttgaagcctg	720
cttgatgtgc ttgaatctta agaaatccac gtattctgca tgttgaggc cttgtgccgc	780
gaaatgctgg aaagaatttg cgcaatcaag taacaatatt tatccttggt gtacaaggaa	840
cccgattcaa cgaggttccc tactgcggc ggcaacgacg cgacgcaatc cgatgcgaaa	900
gcgaggacat catgaacaca accgacgatc agcggaagaa cggcgatccg atcgtctccc	960
cgtccatacc gacgacggca tggctcgccg acccgcgct gtacgcggtt caccggctcg	1020
acgcccattc cgatcatgcg tgctggtctc gtccccagt cgacggcgag agcacgaatc	1080
tcaggcagag ccttgacggc gaatggcggg tccgcgtcga gacggcgccg acgggcccgtt	1140
tccccgatgg gacgagcgac gggccggact ggatcagcga cgtgtcgcct ctgttcgccg	1200
cgcccggatt cgacgattcg tcgttctcac gcgtgcaggt gccctcgcat ctggagactg	1260

cggggctgct	tgccccgcag	tacgtgaacg	tgcagtaccc	atgggacgga	catgaggacc	1320
cgaaggcccc	ggccatcccc	gagcatggcc	atgtggcggt	ctaccggcgc	gagttcgacg	1380
cggatggcga	agtcgcccag	gccgtgcgcg	aagggcgccc	ggtgacgctt	accttcagg	1440
gcgcggccac	agccatctac	gtgtggctca	acggctcggt	cgttggctac	gccgaggact	1500
ccttcacgcc	cagcgagttc	gacgtgacgg	acgcgatcaa	ggtggacggc	aacgtgctgg	1560
cggtcgtctg	ctacgagtat	tcgagcgcga	gctggttggg	ggatcaggac	ttctggcgtc	1620
tgcacggcct	gttccgctcc	gtcgaactca	acgcgaggcc	cgccgccac	atcgccgacc	1680
tccatgccga	cgcgcgactg	gatctcgcca	catcaagggg	ttcgctctcg	ctggatgtgc	1740
tgatcgacgg	tgccgcgaac	gccgcgacgg	tcgacttcgc	actgtgggac	aagaacggca	1800
ccatcgctctg	gcacaccgcc	acgaaagcgg	acggaacgct	gcacgccgag	gccgagatcg	1860
atgacgcggc	gcatgaggac	gccgaacgcc	ccgacctgta	cgagctatcc	gtcaccctgc	1920
tcgacgcgga	cggcaagggtc	ctggagaccg	ctcgactctg	catcggcttc	cggcatgtgg	1980
ccatcgagga	cggcatcctc	aagctcaacg	gcaagcgcc	cgtgttccgt	ggcgtcaacc	2040
gccacgagtt	cgactgccgg	cgcgccggg	ccatcaccga	agaggacatg	ctgtgggaca	2100
tccgcttcat	gaagcgccac	aacatcaacg	cggcgcgcac	ctcgactat	ccgaaccagt	2160
cgcgctggta	cgagctgtgc	gacgaatacg	gcatctacct	gatcgacgag	accaatctgg	2220
agacccatgg	cagctggaac	agccccggcg	acatccccgt	gggaacctcc	gtccccgggtg	2280
acgacgaggg	ctggctgggg	gcgtgcatcg	accggctgga	cagcatgatc	ctgcgcgacc	2340
gcaaccatcc	cagcgtgctc	gtctggctcg	tgggcaacga	atcctacgcg	ggcgaagtcc	2400
tcaaggccat	gagcgcgcac	gcgcaccggc	ttgatccggg	tcgtcccgtc	cactacgaag	2460
gtgtcaactg	gaaccatgcc	tacgacggga	tcagcgactt	cgaaagccgt	atgtacgcca	2520
agccggccga	gatccaagac	tggctcgaac	acggcgacga	acggggcgag	gcgagcaagc	2580
cgttcgtcag	ctgtgagtac	atgcatgcca	tgggcaactc	gtgcggcggt	ctgagcgagt	2640
tcacgcacct	cgaacggtac	gagcgtact	ccggcggtt	catctgggat	tacatcgacc	2700
aggggctcgt	ccagcgtctg	cccgcgggga	gcgaacgcct	cagcgtcggc	ggagaatggg	2760
gcgaccgtcc	aaccgactac	gaattcgtgg	gcaacggcat	cgtgttcgcc	gaccgcacgc	2820
ccagcccaa	ggcgcaggag	gtcaagcagc	tgtattcgcc	ggtcaagctc	gccccgcagc	2880
ggcacggcgt	gaccatcgag	aaccgcaacc	tggtcgccgg	caccgacggc	tacgtgttcg	2940
ccgcacggct	cctcgaagac	gggcatgaga	tctggcatgc	cgactaccgt	ttcgacgtgg	3000
ccgcaggaga	tacccaacac	catgacatcg	ccttcccggg	catcgacgcg	gacggggata	3060
cgcgcaagt	cacctacgag	gtcgatctcc	tgctcgccga	agccaccgca	tgggcgcggg	3120
ccggctacga	gctcgcgttc	ggccaactca	ccggcacgct	caaccccgaa	caggacatca	3180
ccgagaccag	ccatgacgac	gacggccgcg	caactcgac	gctcagccga	tggaaacgccg	3240
gcatccgccc	cgacgacgag	gaaattctcc	tgtcacgcac	tcaggagggc	atcgtctcct	3300

ggaagcgcgga cgaccgggaa atgggtcatcc gtcgccccga actcgtcacg ttccgccc	3360
tgaccgacaa cgatcgcggt aaccattccg gtttcgaccg tgccgcatgg ttccg9gccc	3420
gccgatacgc catcgtaacc gaaacgaaaa tccatgaaag cgatgacggt ctcgtagcgg	3480
aataccagta cgaacttgcc gatccgaacc acacgcccgt gtccgtcact taccatgtca	3540
actccgatat gcgtatgcaa ctgaccgtcg aataccccgg gaacgccact gacatggcca	3600
gtctgccccg gttcgggtatc gaatgggagc tgcccggcga atacgatcgt ctgcgtact	3660
acggccccgg ccccgaggag acctaccgcg accgtaagca gggcggcaag ctcggcatct	3720
gggacgccac cgcgaaggcg agcatggcgc cgtatctcat ggtgcaggaa accggcagcc	3780
acgaggacgt ccgctggctc gaagccaccg acatccaagg ccacggattg cgcgtcacc	3840
aacgcggcga ccgtcacttc acggccagcc tgctgccctg gaacacctac acgatcgagg	3900
ccgcgcgccg ccacgaggac ctgccc aaac cgcgccacaa ctacctgcgc ctgctcgcgg	3960
cccagatggg cgtcgggtgga gacgactcct ggggagcccc cgtccacacg gcctaccagc	4020
tgcccggccg caggccgctc acctcgcagc tgaacctcga actcatctga ccggcaacgg	4080
gcggcggcat gcaccaccat gccgcgcgcg gcccgccta cgacgcggcg atcgaggcca	4140
cgggcgctgc ggccgcggac ggcaccggcg aggaggcgtt cgagcgcgcc ggccacgcgg	4200
tccacggcac caccgcagc gtcctctcgc tcatcacaa cccgatggac gtgatctgcc	4260
gcaacatccg caccgtgcgc gagaagatgg caaccgccc cgacatcctc ggctgccacc	4320
tcgaaggccc gttcctcgc ctcaagtgc agggcgcgca cgattcgaac tgccataaag	4380
acccgatgcc cgaactcatg gaccgcatgc tcgacgcctc gggcgccgac ctcgccgccg	4440
gcaagctcgg gtgcatccgc cagatcacca tctcgacccc accgactgga ccgcccacaa	4500
cgtctggtgc gccggccgcc aggtggagta aactccttcc agcaaaatcg acgccggtgc	4560
cgcgcgtctc gagacgacgt cttacgcctg aggaacgaag cttgcgcgcg gcaccagttc	4620
ggtcgtcagc aggatgtgac gacgcacccg ccgctcatgc ttcaaccat cgatcagggt	4680
ggagaacgcc atgcgggcca actccctttg atcgatcgca tacgaactca gcggcggcga	4740
cgtgtaccgg gcgatcgact ggttggttac actcaccag gccaaactcgt cgggaacctc	4800
cacgcgcagt gcgttcaacg cctgcaacgc cccaccgca agcacgtcgg cggccacgat	4860
caaaccatcg ggcattgctgc cggcctcacg atggctagcc accaactgct ccgcgagacg	4920
atagccgttc tccacggtga acgtgccgga cgaatacacc aatccgtccg tttccaatcc	4980
cagatgcgcg gccactgac ggaacgacag ctcgcgaatg tcctcgggat agtcatgcat	5040
gcccattgat ctgcccacgc cgccgagaaa cgcgatatga ctgcggcccc ccgcgatcat	5100
cgcgtccaag gcgtccagca tcgtctgcga cagatcggga cacacggagt cgaacaggcg	5160
cggcgccgga ttcgtgtcga tgacacgcc atgcgggagc accatatgca gggctcgcag	5220
gtccgcttcg ggaaacaccg tggtccac ggtgatgaac ccatcaaact ccgttgccgcg	5280
ttccgtcaac tcgtgtatgg acaacgtgag ctggtccaat tccaacgact ccgcacgctc	5340

cgcaagaacc	ttccgcagat	cggcgaagta	cgcgtcctgc	aattcctccc	cggacggagg	5400
cgcattccaac	accgcgatcg	cgggacggaa	cacgttgca	taccccatct	cctcgcacac	5460
gcgcaacaca	cgccgacgcg	tctcctcctt	gatggagaac	gacgggtcgt	tcaacaagcg	5520
tgacaccgtg	ctctgcgaca	ccccggcccc	tcccgcgact	tccttgagcg	tggccatgac	5580
atcctccccg	caaacttttag	taaagggttt	tactacagca	taaccggga	aggcggggtt	5640
agcggcattg	gcggcgtgga	agtttaccca	tgactggtag	actgcacatg	tcccggcaat	5700
aggggcaatg	catagggggg	tggcgggcat	gtgcagcaac	attcccgta	ccttacgatt	5760
cttatagcgt	gtcaggtaaa	agaattatga	ttctcaatcc	accttccggc	cgcgctgca	5820
gactcaaatg	gccatgatgc	atagcgacaa	tctctcgac	tatggataaa	cccaatccgt	5880
gatgaggtga	tgcagatccc	acatgcgtat	ttatcctatt	atcctcccct	ctgttaaaag	5940
gtgacaggaa	atcatctatc	ctcgtatcgg	aaagatccat	gccggtattg	gatatgtcta	6000
tcgcaatgca	ggactcgctt	tcgtattgcc	tgctgttggc	taagtttatc	catacatgtg	6060
gttgagccgc	acgattatgc	tgaatggcat	tcgtaataag	gtttgcaatc	atctgtctaa	6120
ttagcagacc	atcggctagg	atatatgcat	tctccagatt	ggtatgtact	tgaactctat	6180
ctccgataag	ttccatattt	tcctgaagaa	cattgcgaat	gatctcagct	acattaactc	6240
ggctaagatc	agctcggttt	aattgctgaa	ctttcgacaa	ttcgagcaga	tgattgacga	6300
tttcaacccc	agcatgattt	gaagccaaag	ccttttcgac	gaaaggctctg	caacgctcat	6360
cgaaaagctg	gttgtgcagc	ggaatctcca	atgcggccga	agtggccgca	agtggatttt	6420
ttaactcatg	tgacgcatcg	gcgataaatt	ccttttcccc	actgattgcg	ctgttgagat	6480
cctttaacat	gaggttgtat	gcggatgcaa	tagtgtacgc	ctcgtcgttt	tcatatggaa	6540
taacgatagg	ttgcctttcc	aatccagcgt	cggacgcgat	aatctgagag	gccacactat	6600
tgattcttcg	ttgtgtccta	gtggcgataa	tccaagttat	tcctccagat	aatatgccga	6660
aaacaatgat	gggggctatg	cttaccgcca	atatcagatc	ccgggatttt	atgtctcctt	6720
gttccatagt	tagcgttaaa	gcacacctac	cggagtcata	cccggcagaa	acgtaatcct	6780
taccggagtc	aggaggaatg	gcttgcgaa	tcaaactatg	ttgttcatcg	gcaccttctg	6840
cctgagtaaa	agattttattt	acggtcactg	tttccagttg	ccggttcacg	acataaatatg	6900
tcattggcgt	caccactccg	gtaagcatga	agaacacgat	gacgatcgtg	gtgaccaatc	6960
ttcttcttgt	agaccactga	aacggtaaac	gcagtttcgg	atggctggaa	tggctcccat	7020
tcgacgaagg	atattcaggc	tttttcatga	tatgcgatat	ccttgtccgg	gaacggtttc	7080
aatgaaatca	gtgattccga	ttttcgtgcg	aatcgcatag	attgtggtct	tgacgattcc	7140
tctcgtatga	gcgtgatcat	cctgccaaat	ctcacgatat	agacattccg	cactaatcac	7200
cgcacctcgc	gcctcaatca	gcgtcctcaa	tacggcaagt	tctcgtttcc	caaacttttag	7260
ttctgcaccg	cgaaccgtga	t				7281

<211> 1052
 <212> PRT
 <213> Bifidobacterium bifidum

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(1052)

<400> 2

Met Asn Thr Thr Asp Asp Gln Arg Lys Asn Gly Asp Pro Ile Val Ser
 1 5 10 15

Pro Ser Ile Pro Thr Thr Ala Trp Leu Ala Asp Pro Arg Val Tyr Ala
 20 25 30

Val His Arg Leu Asp Ala His Ser Asp His Ala Cys Trp Ser Arg Ser
 35 40 45

Pro Val Asp Gly Glu Ser Thr Asn Leu Arg Gln Ser Leu Asp Gly Glu
 50 55 60

Trp Arg Val Arg Val Glu Thr Ala Pro Thr Gly Arg Phe Pro Asp Gly
 65 70 75 80

Thr Ser Asp Gly Pro Asp Trp Ile Ser Asp Val Ser Pro Leu Phe Ala
 85 90 95

Ala Pro Gly Phe Asp Asp Ser Ser Phe Ser Arg Val Gln Val Pro Ser
 100 105 110

His Leu Glu Thr Ala Gly Leu Leu Ala Pro Gln Tyr Val Asn Val Gln
 115 120 125

Tyr Pro Trp Asp Gly His Glu Asp Pro Lys Ala Pro Ala Ile Pro Glu
 130 135 140

His Gly His Val Ala Val Tyr Arg Arg Glu Phe Asp Ala Asp Gly Glu
 145 150 155 160

Val Ala Gln Ala Val Arg Glu Gly Arg Pro Val Thr Leu Thr Phe Gln
 165 170 175

Gly Ala Ala Thr Ala Ile Tyr Val Trp Leu Asn Gly Ser Phe Val Gly
 180 185 190

Tyr Ala Glu Asp Ser Phe Thr Pro Ser Glu Phe Asp Val Thr Asp Ala
 195 200 205

Ile Lys Val Asp Gly Asn Val Leu Ala Val Val Cys Tyr Glu Tyr Ser
 210 215 220

Ser Ala Ser Trp Leu Glu Asp Gln Asp Phe Trp Arg Leu His Gly Leu

225 230 235 240
 Phe Arg Ser Val Glu Leu Asn Ala Arg Pro Ala Ala His Ile Ala Asp
 245 250 255
 Leu His Ala Asp Ala Asp Trp Asp Leu Ala Thr Ser Arg Gly Ser Leu
 260 265 270
 Ser Leu Asp Val Leu Ile Asp Gly Ala Ala Asn Ala Ala Thr Val Asp
 275 280 285
 Phe Ala Leu Trp Asp Lys Asn Gly Thr Ile Val Trp His Thr Ala Thr
 290 295 300
 Lys Ala Asp Gly Thr Leu His Ala Glu Ala Glu Ile Asp Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Pro Trp Ser Ala Glu Arg Pro Asp Leu Tyr Glu Leu Ser Val Thr Leu
 325 330 335
 Leu Asp Ala Asp Gly Lys Val Leu Glu Thr Ala Arg Thr Arg Ile Gly
 340 345 350
 Phe Arg His Val Ala Ile Glu Asp Gly Ile Leu Lys Leu Asn Gly Lys
 355 360 365
 Arg Leu Val Phe Arg Gly Val Asn Arg His Glu Phe Asp Cys Arg Arg
 370 375 380
 Gly Arg Ala Ile Thr Glu Glu Asp Met Leu Trp Asp Ile Arg Phe Met
 385 390 395 400
 Lys Arg His Asn Ile Asn Ala Val Arg Thr Ser His Tyr Pro Asn Gln
 405 410 415
 Ser Arg Trp Tyr Glu Leu Cys Asp Glu Tyr Gly Ile Tyr Leu Ile Asp
 420 425 430
 Glu Thr Asn Leu Glu Thr His Gly Ser Trp Asn Ser Pro Gly Asp Ile
 435 440 445
 Pro Val Gly Thr Ser Val Pro Gly Asp Asp Glu Ala Trp Leu Gly Ala
 450 455 460
 Cys Ile Asp Arg Leu Asp Ser Met Ile Leu Arg Asp Arg Asn His Pro
 465 470 475 480
 Ser Val Leu Val Trp Ser Leu Gly Asn Glu Ser Tyr Ala Gly Glu Val
 485 490 495
 Leu Lys Ala Met Ser Ala His Ala His Arg Leu Asp Pro Gly Arg Pro

[illegible]

770	775	780
Ile 785	Leu 790	Leu 795
Ser	Arg	Thr
Gln	Gly	Gly
Ile	Val	Ser
Trp	Lys	Arg
Asp	800	
Asp	Arg	Glu
Met	Val	Ile
Arg	Arg	Pro
Glu	Leu	Val
Thr	Phe	Arg
Pro	815	
Leu	Thr	Asp
Asn	Arg	Gly
Asp	Asn	His
Ser	Gly	Phe
Ala	Ala	830
Trp	Phe	Ala
Ala	Gly	Arg
Tyr	Ala	Ile
Val	Thr	Glu
Thr	Lys	Ile
His	845	
Glu	Ser	Asp
Asp	Gly	Leu
Val	Ala	Glu
Tyr	Gln	Tyr
Glu	Leu	Ala
Asp	850	
Pro	Asn	His
Thr	Pro	Val
Ser	Val	Thr
Tyr	His	Val
Asn	Ser	Asp
Met	880	
Arg	Met	Gln
Leu	Thr	Val
Glu	Tyr	Pro
Gly	Asn	Ala
Thr	Asp	Met
Ala	895	
Ser	Leu	Pro
Ala	Phe	Gly
Ile	Glu	Trp
Glu	Trp	Glu
Leu	Pro	Gly
Glu	Tyr	Asp
900		
Arg	Leu	Arg
Tyr	Tyr	Gly
Pro	Gly	Pro
Glu	Glu	Thr
Tyr	Arg	Asp
Arg	915	
Lys	Gln	Gly
Gly	Lys	Leu
Gly	Ile	Trp
Asp	Ala	Thr
Ala	Lys	Ala
Ser	930	
Met	Ala	Pro
Tyr	Leu	Met
Val	Gln	Glu
Thr	Gly	Ser
His	Asx	Asp
Val	960	
Arg	Trp	Leu
Glu	Ala	Thr
Asp	Ile	Gln
Gly	His	Gly
Leu	Arg	Val
Thr	975	
Gln	Arg	Gly
Asp	Arg	His
Phe	Thr	Ala
Ser	Leu	Leu
Pro	Trp	Asn
Thr	990	
Tyr	Thr	Ile
Glu	Ala	Ala
Arg	Arg	His
Glu	Asp	Leu
Pro	Lys	Pro
Arg	1005	
His	Asn	Tyr
Leu	Arg	Leu
Leu	Ala	Ala
Gln	Met	Gly
Val	Gly	Gly
1010		
Asp	Asp	Ser
Trp	Gly	Ala
Pro	Val	His
Thr	Ala	Tyr
Gln	Leu	Pro
1025		
Ala	Gly	Arg
Pro	Leu	Thr
Leu	Asp	Val
Asn	Leu	Glu
Leu	Ile	

1040

1045

1050

REIVINDICAÇÕES:

1. Seqüência de DNA, **CHARACTERIZADA** por:

a) codificar uma proteína com uma seqüência de aminoácido como dado na SEQ ID

NO: 2, ou

5 b) hibridizar sob condições de hibridização rigorosas para a seqüência de a), ou

c) ser uma degeneração da seqüência de a) ou b).

2. Seqüência de DNA, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pela seqüência ser dada na SEQ ID NO: 1 ou um fragmento desta.

10 3. Seqüência de DNA de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **CHARACTERIZADA** pela referida seqüência compreender substituições de nucleotídeo, adições ou deleções que resultam em menos que 60%, preferivelmente menos que 45%, males preferivelmente menos que 25% de alteração na seqüência de aminoácido de acordo com SEQ ID NO: 2 ou um fragmento desta.

15 4. Seqüência de DNA, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **CHARACTERIZADA** pela referida seqüência compreender substituições de nucleotídeo que resultam em substituições de aminoácido conservadoras.

5. Enzima, **CHARACTERIZADA** por ser codificada por uma seqüência de DNA de acordo com quaisquer reivindicações 1 a 4.

20 6. Enzima, **CHARACTERIZADA** por compreender uma seqüência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 2 ou um fragmento desta.

7. β -galactosidase, **CHARACTERIZADA** por ter a seqüência de acordo com a SEQ ID NO: 2.

8. Vetor recombinante, **CHARACTERIZADO** por compreender uma seqüência de DNA de acordo com quaisquer reivindicações 1 a 4.

25 9. Vetor, de acordo com a reivindicação 8, **CHARACTERIZADO** por tal vetor ser um vetor de expressão.

10. Célula hospedeira, **CHARACTERIZADA** por compreender uma seqüência de DNA de acordo com quaisquer reivindicações 1 a 4.

30 11. Célula hospedeira, **CHARACTERIZADA** por compreender o vetor de acordo com a reivindicação 8 ou reivindicação 9.

12. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 10 ou reivindicação 11, **CHARACTERIZADA** pela referida célula ser uma célula bacteriana, uma célula de levedura ou uma célula de fungo.

35 13. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 12, **CHARACTERIZADA** pela referida célula ser selecionada do grupo consistindo de Bifidobacterium, Lactococcus, Lactobacillus, Escherichia, Bacillus e Aspergillus.

14. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 13, **CHARACTERIZADA** pela

célula ser selecionada do grupo consistindo de *Bifidobacterium bifidum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans* e *Aspergillus niger*.

15. Uso de uma enzima, de acordo com quaisquer reivindicações 5-7 ou uma célula de acordo com quaisquer reivindicações 10 a 14, **CARACTERIZADO** por ser para produção de uma mistura de oligossacarídeos.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pela mistura compreender dissacarídeos Gal (β 1-3), Glc, Gal(β 1-3), Gal, Gal (β 1-6) Gal e Gal (α 1-6) Gal.

17. Uso de acordo com a reivindicação 15 ou reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pela mistura compreender trissacarídeos Gal (β 1-6), Gal (β 1-4), Glc, Gal (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc, tetrassacarídeo Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc, e pentassacarídeo Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc.

18. Uso de uma enzima, de acordo com quaisquer reivindicações 5 a 7, ou uma célula, de acordo com quaisquer reivindicações 10 a 14, **CARACTERIZADO** para produção de uma mistura de oligossacarídeos fazendo parte de um produto selecionado do grupo consistindo de produtos de laticínios como leite, leite em pó, leites infantis, fórmula para bebês, sorvete, iogurte, queijo, produtos de leite fermentados, bebidas como suco de fruta, alimentos infantis, cereais, pão, biscoitos, doces, bolos suplementos alimentares, suplementos dietéticos, produtos comestíveis probióticos, produtos comestíveis prebióticos, alimentos para animais, alimentos para aves e medicamentos.

19. Uso, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pela mistura compreender dissacarídeos Gal (β 1-3) Glc, Gal (β 1-3), Gal, Gal (β -1-6) gal e Gal (α 1-6), Gal, trissacarídeos Gal (β 1-6), Gal (β 1-4), Glc, Gal (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc, tetrassacarídeo Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc, e pentassacarídeo Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc.

20. Uso de uma célula hospedeira, de acordo com quaisquer reivindicações 10 a 14, **CARACTERIZADO** para produção de um produto selecionado do grupo consistindo de laticínios, tais como leite, leite em pó, leites infantis, fórmula para bebês, sorvete, iogurte, queijo, produtos de leite fermentados, bebidas como suco de fruta, alimentos infantis, cereais, pão, biscoitos, doces, bolos suplementos alimentares, suplementos dietéticos, produtos comestíveis probióticos, produtos comestíveis prebióticos, alimentos para animais, alimentos para aves e medicamentos.

21. Processo para produção de uma enzima, de acordo com quaisquer reivindicações 5 a 7 **CARACTERIZADO** por compreender a cultura de uma célula hospedeira de acordo com quaisquer reivindicações 10 a 14 num meio de cultura adequado sob condições que permitam a expressão dessa enzima e recuperar a enzima resultante da cultura.

22. Processo para produção de uma mistura de oligossacarídeos compreendendo dissacarídeos Gal (β 1-3) Glc, Gal (β 1-3), Gal, Gal (β -1-6) Gal e Gal (α 1-6), Gal, trissacari-

deos Gal (β 1-6), Gal (β 1-4), Glc, Gal (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc, tetrassacarídeo Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc, e pentassacarídeo Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc,

CARACTERIZADO por compreender o contato de uma enzima de acordo com quaisquer reivindicações 5-7 ou de uma célula hospedeira de acordo com quaisquer reivindicações 10 a 14 com um material contendo lactose.

Figura 1

1 ggatccggtg aacgcgccga gcgcggtgta cgtgctgcgc tcgtgcgagt cggaggagat
 61 cgcgggggatc atgccccagt aggagatgtc gcgcagcgag tagatcacgt cgagcaggat
 121 gaacacgatg acgaacagga ccatgaacac gccggtgttc acatccacga ggccgaacag
 181 gccggtgaac accatgatca gcaggatgcc aggcacgatg ccgccaatga actgccacgg
 241 gcggaaccgg cccagcggg tgttcgtgtt gtccacgagg ttgccgagca gcgggtcgag
 301 aaagatctcc gogatgcgga tgaccaccac gagtccggtg atcaccgcga tgaggcgtt
 361 ggcaagcgtc ttgtccacgt cgatgaacag gcgcggtgtc acgaacgtga tgaagaacgt
 421 gtcattgtg tttagaacg cggcctggcc caggtaccg aatgcgtatg cgatctctg
 481 acccgtgttc cgcgtgggtc gcggccttcc ggtcgttcc gtgtgttg tggtggatcc
 541 gtcattgtg ttgtggcctc ctgacgacct gtaaagaatc cgtgcgcgtg aaccgctccg
 601 atcccgaaaa gcgtgagtat agaacttct tgaaaaagta gaaaactata ccgcgtgtcg
 661 caaatcatgc caacgttctg caaccggcac tccgtgtgga tgagtaaggt ttgaagcctg
 721 ctgatgtgc ttgaatctta agaatccac gtattctgca tgttcaggc ctgtgcgcg
 781 gaaatgctgg aaagaatttg cgcaatcaag taacaatatt taccctgtt gtacaaggaa
 841 cccgattcaa cgaggttccc tctactgcggc ggcaacgacg cgacgcaatc cgatgcgaaa
 901 gcgaggacat catgaacaca accgacgatc agcgggaagaa cggcgatccg atcgtctccc
 961 cgtccatacc gacgacggca tggctcgcg acccgcgctg gtacgcggtt caccggctcg
 1021 acgcccattc cgatcatgcg tgcgtgtctc gtcctccagt cgacggcgag agcacgaatc
 1081 tcaggcgag ccttgacggc gaatggcggg tccgcgtcga gacggcgccg acgggcccgt
 1141 tccccgatgg gacgagcgac gggccggact ggatcagcga cgtgtgcct ctgttcgccc
 1201 cgcccggtt cgacgattcg tcgttctcac gcgtgcaggt gccctcgcct ctggagactg
 1261 cggggctgct tgcctcgag tacgtgaacg tcagtagacc atgggacgga catgaggacc
 1321 cgaaggcccc ggccatcccc gagcatggc atgtggcggg ctaccggcgc gatttcgacg
 1381 cggatggcga agtcgccag gccgtgcgcg aagggcgcgc ggtgacgctt acctccagg
 1441 gcgcggccac agccatctac gtgtggctca acggtcgtt cgttggctac gccgaggact
 1501 cttcacgcc cagcgagttc gacgtgacgg acgcatcaa ggtggacggc aacgtgctgg
 1561 cggctgtctg ctacgagtat tcgagcgcg gctggttga ggatcaggac ttctggcgtc
 1621 tgcacggcct gttccgtcc gtcgaactca acgagggcc cggcgccac atgcgcgacc
 1681 tccatgccga cggcactgg gatctcgcca catcaagggg ttgctctcg ctggatgtgc
 1741 tgatcgacgg tgcgcgaac gccgcgacgg tgacttcgc actgtgggac aagaacggca
 1801 ccatcgtctg gcacaccgcc acgaaagcgg acggaacgct gcacccgag gccgagatgc
 1861 atgacgggc gccatggagc gccgaacgcc ccgacctga cgagctatcc gtcacctgc
 1921 tcgacggga cggcaaggtc ctggagaccg ctgcactcg catcggttc cggcatgtgg
 1981 ccatcgagga cggcatctc aagctcaacg gcaagcgcct cgtgtccgt ggctcaacc
 2041 gccacgagtt cgactgccgg gcggcgccgg ccatcaccga agaggacatg ctgtgggaca
 2101 tccgttcat gaagcgccac aacatcaacg cgtgtgcac ctgcactat ccgaaccagt
 2161 cgcgtggtg cgagctgtg gacgaatacg gcatctacct gatcgacgag accaatctgg
 2221 agacctatgg cagctggaac agccccggcg acatccccgt gggaacctcc gtccccgtg
 2281 acgacgaggc ctggtgggc gcgtgcatcg accggctgga cagcatgatc ctgcgcgacc
 2341 gcaaccatcc cagcgtgtc gtctggtcgc tgggcaacga atctacgcg ggcaagtc
 2401 tcaaggccat gagcgcgac gcgcaccggc ttgatccggg tcgtccgct cactacgaag
 2461 gtgtcaactg gaacctgcc tacgacggga tcagcgactt cgaaagccgt atgtacgcca
 2521 agccggccga gatccaagac tggctcgaac acggcgacga acggggcgag gcgagcaagc
 2581 cgttcgtcag ctgtgagtac atgcatgcca tgggcaactc gtgcggcggg ctgagcgagt

Figura 1 (continuação)

2641 tcatcgacct cgaacggtac gagcgctact ccggcgggtt catctgggat tacatcgacc
 2701 aggggctcgt ccagcgtctg cccgacggga gcgaacgcct cagcgtcggc ggagaatggg
 2761 gcgaccgtcc aaccgactac gaattcgtgg gcaacggcat cgtgttcgcc gaccgcacgc
 2821 ccagcccaaa ggcgaggag gtcaagcagc tgtattgcc ggtcaagctc gccccgacg
 2881 ggacggcgt gaccatcgag aaccgcaacc tgttcgccg caccgacggc tacgtgttcg
 2941 ccgcacggct cctcgaagac ggcatgaga tctggcatgc cgactaccgt ttcgacgtgg
 3001 ccgcaggaga taccacac catgacatcg ccttcgccga catcgacgcg gacggggata
 3061 cgcggaagt cacctacgag gtcgatctcc tgctcgccga agccaccgca tgggcgccg
 3121 ccggctacga gctcgcgttc ggccaactca ccggcacgt caacccgaa caggacatca
 3181 ccgagaccag ccatgacgac gacggccgc caactcgac gtcagccga tggaaagccg
 3241 gcatccgcc cgacgacgag gaaattctc tgcacgac tcagggaggc atctgtctct
 3301 ggaagcgga cgaccgggaa atggtcatcc gtcgccccga actcgtcacg ttccgcccc
 3361 tgaccgaaa cgatcgcggt aaccattccg gtttcgaccg tgccgatgg ttcgcccgcg
 3421 gccgatacgc catcgtaacc gaaacgaaa tccatgaaag cgatgacggt ctctagcgg
 3481 aataccagta cgaactgcc gatccgaacc acacgccgt gtcgtcact taccatgtca
 3541 actccgatat gcgtatgaa ctgaccgtc aataccccg gaacgccact gacatggcca
 3601 gtctgccgc gttcggtatc gaatgggagc tgccggcgga atacgatcgt ctgcgtact
 3661 acggccccg ccccgaggag acctaccgc accgtaagca gggcggcaag ctcgcatct
 3721 gggacgccac cgcaaggcg agcatggcg cgtatctcat ggtgcaggaa accggcagcc
 3781 acgaggacgt ccgtggctc gaagccacc acatccaagg ccacggattg cgcgtaccc
 3841 aacgcggcga ccgtacttc acggccagcc tgcgtccctg gaacacctac acgatcgagg
 3901 ccgcgcgcc ccacgaggac ctgcccacac cgccacaa ctacctgcgc ctgctcgcg
 3961 cccagatggg cgtcggtgga gacgactct ggggagcccc cgtccacacg gctaccagc
 4021 tgcccgccg caggccgctc accctcgacg tgaacctga actcatctga ccggcaacgg
 4081 gcggcgcat gcaccacat gccgcggcg gccccgccta cgacgcggcg atcgaggcca
 4141 cgggcgctgc ggccgggac ggcaccggcg aggaggcgtt cgagcgcgcc ggccacgcg
 4201 tccacggcac caccgccag gtcctctgc tcatcaciaa cccgatggac gtgatctgcc
 4261 gcaacatccg caccgtgcgc gagaagatgg caacccgccc cgacatctc gggtgccacc
 4321 tcgaaggccc gttctcgcc ctcaagtga agggcgcgca cgattcgaac tgcctcaag
 4381 acccgatgcc cgaactcatg gaccgatgc tcgacgcctc gggcgccgac ctgcgcgcg
 4441 gcaagctcgg gtgatccgc cagatcacia tctgacccc accgactgga ccgccaaca
 4501 cgtctggtgc gccggcgcc agtgaggata aactccttc agcaaatcg acggcggtgc
 4561 cggcgtctc gagacgact ctacgctg aggaacgaag ctgcgcgcg gcaccagttc
 4621 ggtcgtcagc aggatgtgac gacgacccg ccgtcatgc tcaacccat cgatcagggt
 4681 ggagaacgcc atcggggcca actcccttg atcgatcgca tacgaactca gcggcgcgga
 4741 cgtgtaccgg gcgatcgact ggtgttcac actcaccag gccaactct cgggaaacctc
 4801 cagcgcagc gcgtcaacg cctgcaacgc cccaccgca agcacgtcg cggccacgat
 4861 caaacatcg ggcatgctc cgccctcag atggtcagcc accaactgct ccgcgagacg
 4921 atagccgttc tccacggtga acgtgccgga cgaatacacc aatccgtccg ttccaatcc
 4981 cagatgcgcg gccactgac ggaacgacag ctgcgaatg tctcgggat agtcatgcat
 5041 gcccatgat ctgccacgc cgccgagaaa cgcatatga ctgcggccc cgcgatcat
 5101 cggtccaag gcgtccgca tctctgca cagatcgga cacacggagt cgaacaggcg
 5161 cggcgccgga ttcgttcga tgacacgcc atcggggagc accatagca gggctcgcg
 5221 gtccgttcg ggaacacgc tggctccac ggtgatgaac ccatcaact ccgttcgcg
 5281 ttccgtcaac tctgtatgg acaacgtgag ctggtcaat tcaacgact ccgcacgctc
 5341 cgcaagaacc ttccgcatg cgcggaagta cgcgtctgc aattcctccc cgacggagg
 5401 cgcatccaac accgcgatc cgggacggaa caggttcga taccatctt cctcgacac

Figura 1 (continuação)

5461 ggcgaacaca cgccgacgcg tctctcctt gatggagaac gacgggtcgt tcaacaagcg
 5521 tgacaccgtg ctctgcgaca ccccgcccg tcccgcgact tccttgagcg tggccatgac
 5581 atcctccccg caaactttag taaaggggtt tactacagca taaccggga aggcgggggt
 5641 agcggcattg gcggcgtgga agttaccca tgactggtag actgcacatg tcccggaat
 5701 aggggcaatg catagggggg tggcgggcat gtgcagcaac attcccgtca cttacgatt
 5761 cttatagcgt gtcaggtaaa agaattatga ttccaatcc accctccggc cgcgcctgca
 5821 gactcaaatg gccatgatgc atagcgacaa tctctgcac tatggataaa cccaatccgt
 5881 gatgagggtga tgcagatccc acatgcgtat ttatctatt atcctcccct ctgttaaaag
 5941 gtgacaggaa atcatctatc ctctatcgg aaagatccat gccggattg gatagtcta
 6001 tcgcaatgca ggactgcct tcgtattgcc tgcgttggc taagttatc catacatgtg
 6061 gttgagccgc acgattatgc tgaatggcat tcgtaataag gtttgcaatc atctgtctaa
 6121 ttacagacc atcggctagg atatatgcat tctccagatt ggtatgtact tgaactctat
 6181 ctccgataag ttcatattt tctgaagaa cattgcgaat gatctcagct acattaacte
 6241 ggctaagatc agctcgggtt aattgtgaa ctttcgacaa ttcgagcaga tgattgacga
 6301 ttcaacccc agcatgattt gaagccaaag cttttcgac gaaaggctg caacgctcat
 6361 cgaaaagctg gttgtgcagc ggaatctcca atgcggccga agtggccgca agtggattt
 6421 ttaactcatg tgacgcacg gcgataaatt cttttccc actgattgcg ctgttgagat
 6481 ctttaacat gaggttgat gcggatgcaa taggtacgc ctctcgtt tcatatggaa
 6541 taacgatagg ttgccttcc aatccagcgt cggacgcgat aatctgagag gccacactat
 6601 tgattcttcg ttgttccta gtggcgataa tccaagttat tctccagat aatatgccga
 6661 aaacaatgat gggggctatg cttaccgcca atatcagatc cggggattt atgtctcct
 6721 gttccatagt tagcgttaa gcatccttac cggagtcata cccggcagaa acgtaatcct
 6781 taccggagtc aggaggaatg gcttgcgaat tcaactatg ttgttcacg gcattcttg
 6841 cctgagtaaa agatttatit acggctactg ttccagtg cgggttcacg acataatatg
 6901 tcatggcggc caccactccg gtaagcatga agaacacgat gacgatcgtg gtgaccaatc
 6961 ttctcttgt agaccactga aacggtaaac gcagtttcgg atggctggaa tggctccat
 7021 tcgacgaagg atattcaggc ttttcatga tatgcgatat cttgtccgg gaacggttc
 7081 aatgaaatca gtgattccga tttcgtgcg aatcgcatag attgtgtct tgacgatcc
 7141 tctcgtatga gcgtgatcat cctgccaat ctcacgatag agacattccg cactaatcac
 7201 cgcacctcgc gctcaatca gcgtctcaa tacggcaagt tctcgttcc caaactttag
 7261 ttctgcaccg cgaaccgtga t

Figura 2

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
1  MNTTDDQRKNGDFIVSPSIPTTAWLADPRVYAVHRLDAHSDHACWRSRSPVDGESTNLRQSLDGEWRVRVETAPTGRFPDGTSDGFDWISDVSPFAAPGF

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
101 DDSSFSRVQVPSHLETAGLLAPQYVNVQYPWDGHEDPKAPAIPEHGHVAVYRREFDADGEVAQAVREGRPVTLTFQGAATAIYVWLNGSFVGYAEDSFTP

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
201 SEFDVTDAIKVDGNVLAVVCYEYSSASWLEDQDFWRLHGLFRSVELNARPAAHIALHADADWDLATSRGSLSLDVLI DGAANAATVDFALWDKNGTIVW

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
301 HTATKADGTLHAEAEIDDAAPWSAERPDLIELSVTLLDADGKVLETARTRIGFRHVAIEDGILKLNKRLVFRGVNRHEFDCRRGRAITEEDMLWDIRFM

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
401 KRHNINAVRTSHYPNQSRWYELCDEYGIYLIIDETNLETHGSGWNSPGDIPVGTSPVGDDAEWLGACIDRLDSMILDRNHPSVLVWSLGNESYAGEVLKAM

      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
501 SAHAHRLDPGRFVHYEGVNNHAYDGISDFESRMYAKPAEIQDWLEHGDERGEASKPFVSCEYMHAMGNSCGGLSEFIDLERYERYSGGFIWDYIDQGLV

      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
601 QRLPDGSEALSVGGEGWDRPTDYEFGVNGIVFADRTSPKAQEVKQLYSPVKLAPDGHGVTIENRNLFAGTDGYVFAARLLEDGHEIWHADYRFDVAAGD

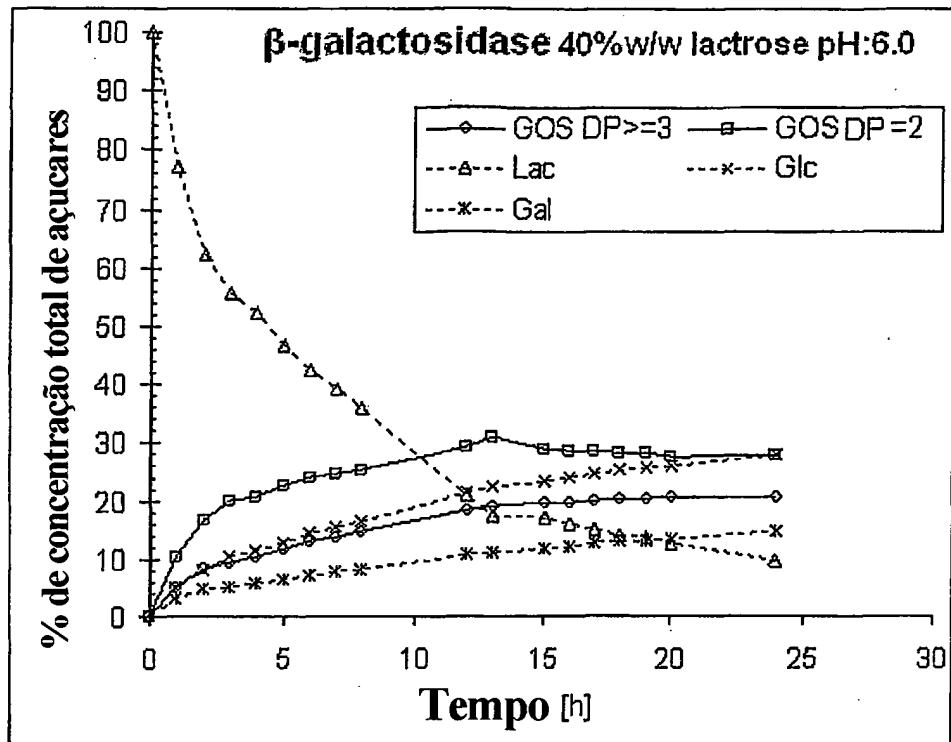
      710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
701 TQHHDIAPFDIDADGDTREVTYEVDLLAEATAWAPAGYELAFGQLTGTNLNPEQDITETSHDDDGRASTRLSRWNAGIRRDDEEILLRTQGGIVSWKRD

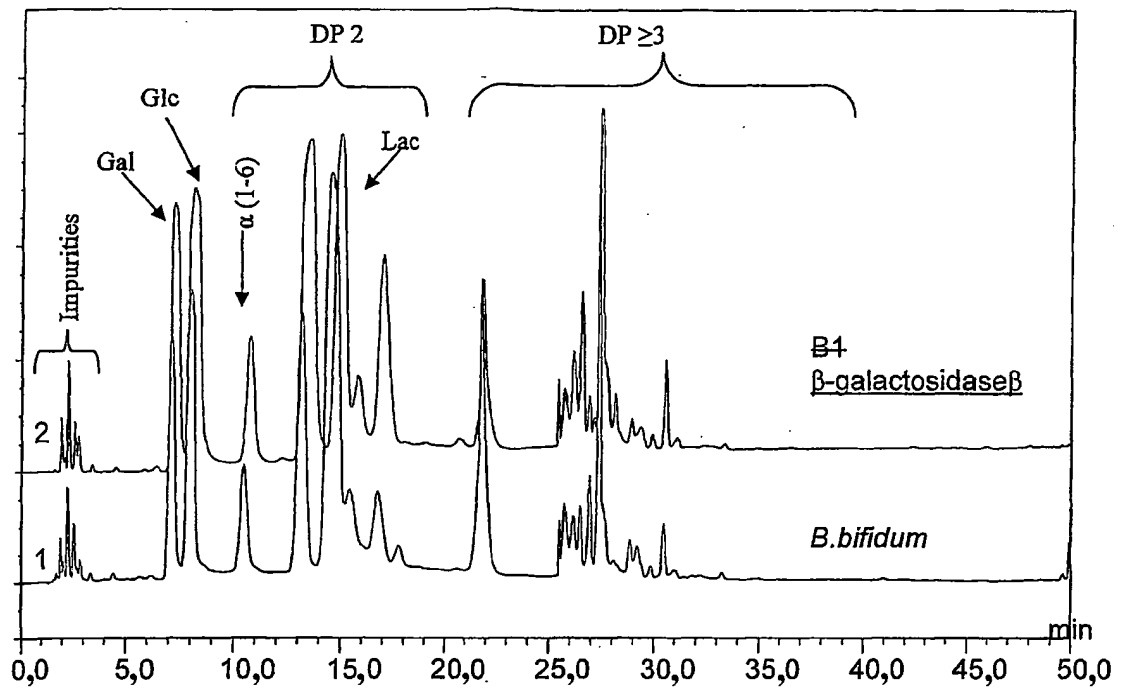
      810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
801 DREMVIARRPELVTFRPLTDNRGNHSGFDRAAWFAAGRYAIVTETKIHESDDGLVAEYQYELADPNHTPVSVTYHVNSDMRMQLTVEYPGNATDMASLPA

      910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
901 FGIEWELPGEYDRLRYYGPGPEETYRDRKQGGKLGIWDATAKSMAPYLMVQETGSHEDEVRLWLEATDIQGHGLRVTRQGRHFTASLPLWNTYTI EAARR

      1010    1020    1030    1040    1050
1001 HEDLPKPRHNYLRLLAAQMGVGGDDSWGAPVHTAYQLPAGRPLTLDVNLELI

```

**Figura 3**

**Figura 4**

RESUMO

"GALACTOSIDASE COM ATIVIDADE ALFA-GALACTOSILTRANSFERASE"

5 A presente invenção refere-se a β -galactosidase com atividade trans-galactosilação isolada de *Bifidobacterium bifidum*. A β -galactosidase é capaz de converter lactose numa mistura de oligossacarídeos que são ligados na posição β , e produzem, inesperadamente o dissacarídeo α -ligado, galactobiose. A mistura pode ser incorporada em numerosos produtos alimentares ou alimentos para animais com a finalidade de melhorar a saúde intestinal promovendo o crescimento de bifidobactérias no intestino, e reprimindo o crescimento da microflora patogênica.