



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

(11) PI 0419103-0 B1

(22) Data do Depósito: 15/01/2004

(45) Data de Concessão: 31/07/2018



* B R P I 0 4 1 9 1 0 3 B 1 *

(54) Título: USO DE UMA LIPÍDIO ACIL TRANSFERASE E MÉTODO PARA PREPARAR UM PRODUTO DE MASSA OU UM PRODUTO ASSADO

(51) Int.Cl.: C12N 9/10; A23L 29/00; A23L 29/10; A23L 33/195; A21D 13/04

(30) Prioridade Unionista: 17/01/2003 GB 0301117.8, 17/01/2003 GB 0301118.6, 17/01/2003 GB 0301119.4, 17/01/2003 GB 0301120.2, 17/01/2003 GB 0301121.0, 17/01/2003 GB 0301122.8, 23/07/2003 US 60/489,441, 24/12/2003 GB 0330016.7

(73) Titular(es): DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS

(72) Inventor(es): ARNO DE KREIJ; SUSAN MAMPUSTI MADRID; JØRN DALGAARD MIKKELSEN; JØRN BORCH SØE

(85) Data do Início da Fase Nacional: 25/08/2006

**“USO DE UMA LIPÍDIO ACIL TRANSFERASE E MÉTODO PARA
PREPARAR UM PRODUTO DE MASSA OU UM PRODUTO ASSADO”.**

Pedido dividido do PI 0406770-3 de 15/01/2004

REFERÊNCIA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] É feita referência aos seguintes pedidos relacionados: Pedido nos Estados Unidos, Número de Série 09/750.990, depositado no dia 20 de julho de 1999 e Pedido nos Estados Unidos, Número de Série 10/409,391. Cada um desses pedidos e cada um dos documentos citados em cada um desses pedidos (“documentos citados nos pedidos”), e cada documento referido ou citado nos documentos citados nos pedidos, ou no texto ou durante o trâmite daqueles pedidos, bem como todos os argumentos de apoio a patenteabilidade realizados durante tal trâmite, são desse modo aqui incorporados por referência.

[0002] Vários documentos também são citados nesse texto (“documentos aqui citados”). Cada um dos documentos aqui citados, e cada documento citado ou referido nos documentos aqui citados, são desse modo aqui incorporados por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0003] A presente invenção se relaciona a um método para a produção *in situ* de um emulsificante no interior de um gênero alimentício pelo uso de um lipídio acil transferase.

[0004] A presente invenção, além disso, se relaciona a um método para a produção *in situ* de um emulsificante no interior de um gênero alimentício pelo uso de uma enzima lipídio acil transferase, na qual o método é tal que o emulsificante é produzido sem aumentar, ou sem aumentar substancialmente, os ácidos graxos livres no gênero alimentício.

[0005] A presente invenção, além disso, ainda se relaciona a um método para a produção *in situ* de pelo menos dois emulsificantes no interior de um gênero alimentício pelo uso de uma enzima lipídio acil transferase.

[0006] A presente invenção também se relaciona a um método para a produção *in situ* de um éster de carboidrato e/ou éster de esteroide e/ou éster de

estanol e/ou um éster de proteína e/ou éster de glicerol e/ou um éster de hidróxi ácido no interior de um gênero alimentício pelo uso de uma enzima lipídio acil transferase.

[0007] A presente invenção se relaciona a uma composição de enzima alimentícia e/ou uma composição de enzima alimentícia animal, que contém uma enzima lipídio acil transferase, e o uso de tal composição nos métodos da presente invenção.

[0008] A presente invenção, além disso, se relaciona a um método de identificação das enzimas lipídio acil transferases adequadas, de acordo presente invenção, e a enzima lipídio acil transferase assim identificada.

[0009] A presente invenção, além disso, ainda se relaciona a uma enzima lipídio acil transferase imobilizada.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[00010] O uso benéfico de fosfolipases e lipases (mencionadas como enzimas lipolíticas, (EC.3.1.1.x) usadas em aplicações nos alimentos e/ou na indústria alimentícia é conhecido há muitos anos.

[00011] Por exemplo, na EP 0585988 é reivindicado que a adição lipase à massa de farinha resultou em uma melhora no efeito anti-envelhecimento. É sugerido que uma lipase obtida a partir do *Rhizopus arrhizus*, quando acrescentada à massa de farinha possa melhorar a qualidade do pão resultante quando usada em combinação com a redução de gordura. O documento de patente W094/04035 ensina que pode ser obtida uma maciez melhorada pela adição de uma lipase à massa de farinha sem a adição de qualquer gordura/óleo adicional à massa de farinha. Castello, P. ESEGP 89-10 dezembro de 1999 Helsinki, mostra que a lipase exógena pode modificar o volume do pão.

[00012] As enzimas lipolíticas hidrolisam um ou mais dos ácidos graxos de lipídios presentes nos alimentos que podem resultar na formação de poderosas moléculas emulsificantes dentro dos gêneros alimentícios que fornecem uma funcionalidade comercialmente valiosa. As moléculas que contribuem para as características mais significantes de emulsificante são os

produtos da hidrólise parcial, como os liso-fosfolipídios, liso-glicolipídios, e moléculas de monoglicerídeos. Os produtos de hidrólise de lipídios polares, como liso-fosfolipídios e liso-glicolipídios são em particular vantajosos. Na produção do pão, tais emulsificantes produzidos *in situ* podem dar funcionalidade equivalente de emulsificantes como o DATEM.

[00013] Entretanto, a atividade de enzimas lipolíticas também resulta no acúmulo de ácidos graxos livres, que podem levar à funcionalidade prejudicial nos gêneros alimentícios. Esta atividade inerente de enzimas lipolíticas limita a sua funcionalidade.

[00014] Foram tentadas na técnica diversas soluções para esse problema. Entretanto, essas soluções resultaram em um aumento significativo nos ácidos graxos livres nos gêneros alimentícios, particularmente no gênero alimentício com o alto conteúdo de água, incluindo, mas não limitados a massas de farinha de pão e gema de ovo.

[00015] As fosfolipases, em particular a fosfolipase A2 (E.C.3.1.1.4), foram usadas durante muitos anos para o tratamento de ovos ou produto à base de ovos (Veja US 4.034.124 e Dutihl & Groger 1981 *J. Sci. Food Agric.* 32, 451 – 458, por exemplo). A atividade da fosfolipase durante o tratamento de ovos, ou de produtos à base de ovos, resulta no acúmulo de liolecitina polar, que pode atuar como um emulsificante. O tratamento de ovos ou de produtos a base de ovos com a fosfolipase pode melhorar a estabilidade, a estabilidade térmica sob tratamento por calor, como a pasteurização, e resultar em espessamento substancial. Os produtos à base de ovos podem incluir, mas não são limitados a bolo, maionese, molhos de salada, molhos, sorvetes e assim por diante. O uso de fosfolipases resulta no acúmulo de ácidos graxos livres. O acúmulo de ácidos graxos livres pode resultar em significativa perda de sabor. Além disso, o acúmulo de ácidos graxos livres pode resultar no aumento de suscetibilidade à oxidação, e desse modo resultar em curto prazo de validade, descolorimento de produto e alteração de outras características alimentícias críticas como sabor e textura. Recentemente, foram comercializadas enzimas lipolíticas com mais ampliada especificidade de

substratamento para o tratamento da gema de ovo e para os produtos alimentícios relacionados à gema de ovo. Essas enzimas possuem a vantagem de, diferentemente da maior parte das fosfolipases A2s, não serem originárias de uma fonte constituída de mamíferos. Entretanto, elas resultam em acúmulo significativo de ácidos graxos livres, não só devido à hidrólise dos fosfolipídios, mas também dos triglicerídeos.

[00016] Tal como acima mencionado, uma outra área onde as lipases podem ser extensivamente usadas está na indústria da padaria. O uso de fosfolipases no cozimento ocorre no início de 1980.

[00017] Os substratamentos para as lipases na farinha de trigo são lipídios endógenos do trigo presentes de 1,5 a 3 %, que são uma mistura complexa de lipídios polares e não-polares. Os lipídios polares podem ser divididos em glicolipídios e fosfolipídios. Esses lipídios são construídos por glicerol esterificado com dois ácidos graxos e um grupo polar. O grupo polar contribui para a atividade de superfície desses lipídios. A clivagem enzimática de um dos ácidos graxos nesses lipídios leva a lipídios com uma atividade de superfície muito mais elevada. É bem conhecido que os emulsificantes, como o DATEM, com a alta atividade superficial são muito funcionais quando acrescentados à massa de farinha.

[00018] Entretanto, o uso de lipases (E.C. 3.1.1.X) em produtos de massa de farinha pode ter um impacto prejudicial na atividade da levedura, e/ou um efeito negativo no volume do pão. O efeito negativo no volume do pão muitas vezes é explicado superdosagem. A superdosagem pode levar a uma redução na elasticidade do glúten que resulta em uma massa de farinha que é demasiado dura e resultando assim em volumes reduzidos do pão. Além disso, ou alternativamente, tais lipases podem degradar por redução, a gordura do óleo ou do leite acrescentada à massa de farinha, resultando em perda de sabor da massa de farinha e do produto assado. A sobredosagem e a perda do sabor têm sido atribuídas ao acúmulo de ácidos graxos livres na massa de farinha.

[00019] Na EP 1193314, EP 0977869 e também na WO 01/39602, se

informou que o uso de enzimas lipolíticas ativas em glicolipídios foi em particular benéfico quando aplicado na fabricação do pão já que os produtos da hidrólise parcial, os liso-glicolipídios, foram considerados como possuindo uma alta funcionalidade emulsificante, ao que parece resultante de uma proporção mais alta da funcionalidade positiva do emulsificante em comparação com o acúmulo prejudicial de ácidos graxos livres. Entretanto, as enzimas também foram consideradas como possuindo uma atividade significativa e não seletiva sobre os triglicerídeos, o que resultou em uma concentração desnecessariamente alta de ácido graxo livre.

[00020] O mesmo achado foi relatado na WO 00/32758, que divulgou variantes de enzima lipolítica com atividade melhorada para fosfolipídios e/ou glicolipídios, além de variantes que tiveram uma preferência por ácidos graxos de cadeia longa em vez dos de cadeia curta. Esta última característica, também descrita na WO 01/39602, foi considerada de particular importância para prevenir a perda de sabores associada com o acúmulo de ácidos graxos livres de cadeia curta. Entretanto, são produzidos ácidos graxos livres significantes.

[00021] O problema da alta atividade de triglicerídeos foi discutido na WO 02/094123, onde é ensinado o uso de enzimas lipolíticas ativas nos lipídios polares (isto é, glicolipídios e fosfolipídios) de uma massa de farinha, mas não substancialmente ativas em triglicerídeos ou 1 – mono - glicerídeos. Entretanto, os ácidos graxos livres significantes são produzidos.

[00022] Algumas enzimas lipolíticas possuem baixa ou nenhuma atividade na forma liso de lipídios polares (por exemplo, glicolipídios / fosfolipídios). O uso de tais enzimas foi considerado preferível, pois elas asseguram o acúmulo de liso-lipídios altamente polares, resultando em ótima funcionalidade. Entretanto os ácidos graxos livres realmente se acumulam. Esta funcionalidade seletiva é característica de enzimas fosfolipase A2, e das glicolipases divulgadas nas EP 0977869, EP 1193314, e WO 01/39602. Foram produzidas enzimas de variantes de menor seletividade lipolítica enzimática que possuem uma atividade mais baixa nos lipídios liso-polares

quando comparado com enzimas aparentadas (WO 03/060112). Entretanto, os ácidos graxos livres significantes são produzidos.

[00023] A WO 00/05396 ensina um processo para preparo de gêneros alimentícios que compreende um emulsificante, em que o produto alimentício é contigado com uma enzima de tal modo que um emulsificante é gerado pela enzima a partir de um éster de ácido graxo e um segundo ingrediente funcional é gerado a partir de um segundo constituinte. A WO 00/05396 ensina o uso uma lipase ou enzima esterase em particular. Em nenhum lugar da WO 00/05396 é ensinado o uso específico de uma enzima lipídio acil transferase. Além disso, em gêneros alimentícios com o alto conteúdo de água, o uso de esterases e lipases tal como ensinado na WO 00/05396 resultaria no acúmulo significativo de ácidos graxos livres.

[00024] Uma desvantagem associada com o uso de lipases, inclusive fosfolipases e glicolipases, pode ser causada pelo aumento de ácidos graxos livres liberados dos lipídios. Nas últimas duas décadas o uso de enzimas lipolíticas em gêneros alimentícios foi limitado devido ao equilíbrio entre o acúmulo prejudicial de ácidos graxos livres e a produção dos liso-lipídios que fornecem a funcionalidade positiva. Embora tenham sido tentadas numerosas estratégias na técnica, algumas das quais forneceram melhorias significantes na funcionalidade, ninguém abordou e resolveu completamente o problema fundamental da técnica, isto é, o acúmulo significativo de ácidos graxos livres em gêneros alimentícios preparados usando enzimas lipolíticas *in situ*.

[00025] A presença de altos níveis de ácidos graxos livres (FFA) em matérias-primas ou produtos alimentícios é geralmente reconhecida como um defeito de qualidade e tanto os beneficiadores de alimentos quanto os clientes normalmente colocarão um nível de FFA máximo nas especificações alimentícias. Os efeitos resultantes dos níveis excessivos de FFA podem gerar problemas funcionais e/ou organolépticos.

[00026] Um resultado da lipolise é o ranço hidrolítico, com a formação do característico sabor de “sabão”. Este gosto de “sabão” é em particular agudo com ácidos graxos de comprimento de cadeia intermediário (C₈-C₁₂)

que, embora não estejam presentes em altas concentrações, podem ser constituintes importantes de, por exemplo, produtos de laticínio ou óleos vegetais. Um defeito organoléptico mais comum é devido aos efeitos combinados de enzimas lipolíticas e processos de oxidação. Os ácidos graxos insaturados são mais suscetíveis à oxidação enzimática quando não esterificados do que quando esterificados como acil lipídios.

[00027] Os defeitos funcionais no alimento devido a altos níveis de FFA são reconhecidos, mas menos prontamente explicados. Sem desejar se prender à teoria, a hidrólise de lipídios inalterados a ácidos carboxílicos aumentará a concentração de $[H^+]$ e produzirá grupos carbonila que podem combinar-se com outros compostos ou íons metálicos. Ácidos graxos livres também se combinam a proteínas por interações hidrofóbicas e podem se complexar com o amido durante o cozimento. O FFA também pode influenciar na ação de agentes de superfície ativos, tais como lipídios polares e emulsificantes (*Lipid in Cereal Technology*, P. J. Bames, Academic Press 1983).

[00028] A WO 03/100044 divulga uma classe de acil transferases conhecidas como PDATs (ou ATWAX). Essas enzimas usam um monoglicerídeo ou um diglicerídeo como a molécula receptora, e fosfatidil colina (PC) como a molécula doadora para produzir os seguintes produtos: liso fosfatidil colina e triacilglicerol e/ou diacilglicerol.

[00029] Em uma modalidade, a presente invenção se relaciona a melhorias na incorporação da proteína do soro do leite em produtos alimentícios, fornecendo rendimentos melhorados sem prejudicar as qualidades – tal como a textura - das composições e produtos alimentícios.

[00030] As composições de queijo são tipicamente preparadas a partir de líquidos de laticínios por processos que incluem o tratamento dos líquidos com um agente coagulante ou de coagulação. O agente de coagulação pode ser uma enzima coagulante, um ácido ou uma cultura bacteriana conveniente, ou ele pode incluir tal cultura. O coalho que resulta geralmente incorpora a caseína, gorduras inclusive a gordura natural da manteiga, e aromatizantes

transformados que surgem, sobretudo quando é usada uma cultura bacteriana. O coalho pode ser separado do soro de leite líquido, que contém a proteína solúvel não afetada pela coagulação e que, por isso, não está incorporada no coalho.

[00031] O soro de leite é assim um subproduto em processos comerciais de fabricação que produzem produtos alimentícios – tais como queijos. Tradicionalmente, o soro de leite é descartado como resíduo não usado ou usado como fertilizante ou forragem animal ou processado como um ingrediente alimentício.

[00032] A incapacidade das proteínas do soro do leite de ser substancialmente retidas no coalho é um fator importante que contribui para uma falta de eficiência na produção convencional de produtos laticínios - como queijos de coalho - e para uma redução do rendimento total que se relaciona com a incorporação de todas as proteínas sólidas, que estejam presentes nos líquidos laticínios iniciais, nos queijos de coalho resultantes.

[00033] Foram feitas numerosas tentativas de incluir a proteína do soro do leite no queijo, por exemplo, pelo tratamento do leite por aquecimento, o tratamento do soro de leite por aquecimento, ou por filtração - tal como ultrafiltração.

[00034] Há também várias descrições do uso de proteases específicas para induzir a agregação da proteína do soro do leite. Uma protease de serina derivada do *Bacillus licheniformis* foi mostrada como possuindo a capacidade de induzir a agregação da proteína do soro do leite (patente US 5.523.237).

[00035] Entretanto, permanecem muitas dificuldades associadas com a adição das proteínas do soro do leite em processos como a manufatura de queijos. Por exemplo, a incorporação da proteína do soro do leite em queijos está associada com uma deterioração no gosto e com a sensação de ranço do produto, e, além disso, tende a interferir na coagulação e no processamento subsequente do produto. As proteases que foram anteriormente relatadas e que podem ser adicionadas ao queijo pela hidrólise da proteína do soro do leite resultam em uma hidrólise significativa das caseínas tal como descrito por

Madsen, J. S. e Qvist, K. B. (1997) "*Hydrolysis of milk protein by a Bacillus licheniformis protease specific for acidic amino acid residues*". *J. Food Sci.* 62, 579 - 582.

[00036] Assim, há uma necessidade na técnica de métodos e composições que forneçam uma incorporação melhorada da proteína do soro do leite em produtos alimentícios mantendo as propriedades organolépticas e outras propriedades desejáveis. Tal otimização resultaria no aumento da eficiência, em mais altos rendimentos dos produtos alimentícios, e na redução total de custos.

[00037] As lipase:colesterol acil transferases são conhecidas há algum tempo (ver por exemplo, Buckley - *Biochemistry* 1983, 22, 5490 - 5493). Em particular, as glicerofosfolipídio:colesterol acil transferases (GCATs), juntamente com as lecitina:colesterol acil transferases (LCATs), de origem vegetal e/ou um de mamífero, catalisarão a transferência de ácido graxo entre a fosfatidil colina e o colesterol.

[00038] Upton e Buckley (TIBS 20, maio de 1995 págs 178 - 179) e Brumlik e Buckley (*J. of Bacteriology*, abril de 1996, págs 2060 - 2064) relatam uma lipase/aciltransferase proveniente de *Aeromonas hydrophila* que tem a capacidade de realizar a transferência de acil para álcoois receptores em meio aquosos.

ASPECTOS RESUMIDOS DA PRESENTE INVENÇÃO

[00039] De acordo com um aspecto da presente invenção é fornecido um método de produção de um gênero alimentício que compreende um emulsificante, em que o método compreende a etapa de adição ao gênero alimentício uma enzima lipídio acil transferase tal como aqui definida.

[00040] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece um método de produção de um gênero alimentício que compreende um emulsificante, em que o método é tal que o emulsificante é produzido sem aumentar, ou sem aumentar substancialmente, os ácidos graxos livres no gênero alimentício, e em que o método compreende a etapa de acrescentar uma enzima lipídio acil transferase ao gênero alimentício.

[00041] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de produção de um gênero alimentício que compreende um emulsificante e, ou um éster de esterol e/ou éster de estanol, em que o método é tal que o emulsificante é produzido sem aumentar, ou sem aumentar substancialmente, na os ácidos graxos livres no gênero alimentício, em que o método compreende a etapa de acrescentar uma enzima lipídio acil transferase ao gênero alimentício.

[00042] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de produção de um gênero alimentício que compreende um emulsificante e, ou um éster de esterol e/ou éster de estanol, em que o método compreende a etapa de acrescentar uma enzima lipídio acil transferase ao gênero alimentício.

[00043] De acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido um método de produção de um gênero alimentício que compreende um emulsificante, e, ou um éster de esterol e/ou éster de estanol em que o método compreende a etapa de adicionar uma enzima lipídio acil transferase ao gênero alimentício.

[00044] Segundo um aspecto adicional da presente invenção é fornecido um método de produção de um gênero alimentício que compreende pelo menos dois emulsificantes, em que o método compreende a etapa de adicionar ao gênero alimentício uma enzima lipídio acil transferase.

[00045] De acordo com um aspecto adicional da presente invenção é fornecido um método de produção de um gênero alimentício que compreende pelo menos dois emulsificantes e, ou um éster de esterol e/ou éster de estanol, em que o método é tal que o emulsificante é produzido sem aumentar, ou sem aumentar substancialmente, na os ácidos graxos livres no gênero alimentício, em que o método compreende a etapa de acrescentar uma enzima lipídio acil transferase ao gênero alimentício.

[00046] Segundo um aspecto adicional da presente invenção é fornecido um método de produção de um gênero alimentício que compreende pelo menos dois emulsificantes e, ou um éster de esterol e/ou éster de estanol, em que o método compreende a etapa de adicionar uma enzima lipídio acil

transferase ao gênero alimentício.

[00047] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece um método de produção de um gênero alimentício que compreende um éster de carboidrato, em que o método compreende a etapa de acrescentar uma enzima lipídio acil transferase ao gênero alimentício.

[00048] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de produção de um gênero alimentício que compreende um éster de carboidrato e um emulsificante, em que o método compreende a etapa de acrescentar uma enzima lipídio acil transferase ao gênero alimentício.

[00049] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de produção de um gênero alimentício que compreende um emulsificante e um ou mais de um éster de carboidrato; éster de estero|; éster de estanol; um éster de proteína; um monoglicerídeo ou um diglicerídeo, em que o método compreende a etapa de acrescentar uma enzima lipídio acil transferase ao gênero alimentício.

[00050] Em outro aspecto, a presente invenção fornece o uso de uma enzima lipídio acil transferase para preparar, a partir de um material alimentício, um gênero alimentício que compreende um emulsificante, em que o emulsificante é gerado de constituintes do material alimentício pela enzima lipídio acil transferase.

[00051] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece o uso de uma enzima lipídio acil transferase para preparar, a partir de um material alimentício, um gênero alimentício que compreende um emulsificante, em que o emulsificante é produzido sem aumentar, ou sem aumentar substancialmente, os ácidos graxos livres no gênero alimentício, e em que o emulsificante é gerado de constituintes do material alimentício pela enzima lipídio acil transferase.

[00052] Em outro aspecto, a presente invenção fornece o uso de uma enzima lipídio acil transferase para preparar, a partir de um material alimentício, um gênero alimentício que compreende um emulsificante e ou um éster de estero| e/ou éster de estanol, em que o emulsificante é produzido sem

aumentar, ou sem aumentar substancialmente, os ácidos graxos livres nos gêneros alimentícios, em que o emulsificante e/ou éster de esterol e/ou éster de estanol são gerados de constituintes do material alimentício pela enzima lipídio acil transferase.

[00053] Em outro aspecto, a presente invenção fornece o uso de uma enzima lipídio acil transferase para preparar, a partir de um material alimentício, um gênero alimentício que compreende um emulsificante e ou um éster de esterol e/ou éster de estanol, em que o emulsificante e/ou éster de esterol e/ou éster de estanol são gerados de constituintes do material alimentício pela enzima lipídio acil transferase.

[00054] Em outro aspecto, a presente invenção fornece o uso de uma enzima lipídio acil transferase para preparar, a partir de um material alimentício, um gênero alimentício que compreende pelo menos dois emulsificantes, no qual os dois emulsificantes são gerados de constituintes do material alimentício pela enzima lipídio acil transferase.

[00055] De acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido o uso de uma enzima lipídio acil transferase para preparar, a partir de um material alimentício, um gênero alimentício que compreende pelo menos dois emulsificantes e ou um éster de esterol e/ou éster de estanol, no qual os emulsificantes são produzidos sem aumentar, ou sem aumentar substancialmente, os ácidos graxos livres nos gêneros alimentícios, e no qual um ou ambos os emulsificantes e/ou éster de esterol e/ou éster de estanol é/são gerado(s) de constituintes do material alimentício pela enzima lipídio acil transferase.

[00056] Segundo um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido o uso de uma enzima lipídio acil transferase para preparar, a partir de um material alimentício, um gênero alimentício que compreende pelo menos dois emulsificantes e ou um éster de esterol e/ou éster de estanol, no qual um ou ambos os emulsificantes e/ou éster de esterol e/ou éster de estanol é/são gerado(s) de constituintes do material alimentício pela enzima lipídio acil transferase.

[00057] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece o uso de uma enzima lipídio acil transferase para preparar, a partir de um material alimentício, um gênero alimentício que compreende um éster de carboidrato, no qual o éster de carboidrato é gerado de constituintes do material alimentício pela enzima lipídio acil transferase.

[00058] Em outro aspecto, a presente invenção fornece o uso de uma enzima lipídio acil transferase para preparar, a partir de um material alimentício, um gênero alimentício que compreende pelo menos um éster de carboidrato e um emulsificante adicional, no qual o éster de carboidrato e o emulsificante são gerados de constituintes do material alimentício pela enzima lipídio acil transferase.

[00059] Em outro aspecto, a presente invenção fornece o uso de uma enzima lipídio acil transferase para preparar, a partir de um material alimentício, um gênero alimentício que compreende um emulsificante e um ou mais de um éster de carboidrato; éster de esteroide; éster de estanol; um éster de proteína; um monoglicerídeo ou um diglicerídeo, e em que o emulsificante e/ou o éster de carboidrato e/ou éster de esteroide e/ou éster de estanol e/ou o éster de proteína e/ou o monoglicerídeo e/ou o diglicerídeo são gerados de constituintes do material alimentício pela enzima lipídio acil transferase.

ASPECTOS DETALHADOS DA PRESENTE INVENÇÃO

[00060] O termo “lipídio acil transferase” tal como aqui utilizado, significa uma enzima que mesmo possuindo atividade de lipase (geralmente classificada como E.C. 3.1.1.x, conforme as Recomendações de Nomenclatura de Enzima (de 1992) do Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular) também possui atividade acil transferase (geralmente classificada como E.C. 2.3.1.x), pela qual a enzima é capaz de transferir um grupo acil de um lipídio a um ou mais substratos receptores, tais como um ou mais dos seguintes: um esteroide; um estanol; um carboidrato; uma proteína; uma subunidade de proteína; glicerol.

[00061] Preferivelmente, a enzima lipídio acil transferase para uso nos métodos e/ou os usos da presente invenção é capaz de transferir um grupo acil

de um lipídio (tal como aqui definido) a um ou mais dos seguintes substratos receptores acil: um esterol, um estanol, um carboidrato, uma proteína ou subunidades da mesma, ou um glicerol.

[00062] Para alguns aspectos o “acceptor de acil”, de acordo com a presente invenção, pode ser qualquer composto que compreende um grupo hidroxil (-OH), como por exemplo, álcools polivalentes, inclusive o glicerol; esteróis; estanois; carboidratos; hidroxil ácidos inclusive ácidos de frutas, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico e ácido ascórbico; proteínas ou uma subunidade das mesmas, como aminoácidos, hidrolisados de proteína e peptídeos (proteínas parcialmente hidrolisadas) por exemplo; e misturas e derivados dos mesmos. Preferivelmente, o “acceptor de acil” de acordo com a presente invenção não é a água.

[00063] Em uma modalidade, o acceptor de acil é preferivelmente não um monoglicerídeo e/ou um diglicerídeo.

[00064] Em um aspecto, preferivelmente a enzima é capaz de transferir um grupo acil de um lipídio para um esterol e/ou um estanol.

[00065] Em um aspecto, preferivelmente a enzima é capaz de transferir um grupo acil de um lipídio a um carboidrato.

[00066] Em um aspecto, preferivelmente a enzima é capaz de transferir um grupo acil de um lipídio para uma proteína ou uma subunidade da mesma. Adequadamente, a subunidade de proteína pode ser um ou mais dos seguintes: um aminoácido, um hidrolisado de proteína, um peptídeo, um dipeptídeo, um oligopeptídeo, um polipeptídeo.

[00067] Adequadamente na proteína ou subunidade de proteína, o acceptor de acil pode ser um ou mais dos seguintes constituintes da proteína ou da subunidade de proteína: uma serina, uma treonina, uma tirosina, ou uma cisteína.

[00068] Quando a subunidade de proteína é um aminoácido, adequadamente o aminoácido pode ser qualquer aminoácido conveniente. Adequadamente o aminoácido pode ser um ou mais dentre uma serina, uma treonina, uma tirosina, ou uma cisteína, por exemplo.

[00069] Em um aspecto, preferivelmente a enzima é capaz de transferir um grupo acil de um lipídio para o glicerol.

[00070] Em um aspecto, preferivelmente a enzima é capaz de transferir um grupo acil de um lipídio para um hidróxi ácido.

[00071] Em um aspecto, preferivelmente a enzima é capaz de transferir um grupo acil de um lipídio para um álcool polivalente.

[00072] Em um aspecto, a enzima lipídio acil transferase pode ser capaz de transferir um grupo acil de um lipídio a um esteroide e/ou um estanol, pode adicionalmente ser capaz de transferir o grupo acil de um lipídio a um ou mais dos seguintes: um carboidrato, uma proteína, uma subunidade de proteína, glicerol.

[00073] Preferivelmente, o substrato lipídico sobre o qual a enzima lipídio acil transferase atua, de acordo com a presente invenção, um ou mais dos seguintes lipídios: um fosfolipídio, como uma lecitina, por exemplo, fosfatidil colina, um triacilglicerídeo, uma cardiolipina, um diglicerídeo, ou um glicolipídio, como por exemplo, o digalactosil diglicerídeo (DGDG). Este substrato lipídico pode ser aqui referido como o “lipídio doador de acil”. O termo lecitina tal como aqui usado engloba a fosfatidilcolina, a fosfatidil etanolamina, o fosfatidil inositol, a fosfatidil serina e o fosfatidil glicerol.

[00074] Para alguns aspectos, preferivelmente o substrato lipídico sobre o qual a enzima lipídio acil transferase atua é um fosfolipídio, como a lecitina, por exemplo, a fosfatidilcolina.

[00075] Para alguns aspectos, preferivelmente o substrato lipídico é um glicolipídio, como DGDG, por exemplo.

[00076] Preferivelmente o substrato lipídico é um lipídio alimentício, isto é um lipídio componente de alguns gêneros alimentícios.

[00077] Para alguns aspectos, preferivelmente a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção é incapaz, ou substancialmente incapaz, da atuação em um triglicerídeo e/ou 1-monoglicerídeo e/ou 2-monoglicerídeo.

[00078] Adequadamente, o substrato lipídico ou lipídio acil doador pode

ser um ou mais lipídios presentes em um ou mais dos seguintes substratos: gorduras, inclusive toucinho, sebo e gordura de manteiga; os óleos inclusive óleos extraídos de ou derivados de óleo de palma, óleo de girassol, óleo de soja, óleo de açafrão, óleo de semente de algodão, óleo de sementes, óleo de milho, azeite de oliva, óleo de amendoim, óleo de coco, óleo de colza. A lecitina de soja, de colza ou gema de ovo é também um substrato conveniente de lipídio. O substrato lipídico pode ser um lipídio de aveia ou de outra planta, levando-se em consideração um material que contenha galacto lipídios.

[00079] Em um aspecto o lipídio doador de acil é preferivelmente a lecitina (como fosfatidilcolina) na gema de ovo.

[00080] Para alguns aspectos da presente invenção, o lipídio pode ser selecionado de lipídios que tenham um comprimento de cadeia de ácido graxo de 8 até 22 carbonos.

[00081] Em alguns aspectos da presente invenção, o lipídio pode ser selecionado de lipídios que tenham um comprimento de cadeia de ácido graxo de 16 até 22 carbonos, mais preferivelmente de 16 até 20 carbonos.

[00082] Em alguns aspectos da presente invenção, o lipídio pode ser selecionado de lipídios que tenham um comprimento de cadeia de ácido graxo não maior do que 14 carbonos, adequadamente de lipídios que tenham um comprimento de cadeia ácido graxo de 4 até 14 carbonos, adequadamente de 4 até 10 carbonos, adequadamente de 4 até 8 carbonos.

[00083] Adequadamente, a enzima lipídio acil transferase, de acordo com a presente invenção, pode expor uma ou várias das seguintes atividades lipase: atividade de glicolipase (E.C. 3.1.1.26), atividade triacilglicerol lipase (E.C. 3.1.1.3), atividade fosfolipase A2 (E.C. 3.1.1.4) ou atividade de A1 fosfolipase (E.C. 3.1.1.32). O termo “atividade glicolipase” tal como aqui usado engloba “a atividade galactolipase”.

[00084] Adequadamente, a enzima lipídio acil transferase, de acordo com a presente invenção, pode ter pelo menos uma ou várias das seguintes atividades: atividade de glicolipase (E.C. 3.1.1.26) e/ou atividade de A1 fosfolipase (E.C. 3.1.1.32) e/ou atividade de A2fosfolipase (E.C. 3.1.1.4).

[00085] Para alguns aspectos, a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção pode ter pelo menos glicolipase atividade (E. C. 3.1. 1.26).

[00086] Adequadamente, para alguns aspectos a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção pode ser capaz de transferir um grupo acil de um glicolipídio e/ou um fosfolipídio para um ou mais dos seguintes substratos receptores: um esterol, um estanol, um carboidrato, uma proteína, glicerol.

[00087] Para alguns aspectos, preferivelmente a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção é capaz de transferir um grupo acil de um glicolipídio e/ou um fosfolipídio para um esterol e/ou um estanol para formar pelo menos um éster de esterol e/ou um éster de estanol.

[00088] Para alguns aspectos, preferivelmente a enzima lipídio acil transferase, de acordo com a presente invenção, é capaz de transferir um grupo acil de um glicolipídio e/ou um fosfolipídio a um carboidrato para formar pelo menos um éster de carboidrato.

[00089] Para alguns aspectos, preferivelmente a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção é capaz de transferir um grupo acil de um glicolipídio e/ou um fosfolipídio a uma proteína para formar pelo menos o éster de proteína (ou um condensado de ácido graxo de proteína).

[00090] Para alguns aspectos, preferivelmente a enzima lipídio acil transferase, de acordo com a presente invenção, é capaz de transferir um grupo acil de um glicolipídio e/ou um fosfolipídio para o glicerol para formar pelo menos um diglicerídeo e/ou um monoglicerídeo.

[00091] Para alguns aspectos, preferivelmente a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção não exibe atividade triacilglicerol lipase (E.C. 3.1.1.3).

[00092] Em alguns aspectos, a enzima lipídio acil transferase pode ser capaz de transferir um grupo acil de um lipídio para um esterol e/ou um estanol. Desse modo, em uma modalidade, o “acceptor de acil” segundo a presente invenção pode ser um esterol ou um estanol ou uma combinação de ambos,

um esterol e um estanol.

[00093] Em uma modalidade, adequadamente o esterol e/ou estanol, podem compreender uma ou várias das seguintes características estruturais:

- i) um hidroxí grupo 3 beta ou um hidroxí grupo 3 alfa; e/ou
- ii) anéis A:B na posição *cis* ou anéis A:B na posição *trans* ou a ligação C₅-C₆ é insaturada.

[00094] Receptores esterol acil convenientes incluem o colesterol e os fitosteróis, por exemplo, alfa - sitosterol, beta-sitosterol, stigmasterol, ergosterol, campesterol, 5, 6-diidrosterol, brassicasterol, alfa-espinasterol, beta-espinasterol, gama-espinasterol, delta-espinasterol, fucosterol, dimosterol, ascosterol, serebisterol, episterol, anasterol, hiposterol, condilasterol, desmosterol, calinosterol, poriferasterol, clionasterol, esterol glicosídeos, e outras formas isoméricas naturais ou sintéticas e derivados.

[00095] Em um aspecto da presente invenção adequadamente mais de um esterol e/ou estanol podem atuar como aceptor de acil, adequadamente mais de dois esteróis e/ou estanois podem atuar como aceptor de acil. Em outras palavras, em um aspecto da presente invenção, adequadamente mais de um éster de esterol e/ou um éster de estanol podem ser produzidos. Adequadamente, quando o colesterol é o aceptor de acil, um ou mais esteróis ou um ou mais estanois adicionais, também podem atuar como aceptor de acil. Assim, em um aspecto, a presente invenção fornece um método para a produção *in situ* tanto de um éster de colesterol como de pelo menos um éster de esterol ou de estanol em combinação. Em outras palavras, a enzima lipídio acil transferase para alguns aspectos da presente invenção pode transferir um grupo acil tanto de um lipídio para o colesterol como para, pelo menos, um outro esterol e/ou, pelo menos um, estanol.

[00096] Em um aspecto, preferivelmente o esterol aceptor de acil é um ou mais dos seguintes: alfa-sitosterol, beta-sitosterol, stigmasterol, ergosterol e campesterol.

[00097] Em um aspecto, preferivelmente o esterol aceptor de acil é o colesterol. Quando esse é o caso, em que o colesterol é o aceptor de acil da

enzima lipídio acil transferase, a quantidade de colesterol livre no gênero alimentício é reduzida quando comparada com os gêneros alimentícios antes da exposição à enzima lipídio acil transferase e/ou quando comparando com alguns gêneros alimentícios equivalentes que não foram tratados com a enzima lipídio acil transferase.

[00098] Receptores estanol acil convenientes incluem os fitostanois, por exemplo, beta-sitostanol ou ss-sitostanol.

[00099] Em um aspecto, preferivelmente o acceptor de acil esterol e/ou estanol são um esterol e/ou um outro estanol diferentes do colesterol.

[000100] Em alguns aspectos, os gêneros alimentícios preparados de acordo com a presente invenção podem ser utilizados para reduzir o colesterol e/ou reduzir a lipoproteína de baixa densidade do soro sanguíneo. O colesterol e as lipoproteínas de baixa densidade do soro sanguíneo estão ambos associados com certas doenças nos seres humanos, tais como, por exemplo, aterosclerose e/ou doenças cardíacas. Desse modo, é visualizado que os gêneros alimentícios preparados de acordo com a presente invenção podem ser utilizados para reduzir os riscos de tais doenças.

[000101] Assim, em um aspecto a presente invenção fornece o uso de alguns gêneros alimentícios, de acordo com a presente invenção, para uso no tratamento e/ou na prevenção da aterosclerose e/ou de doença cardíaca.

[000102] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece um medicamento que compreende alguns gêneros alimentícios de acordo com a presente invenção.

[000103] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece um método de tratamento e/ou prevenção de uma doença em um paciente, ser humano ou animal, cujo método compreende a administração ao paciente de uma quantidade eficaz de um gênero alimentício de acordo com a presente invenção.

[000104] Adequadamente, o esterol e/ou o estanol “acceptor de acil” podem ser encontrados naturalmente dentro dos gêneros alimentícios. Alternativamente, o esterol e/ou o estanol podem ser acrescentados ao gênero

alimentício. Quando esse for o caso, em que um esterois e/ou um estanol são acrescentados ao gênero alimentício, o esterois e/ou estanol podem ser acrescentados antes, sipenalidadeneamente com, e/ou depois da adição da enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção. Adequadamente, a presente invenção pode englobar a adição de esteróis/estanóis exógenos, particularmente de fitosteróis/fitostanóis, ao gênero alimentício antes de, ou sipenalidadeneamente com, a adição da enzima de acordo com a presente invenção.

[000105] Para alguns aspectos, um ou mais dos esteróis presentes no gênero alimentício podem ser convertidos a um ou mais estanóis antes de, ou ao mesmo tempo em que, a enzima lipídio acil transferase é acrescentada, de acordo com a presente invenção. Qualquer método conveniente para converter esteróis em estanóis pode ser empregado. Por exemplo, a conversão pode ser realizada por hidrogenação química. A conversão pode ser conduzida antes da adição da enzima lipídio acil transferase, de acordo com a presente invenção, ou sipenalidadeneamente, com a adição da enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção. Adequadamente as enzimas para conversão de esterois a estanóis são ensinadas na WO 00/061771.

[000106] Adequadamente a presente invenção pode ser empregada para produzir ésteres de fitoestanol *in situ*, em alguns gêneros alimentícios. Os ésteres de fitoestanol aumentaram a solubilidade através das membranas lipídicas, a biodisponibilidade e melhoraram os benefícios para a saúde (ver por exemplo, WO 92/99640).

[000107] Em algumas modalidades da presente invenção, o éster de estanol e/ou éster de esterois pode ser um aromatizante e/ou um suavizante. Em tais exemplos, a presente invenção engloba a produção *in situ* de aromatizantes e/ou texturizantes.

[000108] Para alguns aspectos da presente invenção, a enzima lipídio acil transferase, de acordo com a presente invenção, pode utilizar um carboidrato como aceptor de acil. O carboidrato aceptor de acil pode ser um ou mais dos seguintes: um monossacárido, um dissacarídeo, um oligossacarídeo ou

um polissacarídeo. Preferivelmente, o carboidrato é um ou mais dos seguintes: glicose, frutose, frutose anidra, maltose, lactose, sacarose, galactose, xilose, xilo oligossacarídeos, arabinose, malto oligossacarídeos, tagatose, microtecina, ascopirona P, ascopirona T, cortalcerona.

[000109] Adequadamente, o carboidrato “acceptor de acil” pode ser encontrado naturalmente dentro dos gêneros alimentícios. Alternativamente, o carboidrato pode ser acrescentado ao gênero alimentício. Quando esse for o caso, de que o carboidrato é acrescentado ao gênero alimentício, o carboidrato pode ser acrescentado antes, simultaneamente com, e/ou depois da adição da enzima lipídio acil transferase, de acordo com a presente invenção.

[000110] Os ésteres de carboidratos podem funcionar como emulsificantes valiosos em gêneros alimentícios. Assim, quando esse for o caso, em que as funções da enzima são usadas para transferir o grupo acil para um açúcar, a invenção engloba a produção de um segundo emulsificante *in situ* no gênero alimentício.

[000111] Em algumas modalidades, a enzima lipídio acil transferase pode utilizar tanto um esterol como estanol e um carboidrato como um acceptor de acil.

[000112] A utilização de uma enzima lipídio acil transferase que pode transferir o grupo acil tanto para um carboidrato bem como para um esterol e/ou um estanol é em particular vantajosa para gêneros alimentícios à base de ovos. Em particular, a presença de açúcares, em particular da glicose, em ovos e em produtos à base de ovos, muitas vezes é vista como desvantajosa. A gema de ovo pode compreender até 1 % de glicose. Tipicamente, o ovo ou os produtos à base de ovos, podem ser tratados com a glicose oxidase para retirar alguma ou toda essa glicose. Entretanto, de acordo com a presente invenção, esse açúcar indesejável pode ser prontamente retirado por “esterificação” do açúcar para formar um éster do açúcar.

[000113] Em alguns aspectos da presente invenção, a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção, pode utilizar uma proteína como acceptor de acil. Adequadamente, a proteína pode ser uma ou várias das

proteínas encontradas em um gênero alimentício, por exemplo, em um produto de leite e/ou um produto de carne. Como forma apenas de exemplo, proteínas convenientes podem ser as encontradas no coalho ou no soro de leite, como lactoglobulina. Outra proteína conveniente inclui ovalbumina, gliadina, glutenina, puroindolina, proteína de transferência de lipídios dos grãos, e de miosina da carne.

[000114] Assim, de acordo com a presente invenção, podem ser atingidas uma ou várias das seguintes vantajosas propriedades: produção *in situ* de um emulsificante sem um aumento dos ácidos graxos livres; uma redução no acúmulo de ácidos graxos livres no gênero alimentício; uma redução dos níveis de colesterol livre no gênero alimentício; um aumento em ésters de esterol e/ou ésters de estanol; uma redução do colesterol e/ou lipoproteínas de baixa densidade no soro sanguíneo; um aumento em éster de carboidratos; uma redução de carboidratos livres indesejáveis.

[000115] Uma vantagem da presente invenção é que o(s) emulsificante(s) é(são) preparado(s) *in situ* no gênero alimentício sem um aumento, ou um substancial aumento, nos conteúdos ácidos graxos livres dos gêneros alimentícios. A produção de ácidos graxos livres pode ser prejudicial ao gênero alimentício. Em particular, os ácidos graxos livres estão relacionados com a liberação de odores e/ou de sabores no gênero alimentício, bem como outros efeitos prejudiciais, inclusive, por exemplo, gosto rançoso no queijo. Preferivelmente, o método de acordo com a presente invenção resulta na preparação *in situ* de um emulsificante, através do qual o acúmulo de ácidos graxos livres é reduzido e/ou eliminado. Sem desejar ser restringido pela teoria, de acordo com a presente invenção, o ácido graxo que é retirado do lipídio é transferido pela enzima lipídio acil transferase para um acceptor de acil, por exemplo, um esterol e/ou um estanol. Assim, o nível total de ácidos graxos livres no gênero alimentício não aumenta ou aumenta só em um grau insignificante. Isso está em uma situação diametralmente oposta àquela em que as lipases (E.C. 3.1.1.x) são usadas para produzir emulsificantes *in situ*. Particularmente, o uso de lipases pode resultar em uma quantidade aumentada

de ácidos graxos livres no gênero alimentício, o que pode ser prejudicial. De acordo com a presente invenção, o acúmulo de ácidos graxos livres é reduzido e/ou eliminado quando comparando com a quantidade de ácidos graxos livres que teria sido acumulada se uma enzima lipase, em particular uma enzima fosfolipase-A, tivesse sido usada em vez da enzima lipídio acil transferase, de acordo com a presente invenção.

[000116] A utilização de uma enzima lipídio acil transferase que pode transferir o grupo acil para um esterol e/ou estanol pode ser particularmente vantajosa para gêneros alimentícios à base de ovos. Em particular, foi encontrado que pode ser obtido um produto à base de ovos, com propriedades significativamente melhoradas, depois do tratamento com uma enzima lipídio acil transferase, tal como aqui definido quando comparado com produtos à base de ovos tratados com fosfolipases convencionais, como a LipopanF® (Novozymes A/S, Dinamarca), a Lecitase Ultra® (Novozymes A/S, Dinamarca) ou a Lipomod 22 L da Biocatalysts, por exemplo.

[000117] Preferivelmente, a enzima lipídio acil transferase, de acordo com a presente invenção, pode ser caracterizada usando-se os seguintes critérios:

(i) a enzima possui atividade acil transferase que pode ser definida como atividade de transferência de éster através da qual a parte acil de uma ligação éster original de um lipídio acil doador é transferida para um aceptor de acil para formar novo éster; e

(ii) a enzima compreende a seqüência tema GDSX de aminoácidos, na qual X é um ou mais dos seguintes resíduos aminoácidos L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M ou S.

[000118] Preferivelmente, o X do tema GDSX é L. Assim, preferivelmente a enzima de acordo com a presente invenção compreende o tema GSDL da seqüência de aminoácido.

[000119] O tema GDSX é compreendido por quatro aminoácidos conservados. Preferivelmente, a serina dentro do tema é uma serina catalítica da enzima lipídio acil transferase. Adequadamente, a serina do tema GDSX

pode estar em uma posição correspondente à Ser-16, na enzima lipolítica da *Aeromonas hydrophila*, ensinada em Brumlik e Buckley (*Journal of Bacteriology*, abril de 1996, Vol. 178, No. 7, págs 2060 - 2064).

[000120] Para determinar se uma proteína possui o tema GDSX, de acordo com a presente invenção, a seqüência é preferivelmente comparada com os perfis modelares ocultados de Markov (perfis HMM) do banco de dados PFAM.

[000121] O PFAM é um banco de dados com os domínios das famílias de proteínas. O PFAM contém múltiplos alinhamentos precisos da seqüência de cada família bem como os perfis modelares ocultados de Markov (perfil HMMs) utilizados para identificar a presença desses domínios em novas seqüências. Uma introdução ao PFAM pode ser encontrada em Bateman A. *et al.*, (2002) *Nucleic Acids Res.* 30; 276 - 280. Os perfis modelares ocultados de Markov são utilizados em diversos bancos de dados que auxiliam na classificação de proteínas, e para uma revisão veja Bateman A. e Haft D.H. (2002) *Brief Bioinform* 3; 236 - 245.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&listuids=12230032&dopt=Abstract>.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&listuids=11752314&dopt=Abstract>.

[000122] Para uma explicação detalhada os perfis modelares ocultados de Markov e como eles são aplicados no banco de dados PFAM ver Durbin R., Eddy S., e Krogh A. (1998) *Biological sequence analysis; probabilistic models of proteins e nucleic acids*. Cambridge University Press, ISBN 0-521-62041-4. O pacote do software Hammer pode ser obtido a partir da Universidade de Washington, St Louis, USA.

[000123] Alternativamente, o motivo GDSX pode ser identificado usando o pacote de software Hammer. As instruções são fornecidas no Durbin R., Eddy S., e Krogh A. (1998) *Biological sequence analysis; probabilistic models of proteins e nucleic acids*. Cambridge University Press, ISBN 0-521-62041-4, nas referências do mesmo, e no perfil HMMER2 fornecido dentro

desta especificação.

[000124] O banco de dados PFAM pode ser acessado, por exemplo, por vários servidores que estão atualmente localizados nas seguintes páginas:

<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>

<http://Pfam.wustl.edu/>

<http://Pfam.jouy.inra.fr/>

<http://Pfam.cgb.ki.se/>.

[000125] O banco de dados oferece uma facilidade de busca onde qualquer usuário introduzir uma sequência de proteína. Usando os parâmetros de referência do banco de dados, a sequência de proteína será então analisada quanto à presença de domínios PFAM. O domínio GDSX é um domínio estabelecido no banco de dados e como tal sua presença em qualquer pergunta de sequência será reconhecida. O banco de dados devolverá o alinhamento da sequência de consenso PFAM00657 em relação à sequência de pergunta.

[000126] Pode ser obtido um alinhamento múltiplo, incluindo a *Aeromonas salmonicida* ou a *Aeromonas hydrophila* por:

a) Manualmente

obtenção de um alinhamento da proteína de interesse com a sequência de consenso PFAM00657 e obtenção de um alinhamento P10480 com a sequência de consenso PFAM00657 depois do procedimento descrito acima;

ou

b) Através do banco de dados

Após a identificação da sequência de consenso PFAM00657, o banco de dados oferece a opção para mostrar um alinhamento da sequência de pergunta ao alinhamento origem da sequência de consenso PFAM00657. O P10480 é parte desse alinhamento origem e é indicado por GCAT_AERHY. Tanto a sequência de pergunta como o P10480 serão mostrados na mesma janela.

[000127] Sequência de referência da *Aeromonas hydrophila*

[000128] Os resíduos GDSX lipase da *Aeromonas hydrophila* são numerados no arquivo NCBI P10480, os números neste texto se referem aos números dados naquele arquivo que na presente invenção são utilizados para determinar os resíduos específicos de aminoácidos que, em uma modalidade preferencial, estão presentes na enzima lipídio acil transferases da invenção.

[000129] Realização do alinhamento PFAM (Figuras 33 e 34).

[000130] Os seguintes resíduos podem ser reconhecidos e, em uma modalidade preferível, podem estar presentes nas enzimas para uso nas composições e nos métodos da invenção:

Bloco 1 - bloco GDSX

oculto	oculto	oculto	oculto	Gly	Asp	Ser	oculto
28	29	30	31	32	33	34	35

Bloco 2 - bloco GANDY

oculto	Gly	oculto	Asn	Asp	oculto
130	131	132	133	134	135

bloco 3 - bloco HPT

His

309

[000131] Nos quais “oculto” significa um resíduo hidrofóbico selecionado a partir de Met, Ile, Leu, Val, Ala, Gly, Cys, His, Lys, Trp, Tyr, Phe.

[000132] Preferivelmente a enzima lipídio acil transferase para uso nas composições/métodos da invenção pode ser alinhada usando a sequência de consenso PFAM00657.

[000133] Preferivelmente, uma combinação positiva com os perfis modelares ocultados de Markov (perfis HMM), da família do domínio PFAM00657, indica a presença ou do domínio GDSL ou do domínio GDSX, de acordo com a presente invenção.

[000134] Preferivelmente, quando alinhada com a sequência de consenso PFAM00657, a enzima lipídio acil transferase para uso nas composições/métodos da invenção possuem pelo menos um, preferivelmente

mais de um, preferivelmente mais de dois, dos seguintes, um bloco GDSx, um bloco GANDY, um bloco HPT. Adequadamente, a enzima lipídio acil transferase pode ter um bloco GDSx e um bloco GANDY. Alternativamente, a enzima pode ter um bloco GDSx e um bloco HPT. Preferivelmente a enzima compreende pelo menos um bloco GDSx.

[000135] Preferivelmente, quando alinhada com a sequência de consenso PFAM00657, a enzima para uso nas composições/métodos da invenção possui pelo menos um, preferivelmente mais de um, preferivelmente mais de dois, preferivelmente mais de três, preferivelmente mais de quatro, preferivelmente mais de cinco, preferivelmente mais de seis, preferivelmente mais de sete, preferivelmente mais de oito, preferivelmente mais de nove, preferivelmente mais de dez, preferivelmente mais de onze, preferivelmente mais de doze, preferivelmente mais de treze, preferivelmente mais de catorze, dos seguintes resíduos aminoácidos quando em comparação com sequência de polipeptídios da *A. hidrofília* de referência, nominalmente SEQ ID N° 32: 28oculto, 29oculto, 30oculto, 31oculto, 32Gly, 33Asp, 34Ser, 35oculto, 130oculto, 131Gly, 132Oculto, 133Asn, 134Asp, 135oculto, 309His.

[000136] O domínio PFAM00657 GDSX é um identificador único que distingue as proteínas que possuem este domínio das demais enzimas.

[000137] A sequência de consenso PFAM00657 é mostrada na Figura 1 como SEQ ID N° 1. Isto é derivado da identificação da família PFAM 00657, banco de dados na versão 6, que também pode ser referida aqui com a PFAM00657.6.

[000138] A sequência de consenso pode ser atualizada usando versões posteriores do banco de dados PFAM.

[000139] Por exemplo, as Figuras 33 e 34 mostram o alinhamento PFAM da família 00657, da versão 11 do banco de dados, que também pode ser referida aqui como a PFAM00657.11.

[000140] A presença dos blocos GDSx, GANDY e a HPT é encontrada na família PFAM 00657 de ambas as versões do banco de dados. As futuras versões futuros lançamentos do banco de dados PFAM podem ser usadas para

identificar a família PFAM 00657.

[000141] Preferivelmente, a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção pode ser caracterizada usando os seguintes critérios:

(i) a enzima possui atividade acil transferase que pode ser definida como atividade de transferência de éster através da qual a parte acil de uma ligação éster original de um lipídio acil doador é transferida para um aceptor de acil para formar novo éster; e

(ii) a enzima compreende a seqüência motivo GDSX de aminoácidos, na qual X é um ou mais dos seguintes resíduos aminoácidos L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M ou S.

(iii) a enzima compreende a His-309 ou compreende um resíduo de histidina em uma posição correspondente a His-309 na enzima lipolítica da *Aeromonas hydrophila* mostrada na Figura 2 (SEQ ID Nº 2) ou na Figura 28 (SEQ ID Nº 32).

[000142] Preferivelmente, o resíduo aminoácido do motivo GDSX é L.

[000143] Na SEQ ID Nº 2 ou SEQ ID Nº 32, os 18 primeiros resíduos aminoácidos formam uma seqüência de sinal. A His-309 da seqüência de comprimento total, que é a proteína incluindo a seqüência de sinal, se iguala com a His-291 da parte madura da proteína, isto é, a seqüência sem a seqüência de sinal.

[000144] Preferivelmente, a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção, compreende o conjunto da seguinte tríade catalítica: Ser-34, Asp-134 e His-309 ou compreende um resíduo serina, um resíduo ácido aspártico e um resíduo de histidina, respectivamente em posições correspondendo a Ser-34, Asp-134 e His-309 na enzima lipolítica da *Aeromonas hydrophila* mostrada na Figura 2 (SEQ ID Nº 2) ou a Figura 28 (SEQ ID Nº 32). Como declarado anteriormente, na seqüência mostrada em SEQ ID Nº 2 ou SEQ ID Nº 32 de 18 primeiros resíduos aminoácidos formam uma seqüência de sinal. Os Ser-34, Asp-134 e His-309 da seqüência de comprimento total, que é a proteína incluindo a seqüência de sinal, se igual a Ser-16, Asp-116 e His-291 da parte madura da proteína, isto é a seqüência

sem a sequência de sinal. Na sequência de consenso PFAM00657, tal como mostrado na Figura 1 (SEQ ID Nº 1), os resíduos dos sítios ativos correspondem a Ser-7, Asp-157 e His-348.

[000145] Preferivelmente, a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção pode ser caracterizada usando o seguinte critério:

(i) a enzima possui atividade acil transferase que pode ser definida como atividade de transferência de éster através da qual a parte acil de uma ligação éster original de um lipídio acil doador é transferida para um aceptor de acil para formar novo éster; e

(ii) a enzima compreende pelo menos Gly-32, Asp-33, Ser-34, Asp-134 e His-309 ou compreende glicina, ácido aspártico, serina, ácido aspártico e resíduos de histidina em posições correspondente a Gly-32, Asp-33, Ser-34, Asp-134 e His-309, respectivamente, na enzima lipolítica da *Aeromonas hydrophila* mostrada na Figura 2 (SEQ ID Nº 2) ou a Figura 28 (SEQ ID Nº 32).

[000146] Adequadamente, a enzima lipídio aciltransferase de acordo com a presente invenção pode ser obtida, preferivelmente obtida, a partir de um ou mais dos seguintes organismos dos seguintes gêneros: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfitobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizo Saccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* e *Candida*.

[000147] Adequadamente, a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção pode ser obtida, preferivelmente obtida, de um ou mais dos seguintes organismos: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces rimosus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus pyogenes*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Desulfitobacterium dehalogenans*, *Bacillus sp*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrionaceae*, *Xylella fastidiosa*, *Sulfolobus solfataricus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Mesorhizobium loti*, *Ralstonia*

solanacearum, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis* e *Candida parapsilosis*.

[000148] Em um aspecto, preferivelmente a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção é obtenível, preferivelmente obtida, de um ou mais dos *Aeromonas hydrophila* ou *Aeromonas salmonicida*.

[000149] Adequadamente, a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção compreende uma ou várias das seguintes sequência de aminoácidos:

(i) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 2 (ver a Figura 2);

(ii) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 3 (ver a Figura 3);

(iii) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 4 (ver a Figura 4);

(iv) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 5 (ver a Figura 5);

(v) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 6 (ver a Figura 6);

(vi) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 12 (ver a Figura 14);

(vii) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 20 (Figura 16);

(viii) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 22 (Figura 18);

(ix) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 24 (Figura 20);

(x) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 26 (Figura 22);

(xi) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 28 (da Figura 24);

(xii) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 30 (da

Figura 26);

(xiii) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID Nº 32 (da Figura 28);

(xiv) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID Nº 34 (da Figura 30); ou uma sequência de aminoácidos que tem 75 % ou mais de identidade com quaisquer das seqüências mostradas como SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3, SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5, SEQ ID Nº 6, SEQ ID Nº 12, SEQ ID Nº 20, SEQ ID Nº 22, SEQ ID Nº 24, SEQ ID Nº 26, SEQ ID Nº 28, SEQ ID Nº 30, SEQ ID Nº 32, ou SEQ ID Nº 34.

[000150] Adequadamente, a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção compreende sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID Nº 2 ou como SEQ ID Nº 3 ou SEQ ID Nº 32 ou SEQ ID Nº 34, ou compreende uma sequência de aminoácidos que tem 75 % ou mais, preferivelmente 80 % ou mais, preferivelmente 85 % ou mais, preferivelmente 90 % ou mais, preferivelmente 95 % ou mais, de identidade com a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID Nº 2 ou a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID Nº 3 ou a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID Nº 32 ou a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID Nº 34.

[000151] Para os objetivos da presente invenção, o grau da identidade é baseado no número de elementos da seqüência que são os mesmos. O grau da identidade de acordo com a presente invenção pode ser adequadamente determinado por meio de programas de computador conhecidos na técnica, como GAP fornecida no pacote de programa GCG (Manual de Programa do Pacote Wisconsin, Versão 8, agosto de 1994, *Genetics Computer Group*, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, US 53711) (Needleman e Wunsch (1970), *J. of Molecular Biology* 48, 443 - 45) utilizando os seguintes ajustes para a comparação da seqüência de polipeptídeo: penalidade de criação GAP 3,0 e penalidade de extensão GAP 0,1.

[000152] Adequadamente a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção compreende uma sequência de aminoácidos que tem 80 % ou mais, preferivelmente 85 % ou mais, mais preferivelmente 90 % ou

mais e mesmo mais preferivelmente 95 % ou mais de identidade com quaisquer das seqüências mostradas como SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3, SEQ ID Nº 4 SEQ ID Nº 5, SEQ ID Nº 6, SEQ ID Nº 12, SEQ ID Nº 20, SEQ ID Nº 22, SEQ ID Nº 24, SEQ ID Nº 26, SEQ ID Nº 28, SEQ ID Nº 30, SEQ ID Nº 32, ou SEQ ID Nº 34.

[000153] Adequadamente, a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção compreende uma ou várias das seguintes sequência de aminoácidos:

(a) uma sequência de aminoácidos mostrada como resíduos de aminoácidos 1 - 100 da SEQ ID Nº 2 ou SEQ ID Nº 32;

(b) uma sequência de aminoácidos mostrada como resíduos de aminoácidos 101 - 200 da SEQ ID Nº 2 ou SEQ ID Nº 32;

(c) uma sequência de aminoácidos mostrada como resíduos de aminoácidos 201 - 300 da SEQ ID Nº 2 ou SEQ ID Nº 32 ou;

(d) uma sequência de aminoácidos que tem 75 % ou mais, preferivelmente 85 % ou mais, mais preferivelmente 90 % ou mais, mesmo mais preferivelmente 95 % ou mais de identidade com quaisquer das seqüências de aminoácidos definidas acima nos itens de (a) a (c).

[000154] Adequadamente, a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção compreende uma ou várias das seguintes sequência de aminoácidos:

(a) uma sequência de aminoácidos mostrada como resíduos de aminoácidos 28 - 39 da SEQ ID Nº 2 ou SEQ ID Nº 32;

(b) uma sequência de aminoácidos mostrada como resíduos de aminoácidos 77 - 88 da SEQ ID Nº 2 ou SEQ ID Nº 32;

(c) uma sequência de aminoácidos mostrada como resíduos de aminoácidos 126 - 136 da SEQ ID Nº 2 ou SEQ ID Nº 32;

(d) uma sequência de aminoácidos mostrada como resíduos de aminoácidos 163 - 175 da SEQ ID Nº 2 ou SEQ ID Nº 32;

(e) uma sequência de aminoácidos mostrada como resíduos de aminoácidos 304 - 311 da SEQ ID Nº 2 ou SEQ ID Nº 32 ou;

(f) uma sequência de aminoácidos que tem 75 % ou mais, preferivelmente 85 % ou mais, mais preferivelmente 90 % ou mais, mesmo mais preferivelmente 95 % ou mais identidade com quaisquer das sequências de aminoácidos definidas acima nos itens de (a) a (e).

[000155] Adequadamente, a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos produzida pela expressão de uma ou mais das seguintes sequência de:

(a) a sequência de nucleotídeos mostrada como SEQ ID Nº 7 (ver a Figura 9);

(b) a sequência de nucleotídeos mostrada como SEQ ID Nº 8 (ver a Figura 10);

(c) a sequência de nucleotídeos mostrada como SEQ ID Nº 9 (ver a Figura 11);

(d) a sequência de nucleotídeos mostrada como SEQ ID Nº 10 (ver a Figura 12);

(e) a sequência de nucleotídeos mostrada como SEQ ID Nº 11 (ver a Figura 13);

(f) a sequência de nucleotídeos mostrada como SEQ ID Nº 13 (ver a Figura 15);

(g) a sequência de nucleotídeos mostrada como SEQ ID Nº 21 (ver a Figura 17);

(h) a sequência de nucleotídeos mostrada como SEQ ID Nº 23 (ver a Figura 19);

(i) a sequência de nucleotídeos mostrada como SEQ ID Nº 25 (ver a Figura 21);

(j) a sequência de nucleotídeos mostrada como SEQ ID Nº 27 (ver a Figura 23);

(k) a sequência de nucleotídeos mostrada como SEQ ID Nº 29 (ver a Figura 25);

(l) a sequência de nucleotídeos mostrada como SEQ ID Nº 31 (ver a Figura 27);

(m) a sequência de nucleotídeos mostrada como SEQ ID Nº 33 (ver a Figura 29);

(n) a sequência de nucleotídeos mostrada como SEQ ID Nº 35 (ver a Figura 31);

(o) ou uma sequência de nucleotídeos que tem 75 % ou mais de identidade com quaisquer das seqüências mostradas como SEQ ID Nº 7, SEQ ID Nº 8, SEQ ID Nº 9, SEQ ID Nº 10, SEQ ID Nº 11, SEQ ID Nº 13, SEQ ID Nº 21, SEQ ID Nº 23, SEQ ID Nº 25, SEQ ID Nº 27, SEQ ID Nº 29, SEQ ID Nº 31, SEQ ID Nº 33 ou SEQ ID Nº 35.

[000156] Adequadamente a sequência de nucleotídeos pode ter 80 % ou mais, preferivelmente 85 % ou mais, mais preferivelmente 90 % ou mais e mesmo mais preferivelmente 95 % ou mais de identidade com quaisquer das seqüências mostradas como SEQ ID Nº 7, SEQ ID Nº 8, SEQ ID Nº 9, SEQ ID Nº 10, SEQ ID Nº 11, SEQ ID Nº 13, SEQ ID Nº 21, SEQ ID Nº 23, SEQ ID Nº 25, SEQ ID Nº 27, SEQ ID Nº 29, SEQ ID Nº 31, SEQ ID Nº 33 ou SEQ ID Nº 35.

[000157] Em um aspecto, a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção podem ser lecitina:colesterol acil transferases (LCAT) ou variante das mesmas (por exemplo, uma variante feita pela evolução molecular).

[000158] LCATs convenientes são conhecidos na técnica e podem ser obtidas de um ou mais dos seguintes organismos, por exemplo: mamíferos, rato, camundongos, frangos, *Drosophila melanogaster*, plantas, incluindo a *Arabidopsis* e *Oryza sativa*, nematóides, fungos e levedura.

[000159] Em uma modalidade, a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção, pode ser a enzima lipídio acil transferase obtida, preferivelmente obtida, das 10 melhores cepas de *E. coli* abrigando a pPet12aAhydro e a pPet12aASalmo depositadas pela Danisco A/S de Langebrogade 1, DK-1001 Copenhagen K, Dinamarca, sob o Trligado de Budapeste para o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microrganismos com objetivos de Depósito de Patentes junto ao *National*

Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria (NCIMB) 23 St. Machar Street, Aberdeen, Escócia, Reino Unido, em 22 de Dezembro de 2003 com os seguintes números de registro NCIMB 41204 e NCIMB 41205, respectivamente.

[000160] Preferivelmente, quando se está realizando uma metodologia de acordo com a presente invenção o produto é produzido sem aumentar ou substancialmente aumentar os ácidos graxos livres no gênero alimentício.

[000161] O termo “transferase” tal como aqui utilizado, é intercambiável com o termo “lipídio acil transferase”.

[000162] Adequadamente, a enzima lipídio acil transferase tal como definida, catalisa uma ou várias das reações seguintes: interesterificação, transesterificação, alcoólise e hidrólise.

[000163] O termo “interesterificação” se refere a transferência catalisada enzimaticamente de grupos acil entre um doador de lipídio e receptor de lipídio, em que o doador de lipídio não é um grupo acil livre.

[000164] O termo “transesterificação” tal tal como aqui utilizado, significa transferência catalisada enzimaticamente de um grupo acil de um doador de lipídio (diferente de um ácido graxo livre) a um aceptor de acil (diferente de água).

[000165] Tal tal como aqui utilizado, o termo “alcoólise” se refere à clivagem enzimática de uma ligação covalente de um derivado ácido pela reação com um álcool ROH de modo que um dos produtos se combine com o H do álcool e outro produto se combine com o grupo OR do álcool.

[000166] Tal como aqui usado, o termo “álcool” se refere a um composto alquila contendo um grupo hidroxila.

[000167] Tal tal como aqui utilizado, o termo “hidrólise” se refere a transferência catalisada enzimaticamente de um grupo acil de um lipídio ao grupo OH de uma molécula de água. A transferência de acil que resulta da hidrólise necessita da separação da molécula de água.

[000168] O termo “sem aumentar ou sem aumentar substancialmente os ácidos graxos livres” tal como aqui utilizado, significa que preferivelmente a

lipídio acil transferase, de acordo com a presente invenção, tem 100 % de atividade transferase (isto é transfere 100 % dos grupos acil de um doador acil para acceptor de acil, sem atividade hidrolítica); contudo, a enzima pode transferir menos de 100 % dos grupos acil presentes no lipídio doador de acil para o acceptor de acil. Em tal caso, preferivelmente a atividade da acil transferase conta por pelo menos 5 %, mais preferivelmente pelo menos 10 %, mais preferivelmente pelo menos 20 %, mais preferivelmente pelo menos 30 %, mais preferivelmente pelo menos 40 %, mais preferivelmente 50 %, mais preferivelmente pelo menos 60 %, mais preferivelmente pelo menos 70 %, mais preferivelmente pelo menos 80 %, mais preferivelmente pelo menos 90 % e mais preferivelmente pelo menos 98 % da atividade enzimática total. O percentual de atividade transferase (isto é a atividade transferase como uma porcentagem da atividade enzimática total) pode ser determinado pelo seguinte protocolo:

Protocolo da determinação de percentual da atividade acil transferase:

[000169] Um gênero alimentício ao qual uma enzima lipídio acil transferase, de acordo com a presente invenção, tenha sido acrescentado, pode ser extraído seguindo a reação enzimática com $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1 e a fase orgânica que contém o material lipídico é isolada e analisada por GLC e HPLC, segundo o procedimento detalhado abaixo. Da análise GLC e HPLC são determinadas as quantidades de ácidos graxos livres e um ou mais de ésteres esterol/estanol; éster de carboidratos, ésteres de proteína; diglicerídeos; ou os monoglicerídeos. Um gênero alimentício de controle ao qual nenhuma enzima de acordo com a presente invenção foi acrescentada, é analisado do mesmo modo.

Cálculos:

[000170] Dos resultados das análises de GLC e HPLC pode ser calculado o aumento em ácidos graxos livres e ésteres esterol/estanol e/ou éster de carboidratos e/ou ésteres proteína e/ou diglicerídeos e/ou monoglicerídeos:

$$\Delta \% \text{ ácido graxo} = \% \text{ ácido graxo(enzima)} - \% \text{ ácido graxo(controle)}; \text{ o}$$

Mv do ácido graxo = peso molecular médio dos ácidos graxos;

$A = \Delta \% \text{ éster de esterol} / \text{Mv éster de esterol}$ (onde $\Delta \% \text{ éster de esterol} = \% \text{ éster de esterol} / \text{éster de estanol (enzima)} - \% \text{ éster de esterol} / \text{éster de estanol (controle)}$) e Mv do éster de esterol = peso molecular médio do éster de esterol / éster de estanol). Aplicável onde acceptor de acil é um esterol e/ou estanol;

$B = \Delta \% \text{ éster de carboidrato} / \text{Mv éster de carboidrato}$ (onde $\Delta \% \text{ éster de esterol} = \% \text{ éster de carboidrato(enzima)} - \% \text{ éster de carboidrato de Fe (controle)}$) e Mv do carboidrato = peso molecular médio do éster de carboidrato). Aplicável onde acceptor de acil é um carboidrato;

$C = \Delta \% \text{ éster de proteína} / \text{Mv éster de proteína}$ (onde $\Delta \% \text{ éster de proteína} = \% \text{ éster de proteína(enzima)} - \% \text{ éster de proteína(controle)}$) e Mv da proteína = peso molecular médio do éster de proteína). Aplicável onde acceptor de acil é uma proteína e;

$D = \text{o valor absoluto de diglicerídeo e/ou monoglicerídeo} / \text{Mv di/monoglicerídeo}$ (onde $\Delta \% \text{ diglicerídeo e/ou monoglicerídeo} = \% \text{ diglicerídeo e/ou monoglicerídeo(enzima)} - \% \text{ diglicerídeo e/ou monoglicerídeo(controle)}$) e Mv di/monoglicerídeo = peso molecular médio de diglicerídeo e/ou monoglicerídeo). Aplicável onde acceptor de acil é o glicerol.

[000171] A atividade transferase é calculada como uma porcentagem da atividade enzimática total:

% de atividade transferase =

$$\frac{A^* + B^* + C^* + D^* \times 100}{A^* + B^* + C^* + D^* + \Delta \% \text{ ácido graxo} / (\text{Mv de ácido graxo})}$$

$A^* + B^* + C^* + D^* + \Delta \% \text{ ácido graxo} / (\text{Mv de ácido graxo})$

* - deletar como for apropriado.

[000172] Se os ácidos graxos livres forem aumentados no gênero alimentício eles são preferivelmente não aumentados substancialmente, isto é a um grau significante. Essa expressão quer significar que o aumento no ácido graxo livre não afeta adversamente a qualidade dos gêneros alimentícios.

[000173] Em alguns aspectos da presente invenção, o termo “sem aumentar substancialmente ácidos graxos livres” tal como aqui utilizado,

significa a quantidade de ácido graxo livre em alguns gêneros alimentícios ou composição tratada com uma enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção é menor do que a quantidade de ácido graxo livre produzido no gênero alimentício ou composição quando uma enzima diferente de uma enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção foi usada, tal como, por exemplo, quando comparado com a quantidade de ácido graxo livre produzido quando foi usada uma enzima fosfolipase convencional, por exemplo, a LipopanF® (Novozymes A/S, Dinamarca).

[000174] O termo “*in situ*” tal como aqui utilizado, significa que o emulsificante e/ou o éster de esterol/estanol e/ou o éster de carboidratos e/ou o éster de proteínas e/ou mono- ou diglicerídeos são produzidos dentro dos gêneros alimentícios ou dentro de uma fração dos gêneros alimentícios. Isto contrasta a situação onde o emulsificante e/ou o éster de esterol/estanol e/ou o éster de carboidratos e/ou o éster de proteínas e/ou o mono- ou diglicerídeos são produzidos separadamente dos gêneros alimentícios e acrescentados, como produtos formados, ao gênero alimentício durante a preparação dos mesmos. Em outras palavras, o termo “*in situ*” tal como aqui utilizado, significa que pela adição da enzima lipídio acil transferase, de acordo com a presente invenção, a alguns gêneros alimentícios, ou aos ingredientes/materiais alimentícios que constituem os gêneros alimentícios, um emulsificante e/ou éster de esterol e/ou éster de estanol e/ou um éster de carboidrato e/ou um éster de proteína e/ou um mono- ou diglicerídeo, podem ser produzidos a partir de componentes dos gêneros alimentícios. Adequadamente, os componentes dos gêneros alimentícios podem ser o substrato para a enzima. Se necessário, os componentes dos gêneros alimentícios podem ser suplementados pela adição de um ou mais componentes adicionais, sendo que tais componentes adicionais podem ser os mesmos componentes já presentes no gênero alimentício ou podem ser complementares àqueles componentes já presentes no gênero alimentício. Para se evitar a dúvida, em uma modalidade, o método de acordo com a presente invenção pode ser um método para a produção de um emulsificante

e/ou éster de esteroide e/ou éster de estanol e/ou um éster de carboidrato e/ou um éster de proteína e/ou a mono- ou diglicerídeo *in situ* em um gênero alimentício e não é um método para preparar um emulsificante e/ou éster de esteroide e/ou éster de estanol (por exemplo, é uma forma isolada e/ou purificada) para a adição posterior a alguns gêneros alimentícios.

[000175] Em uma outra modalidade a lipase acil transferase pode ser usada durante o processamento do alimento, mas não permanecer no gênero alimentício. Por exemplo, a lipase acil transferase pode ser imobilizada, permitindo que seja reutilizada.

[000176] Preferivelmente, a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção é capaz de transferir um grupo acil de um lipídio para um esteroide e/ou estanol e/ou um carboidrato e/ou uma proteína e/ou glicerol quando presente em um ambiente polar, preferivelmente em um ambiente aquoso, preferivelmente uma água contendo os gêneros alimentícios. Adequadamente, o ambiente aquoso pode ser um tampão aquoso ou ser a fase aquosa em alguns gêneros alimentícios.

[000177] O termo “ambiente aquoso”, tal como aqui utilizado, preferivelmente significa um ambiente que é ausente um solvente orgânico, preferivelmente ausente um solvente orgânico polar, mais preferivelmente ausente um solvente orgânico não-comestível. Em particular, o termo “ambiente aquoso” pode se referir a um ambiente ao qual nenhum solvente orgânico exógeno, preferivelmente nenhum solvente orgânico polar, tenha sido acrescentado. O termo solvente orgânico tal como aqui utilizado, não engloba óleos alimentícios, preferivelmente não engloba óleos alimentícios que possuem altos teores de lipídios não-polares. Em uma modalidade o termo o solvente orgânico pode excluir solventes orgânicos comestíveis, como etanol, propileno glicol e/ou glicerol. Adequadamente, o ambiente aquoso de acordo com a presente invenção, pode compreender menos de 80 % em volume de solventes orgânicos, menos de 70 % em volume de solventes orgânicos, menos de 50 % em volume de solventes orgânicos, menos de 30 % em volume de solventes orgânicos, mais preferivelmente menos de 15 % em volume de

solventes orgânicos, mais preferivelmente menos de 5 %. Adequadamente os gêneros alimentícios podem compreender entre 1 e 5 % de solvente orgânico, por exemplo, etanol. Entretanto, quando os gêneros alimentícios compreendem tal solvente orgânico, preferivelmente o solvente orgânico é produzido endogenamente, internamente, ao gênero alimentício. Isto é, quando os gêneros alimentícios compreendem tal solvente orgânico, preferivelmente o solvente orgânico não é um solvente orgânico exógeno.

[000178] O termo “gênero alimentício” tal como aqui utilizado, significa uma substância que é conveniente para consumo de seres humanos e/ou animais.

[000179] Adequadamente, o termo “gênero alimentício” tal como aqui utilizado pode significar alguns gêneros alimentícios em uma forma que está pronta para o consumo. Alternativamente ou, além disso, contudo, o termo gênero alimentício tal como aqui utilizado, pode significar um ou mais materiais alimentícios que são utilizados na preparação de alguns gêneros alimentícios. Como forma somente de exemplo, o termo gêneros alimentícios engloba tanto produtos assados produzidos da massa de farinha como a massa de farinha usada na preparação dos ditos produtos assados.

[000180] Em um aspecto preferencial a presente invenção fornece alguns gêneros alimentícios tal como definidos anteriormente sendo que os gêneros alimentícios são selecionados de um ou mais dos seguintes: ovos, produtos à base de ovos, incluindo, mas não limitado à maionese, molhos de salada, condimentos, sorvetes, ovo em pó, gema de ovo modificada e produtos feitos dos mesmos; as mercadorias cozidas no forno, incluindo pães, bolos, produtos doces de massa de farinha, massas folhadas de farinha, massas líquidas, bolos doces, rosquinhas de massa frita, bolachas, biscoitos finos e biscoitos; doces confeitados, incluindo chocolate, balas, caramelos, halawa, chicletes, incluindo chicletes sem açúcar e chicletes com açúcar, chicletes de bola, chicletes macios de bola, gomas de mascar e pudins; produtos congelados incluindo sorvetes de frutas, produtos de leite preferivelmente congelados, incluindo sorvete e sorvete de iogurte; produtos de laticínios,

incluindo queijo, manteiga, leite, café cremoso, creme batido, manjares em creme, bebidas de leite e iogurtes; musses, cremes vegetais batidos, produtos de carne, incluindo produtos processados de carne; óleos comestíveis e gorduras, produtos batidos aerados e não aerados, emulsões de óleo-em-água, emulsões de água-em-óleo, margarina, recheios com baixo teor de gordura incluindo gorduras vegetais hidrogenadas e cremes vegetais, incluindo os de baixo e muito baixo teor de gordura; molhos, maionese, molhos à base de nata, sopas a base de nata, bebidas, emulsões de condimento e guarnições.

[000181] Adequadamente os gêneros alimentícios de acordo com a presente invenção podem ser “alimentos finos”, inclusive bolos, doces, confeitados, chocolates, cremes e assim por diante.

[000182] Em um aspecto os gêneros alimentícios de acordo com a presente invenção podem ser produtos de massa de farinha ou produtos cozido no forno, como um pão; um produto frito, uma refeição leve, bolos, tortas, bolos de chocolate, brownies, macarrões, itens de lanche tais como biscoitos água-e-sal (cream crackers), biscoitos finos de graham, roscas salgadas, batatas fritas, e massa.

[000183] Em um aspecto adicional, os gêneros alimentícios de acordo com a presente invenção podem ser produtos alimentícios derivados de uma planta tal como farinhas, misturas para bolo, óleos, gorduras, manteiga de cacau, acompanhamentos para o café, molhos de salada, margarina, gordura vegetal hidrogenada, manteiga de amendoim, produtos com baixo teor de gordura, sorvetes, óleos de cozinha.

[000184] Em outro aspecto, os gêneros alimentícios de acordo com a presente invenção podem ser um produto de leite, inclusive manteiga, leite, nata, queijos tais como queijos naturais, processados, e queijos imitativos em várias formas (inclusive picado, em pedaços, fatias ou ralado), requeijão, sorvete, sobremesas congeladas, iogurte, bebidas de iogurte, manteiga, gordura de leite desidratada, e outros produtos de leite. A enzima de acordo com a presente invenção pode melhorar a estabilidade da gordura em produtos de leite.

[000185] É particularmente vantajoso utilizar a presente invenção em queijos já que a produção de ácidos graxos livres no queijo se associa com um gosto de “sabão”. Assim, o uso de uma enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção vantajosamente produz um queijo sem gosto de “sabão”.

[000186] Em outro aspecto, os gêneros alimentícios de acordo com a presente invenção podem ser produtos alimentícios que contenham ingredientes de origem animal, como produtos de carne processada, óleo de cozinha e produtos com baixo teor de gordura.

[000187] Em um aspecto adicional, os gêneros alimentícios de acordo com a presente invenção podem ser uma bebida, um fruto, uma mistura de frutas, um vegetal ou vinho. Em alguns casos a bebida pode conter até 20 g/l de fitoesteróis adicionados.

[000188] Em outro aspecto, os gêneros alimentícios de acordo com a presente invenção podem ser uma forragem animal. A forragem pode ser enriquecida por fitoesterol e/ou fitoestanois, preferivelmente por beta-sitoesterol/estanol. Adequadamente, a forragem pode ser alimentos de aves domésticas. Quando os produtos alimentícios são alimentos para aves domésticas, a presente invenção pode ser usada para baixar o teor de colesterol de ovos produzidos por aves domésticas alimentadas com os produtos alimentícios de acordo com a presente invenção.

[000189] Em um aspecto preferivelmente os gêneros alimentícios são selecionados de um ou mais dos seguintes: ovos, produtos à base de ovos, inclusive maionese, molhos de salada, condimentos, sorvete, gema de ovo em pó, gema de ovo modificada e produtos feitos dos mesmos.

[000190] Preferivelmente os gêneros alimentícios de acordo com a presente invenção são gêneros alimentícios contendo água. Adequadamente os gêneros alimentícios podem compreender uma quantidade de água de de 10 a 98 %, adequadamente de 14 a 98 %, adequadamente água de 18 a 98 %, adequadamente de 20 a 98 %, adequadamente de 40 a 98 %, adequadamente de 50 a 98 %, adequadamente de 70 a 98 %, adequadamente de 75 a 98 %.

[000191] Para alguns aspectos, preferivelmente os gêneros alimentícios de acordo com a presente invenção não são o óleo puro e extraído da planta tal, como azeite de oliva, o óleo de girassol, óleo de amendoim, óleo de colza, por exemplo. Para se evitar a dúvida, em alguns aspectos da presente invenção, os produtos alimentícios de acordo com a presente invenção podem compreender um óleo, mas preferivelmente os produtos alimentícios não são principalmente compostos de óleo ou misturas de óleo. Para alguns aspectos, preferivelmente os gêneros alimentícios compreendem menos de 95 % de lipídios, preferivelmente menos de 90 % de lipídios, preferivelmente menos de 85 %, preferivelmente de menos de 80 % de lipídios. Assim, para alguns aspectos da presente invenção o óleo pode ser um componente dos produtos alimentícios, mas preferivelmente os produtos alimentícios não são um óleo por si.

[000192] As reivindicações da presente invenção devem ser interpretadas de modo a incluir cada um dos produtos e gêneros alimentícios listados acima.

[000193] Quando esse for o caso, de que um éster de carboidrato é produzido de acordo com a presente invenção, o éster de carboidrato é preferivelmente éster oligossacarídio, um éster monosacárido ou um éster dissacarídio.

[000194] Adequadamente, o éster de carboidrato quando produzido de acordo com a presente invenção pode ser um ou mais dos seguintes: éster de glicose, éster de frutose, éster de frutose anidra, éster de maltose, éster de lactose, éster de galactose, éster de xilose, éster de xilo oligossacarídio, éster de arabinose, éster de malto oligossacarídio, éster de tagatose, éster de sacarose, éster de microtecina, éster de ascopirona P, éster de ascopirona T ou éster de cortalcerona.

[000195] Preferivelmente, o éster de carboidrato quando produzido de acordo com a presente invenção é um ou mais dos seguintes: um carboidrato mono éster, um açúcar mono ester, um oligossacarídio mono éster, um trisaccharide mono éster, um dissacarídio mono ester, um monosacárido mono

éster, uma glicose mono éster, uma frutose mono éster, frutose anidra mono éster, maltose mono éster, lactose mono éster, galactose mono éster, xilose mono éster, xilo oligossacarídeo mono éster, arabinose mono éster, malto oligossacarídeo mono éster, tagatose mono éster, sacarose mono éster, éster de microtecina, éster de ascopirona P, éster de ascopirona T ou éster de cortalcerona.

[000196] Em uma modalidade, o éster de microtecina, éster de ascopirona P, éster de ascopirona T e/ou éster de cortalcerona podem funcionar como um agente antimicrobiano. Alternativamente ou, além disso, o éster de microtecina, o éster de ascopirona P, o éster de ascopirona T e/ou o éster de cortalcerona podem funcionar como um, ou ambos, um antioxidante e/ou um emulsificante.

[000197] Preferivelmente, a formação do éster de carboidrato (se algum) de acordo com a presente invenção é independente da UDP-glicose.

[000198] Preferivelmente, o material alimentício de acordo com a presente invenção não compreende a UDP-glicose, ou só compreende a UDP-glicose em quantidades insignificantes.

[000199] Adequadamente, o emulsificante de acordo com a presente invenção pode ser, por exemplo, um ou mais dos seguintes: um diglicerídeo, um monoglicerídeo, como 1-monoglicerídeo ou uma lisolecitina, como a lisofosfatidilcolina, por exemplo, um digalactosil monoglicerídeo (DGMG). O emulsificante é preferivelmente produzido do lipídio acil doador depois da retirada de um ou mais grupos acil do dito lipídio acil doador. O termo lisolecitina tal como aqui utilizado, engloba lisofosfatidilcolina, lisofosfatidil etanolamina, lisofosfatidil inositol, lisofosfatidil serina e lisofosfatidil glicerol.

[000200] Quando um dos emulsificantes é um éster de carboidrato, o segundo emulsificante pode ser, por exemplo, um ou mais dos seguintes: um diglicerídeo, um monoglicerídeo, como o 1-monoglicerídeo, lisofosfatidilcolina, ou digalactosil monoglicerídeo (DGMG). O segundo emulsificante é preferivelmente produzido do lipídio acil doador depois da retirada de um ou mais grupos acil do dito lipídio acil doador. O termo lisofosfatidilcolina tal como

aqui utilizado, é sinônimo ao termo lisolecitina e esses termos podem ser utilizados aqui de modo intercambiável.

[000201] Preferivelmente o segundo emulsificante é DGMG. Adequadamente, o DGMG é produzido *in situ* pela retirada de um grupo acil do DGDG com a transferência do grupo acil retirado para um carboidrato para formar um éster de carboidrato.

[000202] Quando um dos emulsificantes é um éster de proteína e/ou um diglicerídeo e/ou um monoglicerídeo, o segundo emulsificante pode ser, por exemplo, um ou mais dos seguintes: um diglicerídeo, um monoglicerídeo, como 1-monoglicerídeo, lisofosfatidilcolina, ou digalactosil monoglicerídeo (DGMG). O segundo emulsificante é preferivelmente produzido do lipídio acil doador depois da retirada de um ou mais grupos acil do dito lipídio acil doador. O termo lisofosfatidilcolina tal como aqui utilizado, é sinônimo ao termo lisolecitina e esses termos podem ser utilizados aqui de modo intercambiável.

[000203] Em uma modalidade a lipídio acil transferase da invenção pode ser usada em um processo da preparação de um gênero alimentício como um óleo para cozinhar, margarina ou para untar, na qual os gêneros alimentícios naturalmente contêm, ou foram complementados com, glicerol, pelo menos um fosfolipídio (por exemplo, lecitina) e/ou glicolipídio (por exemplo, digalactosil-diglicerídeo), e opcionalmente um fitoesterol ou fitoestanol.

[000204] Quando usado como um óleo que cozinha ou margarina, os gêneros alimentícios podem ter realçado propriedades plattering anti. Além disso, ou alternativamente os gêneros alimentícios podem ter uma ou várias propriedades técnicas benéficas, por exemplo, melhor estabilidade oxidativa, propriedades emulsificantes melhoradas, ou benefícios para a saúde.

[000205] Em uma modalidade o lipídio acil transferase da invenção pode estar na preparação de gêneros alimentícios com baixo teor de gordura, como recheios com baixos teores de gordura, molhos de salada com baixo teor de gordura, maionese com baixo teor de gordura, margarinas com baixo teor de gordura, etc. Em tais produtos alimentícios com baixo teor de gordura, o

conteúdo de gordura é tipicamente reduzido pela adição de emulsificantes e água adicional em comparação com o equivalente com mais alto teor de gordura.

[000206] As lipídio acil transferases usadas nas composições e nos métodos da invenção são compreendidos como possuindo propriedades únicas quando em comparação com enzimas lipolíticas de forma que eles possuem uma marcada preferência da transferência de grupos acil de lipídios a receptores diferentes da água, mesmo na presença de uma significativa quantidade de água. Em uma comparação com enzimas de técnicas anteriores, a lipídio acil transferase usada na invenção foi avaliada como possuindo uma alta atividade transferase relativa na presença de 6 % de água, de 54 % de água, de 73 % de água, de 89 % de água e de aproximadamente 95 % de água. As enzimas lipolíticas testadas não tiveram praticamente nenhuma atividade transferase relativa significativa nessas concentrações de água.

[000207] As atividades da lipase e da acil transferase de uma enzima podem ser avaliadas usando os ensaios seguintes. Deste modo, uma enzima lipídio acil transferase possuindo as características de enzima aqui definidas podem ser obtidas ou identificadas.

Ensaio de Transferase em Substrato Tamponado (ver o Exemplo 12)

[000208] Enzimas que funcionam como enzimas lipídio acil transferases para o uso nas composições e métodos da invenção podem ser rotineiramente identificadas usando o ensaio ensinado no Exemplo 12. Este ensaio será posteriormente mencionado como “Ensaio de Transferase em Substrato Tamponado”. No Exemplo 12 a enzima lipídio acil transferase da *Aeromonas salmonicida* de acordo com a presente invenção foi analisada e comparada com uma variedade de enzimas lipolíticas não englobadas pela presente invenção. Como pode ser visto, das enzimas lipolíticas só LIPOPAN® F (Novozymes, Dinamarca) foi encontrado como possuindo qualquer atividade transferase e somente em um nível muito baixo (1,3 %).

[000209] As enzimas convenientes para o uso nas composições e nos métodos da invenção podem ser rotineiramente identificadas usando o Ensaio

de Transferase em Substrato Tamponado. Usando este ensaio, no qual a um conteúdo de água muito elevado, aproximadamente 95 %, as enzimas lipídio acil transferases de acordo com a presente invenção são aquelas que possuem pelo menos 2 % de atividade acil transferase (atividade transferase relativa), preferivelmente pelo menos atividade transferase relativa de 5 %, preferivelmente pelo menos atividade transferase relativa de 10 %, preferivelmente pelo menos 15 %, 20 %, 25 %, 26 %, 28 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % ou 75 % de atividade transferase relativa. Adequadamente, a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção pode ter menos de 28 %, menos de 30 %, preferivelmente menos de 40 %, menos de 50 %, menos de 60 %, menos de 70 %, menos de 80 %, menos de 90 % ou menos de 100 % de atividade acil transferase.

Ensaio de Transferase em Gema de Ovo com Elevada Quantidade de Água (ver o Exemplo 11)

[000210] Como uma alternativa à (ou em adição) utilização do “Ensaio de Transferase em Substrato Tamponado” (ver acima), uma enzima lipídio acil transferase para uso de acordo com a presente invenção pode ser identificada usando o “Ensaio de Transferase em Gema de Ovo com Elevada Quantidade de Água” ensinado no Exemplo 11.

[000211] Em uma modalidade, a enzima lipídio acil transferase conveniente para o uso nos métodos e/ou composições de acordo com a presente invenção é aquela que quando testada usando o Ensaio de Transferase em Gema de Ovo com Elevada Quantidade de Água em uma gema de ovo com 54 % de água, tem a atividade transferase relativa de até 100 %. De fato, os experimentos realizados em gema de ovo com alta concentração de água, mostraram que na partida do experimento a taxa de transferase inicial foi calculada como sendo 100 % de atividade transferase, isto é, nenhuma atividade hidrolítica foi observada. Ao contrário as enzimas lipolíticas usadas como controle, isto é a LIPOPAN® F e a fosfolipase A2, não mostraram nenhuma atividade transferase detectável na gema de ovo com 54 % de água, ou gema de ovo com conteúdo de água enriquecido (nominalmente

gema de ovo com 73 % de água, ou com 89 % de água). Preferivelmente o aumento no conteúdo de água não reduziu significativamente a atividade acil transferase percentual de uma enzima lipídio acil transferase para o uso nos métodos ou composições de acordo com a presente invenção.

[000212] Em uma modalidade preferível, com referência ao Ensaio de Transferase em Gema de Ovo com Elevada Quantidade de Água, com um conteúdo de água de 54 %, uma enzima lipídio acil transferase para o uso em a presente invenção terá uma porcentagem inicial de atividade acil transferase (atividade transferase relativa inicial), medida depois do consumo de 10 % da molécula doadora (isto é do fosfolipídio), de pelo menos 0,1 % da atividade transferase relativa, preferivelmente de pelo menos 1 % de atividade transferase relativa, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 5 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 10 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 20 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 30 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 40 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 50 %, preferivelmente pelo menos 60 %, preferivelmente pelo menos 70 %, preferivelmente pelo menos 80 %, preferivelmente pelo menos 90 %, preferivelmente pelo menos 95 %, preferivelmente pelo menos 99 %, preferivelmente aproximadamente 100 % de atividade acil transferase.

[000213] Em uma modalidade preferível, com referência ao Ensaio de Transferase em Gema de Ovo com Elevada Quantidade de Água, com um conteúdo de água de 54 %, e medido depois do consumo de 10 % da molécula doadora (isto é do fosfolipídio), a enzima lipídio acil transferase para o uso nas composições e nos métodos da invenção tem atividade transferase detectável, isto é atividade transferase relativa entre 0,1 e 100 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 1 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 5 %, preferível pelo menos uma atividade transferase relativa de 10 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 20 %, preferivelmente pelo menos uma atividade

transferase relativa de 30 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 40 %, preferivelmente pelo menos 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, ou 90 % de uma atividade transferase relativa. Adequadamente, o lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção pode ter, usando o Ensaio de Transferase em Gema de Ovo com Elevada Quantidade de Água com o conteúdo de água de 54 %, medido depois do consumo de 10 % da molécula doadora (isto é do fosfolipídio), uma porcentagem de atividade acil transferase (atividade transferase relativa) de menos que 45 %, 47 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % ou 100 %.

[000214] Em uma modalidade preferível, com referência ao Ensaio de Transferase em Gema de Ovo com Elevada Quantidade de Água, com um conteúdo de água de 73 %, medidos depois do consumo de 10 % da molécula doadora (isto é do fosfolipídio), a enzima lipídio acil transferase para o uso nas composições e nos métodos da invenção tem atividade transferase detectável, isto é atividade transferase relativa entre 0,1 e 100 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 1 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 5 %, preferível pelo menos uma atividade transferase relativa de 10 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 20 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 30 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 40 %, preferivelmente pelo menos 45 %, 50 %, 58 %, 60 %, 70 %, 80 %, ou 90 % de atividade transferase relativa. Adequadamente, a lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção pode ter, quando usando o Ensaio de Transferase em Gema de Ovo com Elevada Quantidade de Água com o conteúdo de água de 73 % e medido depois do consumo de 10 % da molécula doadora (isto é, do fosfolipídio), uma porcentagem de atividade acil transferase (atividade transferase relativa) de menos que 45 %, 47 %, 50 %, 58 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % ou 100 %.

[000215] Em uma modalidade preferível, com referência ao Ensaio de Transferase em Gema de Ovo com Elevada Quantidade de Água, com um conteúdo de água de 89 %, e medido depois do consumo de 10 % da molécula

doadora (isto é do fosfolipídio), a enzima lipídio acil transferase para o uso nas composições e nos métodos da invenção tem atividade transferase detectável, isto é atividade transferase relativa entre 0,1 e 100 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 1 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 5 %, preferível pelo menos uma atividade transferase relativa de 10 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 20 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 30 %, preferivelmente pelo menos uma atividade transferase relativa de 40 %, preferivelmente pelo menos 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % ou 90 % de uma atividade transferase relativa. Adequadamente, o lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção pode ter, usando o Ensaio de Transferase em Gema de Ovo com Elevada Quantidade de Água com um conteúdo de água de 89 % e medido depois do consumo de 10 % da molécula doadora (isto é do fosfolipídio), uma porcentagem de atividade acil transferase (atividade transferase relativa) de menos 45 %, 47 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % ou 100 %.

[000216] Em uma modalidade preferível, com referência ao Ensaio de Transferase em Gema de Ovo com Elevada Quantidade de Água, uma enzima lipídio acil transferase para o uso nas composições e nos métodos da invenção tem a atividade transferase relativa significativa (isto é pelo menos 0,1 % em ambos os conteúdos de água), e tem uma atividade transferase relativa equivalente tanto na gema de ovo com um conteúdo de água de 54 % como na gema de ovo com um conteúdo de água de 73 %, quando medido depois do consumo de 10 % da molécula doadora (isto é do fosfolipídio).

[000217] Em uma modalidade preferível, com referência ao Ensaio de Transferase em Gema de Ovo com Elevada Quantidade de Água, uma enzima lipídio acil transferase, para o uso nas composições e nos métodos da invenção, possui uma atividade transferase relativa significativa (isto é pelo menos 0,1 % em ambos os conteúdos de água), e possui uma atividade transferase relativa equivalente tanto em uma gema de ovo com um conteúdo de água de 54 %, como em uma gema de ovo com um conteúdo de água de 89

%, quando medido depois do consumo de 10 % da molécula doadora (isto é do fosfolipídio).

[000218] Em uma modalidade preferível, com referência ao Ensaio de Transferase em Gema de Ovo com Elevada Quantidade de Água, uma enzima lipídio acil transferase para o uso nas composições e nos métodos da invenção tem a atividade transferase relativa significativa (isto é pelo menos 0,1 % em ambos os conteúdos de água), e tem uma atividade transferase relativa equivalente tanto na gema de ovo com um conteúdo de água de 73 % como na gema de ovo com um conteúdo de água de 89 %, quando medido depois do consumo de 10 % da molécula doadora (isto é do fosfolipídio).

[000219] O termo “atividade transferase relativa equivalente”, tal como mencionado aqui significa que a enzima possui uma atividade transferase relativa (% de atividade acil transferase) que é pelo menos 2 % mais baixa, preferivelmente pelo menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % ou 90 % mais baixa, na gema de ovo com o mais alto conteúdo de água quando comparado com aquela da gema de ovo com o conteúdo de água mais baixo.

Ensaio da Transferase em um Ambiente com Baixa Quantidade de Água

[000220] Como uma alternativa à (ou em adição) utilização do “Ensaio de Transferase em Gema de Ovo com Elevada Quantidade de Água” e/ou do “Ensaio de Transferase em Substrato Tamponado”, a enzima lipídio acil transferases para o uso de acordo com a presente invenção pode ser identificada usando o “Ensaio de Transferase em um Ambiente com Baixa Quantidade de Água”.

[000221] Para determinar se uma enzima é uma enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção, pode-se executar um “Ensaio de Transferase em um Ambiente com Baixa Quantidade de Água”, nominalmente em um ambiente oleoso com concentração de água de 6 %, como ensinado no Exemplo 22. Este exemplo mostra que em um ambiente oleoso com um conteúdo de água de 6 % a enzima lipídio acil transferase da

invenção tem uma alta atividade transferase relativa, onde as enzimas lipolíticas da técnica anterior possuem atividade hidrolítica.

[000222] Em uma modalidade, a enzima lipídio acil transferase conveniente para o uso nos métodos e/ou composições de acordo com a presente invenção é aquela que quando testada usando o “Ensaio de Transferase em um Ambiente com Baixa Quantidade de Água”, e medida dentro de um período de tempo selecionado de 30, 20 ou 120 minutos, possui uma atividade transferase relativa de pelo menos 1 %, preferivelmente pelo menos 2 %, preferivelmente pelo menos 5 %, preferivelmente pelo menos 10 %, preferivelmente pelo menos 20 %, preferivelmente pelo menos 30 %, preferivelmente pelo menos 40 %, preferivelmente pelo menos 50 %, preferivelmente pelo menos 60 %, preferivelmente pelo menos 70 %, preferivelmente pelo menos 75 %. Adequadamente, a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção pode ter menos do que 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, ou 80 % de atividade quando medida dentro de um período de tempo de 10, 20, 30 ou 120 minutos usando o “Ensaio de Transferase em um Ambiente com Baixa Quantidade de Água”.

[000223] Tal como descrito acima, a enzima lipase acil transferase da invenção pode ser identificada usando o “Ensaio de Transferase em Substrato Tamponado” ou o “Ensaio de Transferase em um Ambiente com Baixa Quantidade de Água” utilizando o colesterol como acceptor de acil. Naturalmente, uma pessoa experiente estaria prontamente consciente de que, com os ajustes obviamente necessários, os métodos analíticos “Ensaio de Transferase em Substrato Tamponado”, ou “Ensaio de Transferase em um Ambiente com Baixa Quantidade de Água” podem ser utilizados para determinar a atividade da enzima lipídio acil transferase para qualquer combinação de lipídio doador de acil ou acceptor de acil. Uma pessoa experiente, se necessário, simplesmente substituiria o substrato doador acil (por exemplo, fosfolipídio) por um substrato alternativo doador acil (por exemplo, glicolipídio, triacilglicerídeo) e/ou substituiria o substrato acceptor de acil (por exemplo, colesterol) por um substrato alternativo acceptor de acil (por

exemplo, um carboidrato, uma proteína, outro esterol, um estanol ou glicerol).

[000224] O termo “alta concentração de água” tal como aqui utilizado, significa qualquer substrato ou gênero alimentício com um conteúdo de água maior do que 2 %, preferivelmente maior do que 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % ou 90 %.

[000225] O termo “baixa concentração de água”, tal tal como aqui utilizado, significa qualquer substrato ou gênero alimentício com conteúdo de água menor do que 6 %, preferivelmente menor do que 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % ou 0,5 %.

[000226] Preferivelmente o método e/ou o uso de acordo com a presente invenção podem ser realizados, por exemplo, em gêneros alimentícios a uma temperatura de 15 a 60°C, preferivelmente a uma temperatura de 20 a 60°C, preferivelmente 20 a 50°C, preferivelmente 20 a 45°C, preferivelmente 20 a 40°C. Para alguns aspectos, por exemplo, na massa de farinha, preferivelmente a temperatura do alimento durante a qual a reação acil transferase se realiza está entre 20 e 40°C. Para outros aspectos, por exemplo, quanto a produtos de leite, como queijo, a temperatura do alimento pode estar adequadamente entre 30°C e 60°C. Em ainda outros aspectos, por exemplo, quanto à maionese, a temperatura do alimento pode estar adequadamente entre 20 e 40°C, mais preferivelmente entre 25 e 30°C.

[000227] Preferivelmente, o emulsificante produzido de acordo com a presente invenção compreende menos de 5 % em peso do gênero alimentício.

[000228] Preferivelmente, o emulsificante produzido de acordo com a presente invenção compreende de 0,01 a 4 % em peso do gênero alimentício.

[000229] Preferivelmente, o emulsificante produzido de acordo com a presente invenção compreende de 0,01 a 2 % em peso do gênero alimentício.

[000230] Preferivelmente, o emulsificante produzido de acordo com a presente invenção compreende de 0,01 a 1 % em peso do gênero alimentício.

[000231] Preferivelmente, o emulsificante produzido de acordo com a presente invenção compreende de 0,01 a 0,5 % em peso do gênero alimentício.

[000232] Preferivelmente, o emulsificante produzido de acordo com a presente invenção compreende de 0,01 a 0,3 % em peso do gênero alimentício.

[000233] Adequadamente, o método de acordo com a presente invenção inclui inativação ou desnaturação da enzima para fornecer um gênero alimentício que compreendem a enzima em uma forma inativa ou desnaturada. Adequadamente a enzima pode ser desnaturada por cozimento ou por pasteurização.

[000234] A presente invenção pode englobar, além disso, o uso de uma enzima lipídio acil transferase tal como aqui definido em composições enzimáticas alimentícias e/ou enzimáticas alimentícias animais, e pode englobar as composições enzimáticas alimentícias e/ou alimentícia animal que compreendem uma enzima lipídio acil transferase tal como aqui definido. Tais composições podem conter uma ou várias enzimas adicionais, tal como aquelas aqui listadas. Alternativamente, a composição de enzima da invenção pode ser usada em combinação com outros ingredientes/aditivos alimentícios, como aqueles aqui listados, inclusive outras composições de enzima. Pela formulação da enzima lipídio acil transferase da invenção dentro de uma composição alimentícia e/ou alimentícia animal, a enzima pode ser estabilizada para permitir um armazenamento prolongado (em condições convenientes) antes do seu uso na produção de alimentos e/ou na alimentação animal. Além disso, a composição de enzima da presente invenção fornece a enzima em uma forma conveniente para uso seguro de aplicações “*in situ*” na preparação de gêneros alimentícios e/ou ração animal, ou ingredientes para uso na preparação de alimentos e/ou na alimentação animal. Tais composições podem estar tanto na forma líquida, na forma semi-líquida, ou na forma sólida ou na forma granular.

[000235] Em uma modalidade, a composição enzimática alimentícia pode conveniente ser uma massa de farinha que melhora composição. A massa de farinha que melhora a composição pode compreender outros componentes benéficos tais como um emulsificante e/ou outras enzimas tal

como listado aqui.

[000236] As enzimas alimentícias são vendidas como concentrados líquidos estabilizados ou como sólidos particulados. A formulação na composição de enzima alimentícia minimiza as perdas da atividade enzimática durante o transporte, o armazenamento, e o uso. As enzimas muitas vezes são expostas a ambientes úmidos, quentes, ou oxidantes durante o processamento de bebidas e alimentos. As formulações melhoram a estabilidade pela oposição às forças primárias da desativação: desnaturação, desativação catalítica de sítio, e ação proteolítica. A desnaturação ocorre pelo desdobramento físico de uma estrutura terciária da proteína da enzima sob condições de tensão térmica ou química. Uma vez que uma enzima começa a se abrir ela se torna extremamente mais vulnerável à desativação e à ação proteolítica. Para minimizar o desdobramento, o responsável pela formulação pode alterar o ambiente da proteína para induzir uma estrutura de proteína compacta; isto é feito o mais efetivamente pela “exclusão preferencial” da água da superfície de proteína pela adição de compostos que se associam com a água como, por exemplo, o açúcar, álcoois poliidricos, e sais liotrópicos. Os melhores modos de combater a desativação de sítios ativos são assegurar níveis suficientes de alguns cofatores necessários, acrescentar inibidores reversíveis e excluir as espécies oxidantes ou reativas da formulação.

[000237] Além da estabilidade enzimática, uma formulação deve estar de acordo com diversas necessidades chave secundárias, inclusive a preservação contra a contaminação microbial, e evitar a precipitação física ou formação de névoa, minimizar a formação de pós ou de aerossóis sensibilizantes, e a otimização de critérios estéticos como cor e odor. Muitos desses problemas são mais bem resolvidos quando se coloca o foco de ação no ponto mais inicial possível, inclusive na escolha de matérias-primas para a fermentação ou no processo de recuperação de enzima. As operações posteriores tais como diafiltração, adsorção, cromatografia, cristalização, e extração podem ser usadas para retirar a impureza responsável pela cor, odor, e precipitação. O risco da precipitação física é minimizado fazendo-se a

formulação mais próxima possível do ponto isoelétrico da enzima com solventes hidrofílicos tais como glicerol ou propileno glicol. Pode-se também efetivamente adicionar níveis moderados de sais de solvatação para evitar ou o “salting-out” ou o “salting-in” reverso. Para evitar a contaminação microbiana, pode-se utilizar uma combinação de filtração, acidification, e a minimização da água livre; a utilização de biocidas pode ser eficaz, mas a quantidade de produtos químicos aceitáveis para controlar ou matar micróbios está cada vez mais restrita pelas regulamentações de saúde e segurança.

[000238] Os dois processos existentes até agora de produção de grânulos com maior resistência ao atrito são a granulação por elevado cisalhamento e o revestimento por spray em leito fluidizado, veja, por exemplo, T. Becker: “*Separation and Purification Processes for Recovery of Industrial Enzymes*” em R. K. Singh, S. S. H. Rizvi (eds.): *Bioseparation Processes in Foods*, Marcel Dekker, Nova York, pp. 427 - 445. Esses processos usam várias camadas, revestimentos e morfologias de partícula para produzir partículas não-friáveis que protejam ainda mais as enzimas durante o armazenamento, mas que levem em conta sua liberação imediata em solução durante o uso.

[000239] As composições enzimáticas alimentícias que contenham a lipídio acil transferase da invenção podem ser feitas usando técnicas de formulação padrão, como secagem por borrfio ou formulação líquida.

[000240] A enzima lipídio acil transferase da invenção pode ser expressa em qualquer hospedeiro de expressão conveniente. Por exemplo, a enzima lipídio acil transferase da invenção pode ser expressa no *Bacillus subtilis* e purificada por ultrafiltração e/ou por precipitação em etanol e/ou centrifugação, e pode ser posteriormente seca por borrfio usando amido (maltodextrina) como carreador da enzima. A enzima seca por borrfio pode ser padronizada com relação a atividade específica PLU pela adição de carreadores adicionais na forma de pó. As técnicas implicadas são bem estabelecidas e rotineiras do conhecimento técnico.

[000241] Alternativamente, a enzima lipídio acil transferase para o uso de acordo com a presente invenção, por exemplo, a lipídio acil transferase

heterologamente produzida da invenção, uma vez purificada, pode ser estabilizada em uma formulação líquida conveniente, como aquelas a base de glicerol. Outros métodos para se produzirem formulações estabilizadas de enzima são descritos nas EP 0770037 e EP 0702712.

[000242] A enzima acil transferase na forma de pó também pode ser usada em combinação com outras enzimas tal como aqui listado, para a produção de composições enzimáticas com atividades definidas de acordo com a especificação de produto.

[000243] Tipicamente a dosagem da formulação de enzima alimentícia está entre 10 g e 1000 g por 1000 kg de gêneros alimentícios, preferivelmente de 50 g a 200 g por 1000 kg de gêneros alimentícios, preferivelmente, 75 g a 125 g por 1000 kg de gêneros alimentícios.

[000244] Preferivelmente a enzima de acordo com a presente invenção está presente no gênero alimentício em uma forma inativa ou em uma forma desnaturada.

[000245] Em uma modalidade, a enzima de acordo com a presente invenção não está preferivelmente imobilizada, em particular não está imobilizada em um suporte sólido.

[000246] Em uma modalidade alternativa, a enzima pode ser imobilizada.

[000247] A enzima lipídio acil transferase imobilizada pode ser preparada pelo uso das técnicas de imobilização conhecidas pelo conhecimento técnico. Existem diversos métodos para a preparação de enzimas imobilizadas, que serão evidentes a uma pessoa experiente na técnica (por exemplo, as técnicas mencionadas na EP 0746608; ou Balcao VM, Paiva AL, Malcata FX., *Enzyme Microb Technol.*, 1 de maio de 1996; 18(6): 392 - 416; ou Reetz MT, Jaeger KE. *Chem Phys Lipídios*. Junho de 1998; 93(1 a 2): 3 - 14; ou Bornscheuer UT, Bessler C, Srinivas R, Krishna SH. *Trends Biotechnol.* Outubro de 2002; 20(10): 433 – 7 (cada um dos quais é incorporado aqui por referência).

[000248] Em uma modalidade, o gênero alimentício da invenção pode

conter ingredientes alimentícios, que tenham sido preparados usando uma enzima imobilizada lipídio acil transferase, mas não contenha a enzima lipídio acil transferase no material alimentício ou gêneros alimentícios. Por exemplo, o gênero alimentício pode conter um ou mais dos seguintes: um emulsificante, mais de um emulsificante, um ou mais agentes aromatizantes, um ou mais melhoradores da suavidade e/ou um ou mais ésteres de Arafat esterol, como ésteres de fitoesterol ou ésteres de fitoestanol.

[000249] A enzima de acordo com a presente invenção pode ser usada com um ou mais emulsificantes convencionais, incluindo, por exemplo, monoglicerídeos, ésteres do ácido diacetil tartárico de mono- e diglicerídeos de ácidos graxos, e lecitinas, por exemplo, obtidas da soja.

[000250] A enzima de acordo com a presente invenção pode ser usada com uma ou várias outras enzimas convenientes de grau alimentícios. Assim, está dentro dos escopos da presente invenção que, além da enzima da invenção, pelo menos uma enzima adicional pode ser acrescentada ao gênero alimentício. Tais enzimas adicionais incluem as enzimas degradadoras do amido tais como as endo- ou exoamilases, as pululanases, as enzimas desramificadoras, as hemicellulases incluindo as xilanases, celulasas, lipases, fosfolipases, e proteases.

[000251] A enzima de acordo com a presente invenção pode ser usada com uma ou várias outras enzimas convenientes de grau alimentícios. Assim, está dentro do escopo da presente invenção que, além da enzima da invenção, pelo menos uma outra enzima é acrescentada ao gênero alimentício. Tais enzimas adicionais incluem as enzimas degradadoras do amido tais como as endo- ou exoamilases, as pululanases, as enzimas desramificadoras, as hemicellulases incluindo as xilanases, celulasas, oxidoreductases, por exemplo, glicose oxidase, piranose oxidase, sulfidril oxidase ou carboidrato oxidase, como aquelas que oxidam a maltose, por exemplo, a hexose oxidase (HOX), as lipases, as fosfolipases e hexose oxidases, e proteases.

[000252] Em uma modalidade preferencial a enzima lipídio acil transferase é usada na combinação com uma lipase que tem uma ou várias

das seguintes atividades lipase: atividade de glicolipase (E.C. 3.1.1.26), atividade de triacilglicerol lipase (E.C. 3.1.1.3), atividade de fosfolipase A2 (E.C. 3.1.1.4) ou atividade de fosfolipase A1 (E.C. 3.1.1.32). Adequadamente, enzimas lipases são bem conhecidas dentro da técnica e incluem como forma de exemplo as seguintes lipases: LIPOPAN® F e/ou LECITASE® ULTRA (Novozymes A/S, Dinamarca), fosfolipase A2 (por exemplo, fosfolipase A2 da LIPOMOD® 22L da Biocatalysts, LIPOMAX® da Genecor), LIPOLASE® (Novozymes A/S, Dinamarca), as lipases ensinadas nas WO 03/97835, EP 0977869 ou EP 1193314. Esta combinação de uma enzima lipídio acil transferase, tal como aqui definido, com uma lipase pode ser particularmente preferida para uso em massa de farinha ou produtos cozidos no forno ou em produtos alimentícios finos como bolos e produtos confeitados.

[000253] O uso de lipases na combinação com a enzima da invenção pode ser particularmente vantajoso em exemplos onde talvez seja desejável algum acúmulo de ácidos graxos livres, por exemplo, no queijo onde os ácidos graxos livres podem comunicar um sabor desejável, ou na preparação de alimentos finos. Uma pessoa experiente na técnica será capaz de combinar proporções de enzimas lipolíticas, por exemplo, LIPOPAN® F e/ou LECITASE® ULTRA (Novozymes A/S, Dinamarca), fosfolipase A2 (por exemplo, fosfolipase A2 da LIPOMOD® 22L da Biocatalysts, LIPOMAX® da Genecor), LIPOLASE® (Novozymes A/S, Dinamarca), as lipases ensinadas nas WO 03/97835, EP 0977869 ou EP 1193314 e da enzima lipídio acil transferase da presente invenção para fornecer a proporção desejada de hidrólise à atividade transferase que resulta em um efeito técnico preferencial ou na combinação de efeitos técnicos no gênero alimentício (como aqueles aqui listados sob o título de “Efeitos Técnicos”).

[000254] Tradicionalmente a indústria de bolo utiliza melhoradores de massa de bolo para a produção de bolos e assegurar bolos de alta qualidade em termos de gosto, estrutura, sabor e aparência. Esses melhoradores de massa de bolo estão normalmente baseados no borribo de emulsificantes secos sobre um carreador como o amido e malto dextrina. Alguns melhoradores de

massa de bolo estão também na forma de gel à base de emulsificantes, açúcar e água. Esses melhoradores de massa de bolo são muito importantes para a indústria de bolo para a produção de bolos de alta qualidade. Os melhoradores de massa de bolo, contudo contém emulsificantes e outros ingredientes “não naturais” com um número “E”. Por causa da exigência dos consumidores para a redução da quantidade de números “E”, a indústria de bolos tem solicitado métodos alternativos para a produção de bolos de alta qualidade sem a utilização de emulsificantes.

[000255] Um modo alternativo de produzir bolo é usar uma enzima, isto é uma enzima lipídio acil transferase, tal como aqui definido, ou uma composição de enzimas de acordo com a presente invenção.

[000256] A enzima lipídio acil transferase tal como aqui definido e/ou a composição de enzima alimentícia da presente invenção, podem ser utilizadas nas preparações de um alimento fino, como um bolo. Em tais exemplos, os seguintes constituintes podem ser formados no alimento fino:

i) ésteres de açúcar e lisolecitina (a partir do carboidrato da receita de bolo e da lecitina no ovo que também são parte da receita de bolo) e/ou;

ii) peptídios acilados e lisolecitina (pela transferência de um ácido graxo da lecitina para uma proteína ou peptídio durante a formação dos condensados de ácidos graxos e proteína, que são conhecidos por serem emulsificantes altamente eficientes (*Herstellung und Anwendungsmöglichkeiten von Eiweiss-Fettsaurekondensaten*. Andreas Sander, Eberhard Eilers, Andrea Heilemann, Edith von Kreis. *Fett/lipid* 99 (1997) Nr.4, 115 - 120).

[000257] É considerado que na produção de alguns alimentos finos, particularmente alimentos de finos com alto teor de gordura, como bolos, pode ser desejável ter algum acúmulo de ácidos graxos. Por isso, a combinação do uso de enzimas lipolíticas e da enzima lipídio acil transferase tal como aqui definido pode ser particularmente benéfica para a produção de alimentos finos com alto teor de gordura. Alternativamente, ácidos graxos livres adicionais ou sabões ácidos graxos (E470a) podem ser selecionados e utilizados em combinação com a enzima lipídio acil transferase.

[000258] O gênero alimentício de acordo com a presente invenção pode compreender adequadamente um ou mais dos seguintes aditivos: material de proteína de soja; carotenóides, flavonóides, antioxidantes e produtos fitoquímicos (especialmente os antocianonida, carotenóide, bioflavonóide, glutathione, catequina, isoflavona, licopeno, ginsenosídeo, picnogenol, alcalóides, piceum fitoesterol, sulforafona, resveretol, extrato de semente de uva ou um elemento contendo ésteres de estanol), vitaminas (especialmente vitamina C, vitamina A, vitamina B3, vitamina D, vitamina E, tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, cianocobalamina, ácido fólico, biotina, ácido pantotênico ou vitamina K), minerais (especialmente cálcio, iodo, magnésio, zinco, ferro, selênio, manganês, cromo, cobre, cobalto, molibdênio ou fósforo), ácidos graxos (especialmente ácido gama linoleico, ácido ucospentaenóico ou ácido decosaheptaenóico), óleos (especialmente o óleo de borage, óleo de canola com alto teor de carotenóides, óleo da semente do linho), aminoácidos (especialmente triptofano, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, valina, leucina, isoleucina, alanina, arginina, ácido aspártico, cistina, cisteína, ácido glutâmico, glutamina, glicina, histidina, prolina, hidroxiprolina, serina, taurina ou tirosina), enzimas (especialmente bromelaina, papaína, amilase, celulase ou coenzima Q), lignina, éster de estanol ou bactérias saprófitas (especialmente *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus plantarum* ou *Streptococcus faecium*), ácido fólico, e fibra solúvel.

EFEITO TÉCNICO

[000259] Surpreendentemente a enzima lipídio acil transferase tem uma atividade acil transferase significativa em gêneros alimentícios. Esta atividade tem aplicações benéficas surpreendentes em métodos para preparo de gêneros alimentícios.

[000260] A presente invenção está embasada na descoberta surpreendente de que a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção pode realizar a esterificação do carboidrato via alcoólise, isto é transferência do acil de um lipídio, em um gênero alimentício com

concentração significativa de água. A técnica anterior sugere que tais enzimas, se pudessem funcionar desse modo, só funcionariam em um meio com solvente (isto é, em ambientes com baixo ou nenhum teor de água).

[000261] A presente invenção pode fornecer um ou mais dos seguintes efeitos técnicos inesperados em produtos à base de ovos, em particular na maionese: uma melhor estabilidade ao calor durante a pasteurização; melhoria das propriedades organolépticas, melhoria da consistência.

[000262] A presente invenção pode fornecer um ou mais dos seguintes efeitos técnicos inesperados em massa de farinha e/ou produtos assados: um volume específico melhorado tanto da massa de farinha como dos produtos cozidos no forno (por exemplo, de pão e/ou de bolo); uma estabilidade melhorada da massa de farinha; uma avaliação melhorada da crosta do pão (por exemplo, crostas de pão mais finas e/ou mais crocantes no), uma avaliação melhorada do miolo do pão (por exemplo, de distribuição mais homogênea e/ou estrutura mais fina e/ou mais suavidade do miolo de pão); uma aparência melhorada (por exemplo, uma superfície lisa sem bolhas ou buracos ou substancialmente sem bolhas ou buracos); um envelhecimento reduzido; uma maciez melhorada; um odor melhorado; um gosto melhorado.

[000263] A presente invenção pode fornecer um efeito benéfico na formação de materiais superficiais altamente ativos em um gênero alimentício sem uma formação substancial de uma quantidade de ácidos graxos livres, o que reduz a capacidade do gênero alimentício de se oxidarem quando armazenados, já que os ácidos graxos livres são mais propensos à oxidação do que os ésteres dos ácidos graxos correspondentes.

[000264] Adequadamente, a presente invenção pode fornecer um ou mais dos seguintes efeitos técnicos inesperados em um gênero alimentício: uma aparência melhorada, um sabor melhorado, uma estabilidade melhorada, em particular uma estabilidade térmica melhorada, um gosto melhorado, uma maciez melhorada, uma elasticidade melhorada, uma emulsificação melhorada.

[000265] Adequadamente, a presente invenção pode fornecer um ou mais dos seguintes efeitos técnicos inesperados em produtos de leite, como

por exemplo, sorvete: um sabor melhorado (preferivelmente um sabor mais cremoso); um gosto melhorado; um derretimento melhorado.

[000266] Adequadamente, a presente invenção pode fornecer um ou mais dos seguintes efeitos técnicos inesperados no ovo ou em produtos à base de ovos: estabilidade melhorada de emulsão; estabilidade térmica da emulsão; sabor melhorado; mal-odor reduzido; propriedades espessantes melhoradas, consistência melhorada.

[000267] Os efeitos técnicos específicos associados com o uso de de uma enzima lipídio acil transferase, tal como aqui definido, na preparação de um gênero alimentício estão listados na Tabela em baixo:

	Alimento	Efeito
1	Pão, Bolos Doces e Rosquinhas de Massa Frita	Fortalece a massa de farinha e aumenta a resistência de mecânica e aumenta a capacidade de absorção de água. Aumenta o volume de produtos de padaria e mantém a maciez do miolo de pão
2	Massa de farinha congelada	Evita estragar durante a refrigeração
3	Bolo fofo	Fornece um bom volume de bolo e uma textura suave e uniforme
4	Bolacha, biscoito água-e-sal e bolinhos	Faz emulsões de gordura estáveis e evita o emperramento da máquina de biscoitos. Evita a formação de produtos com alto teor de gordura
5	Massas batidas e cremosas	Melhora textura dos produtos fritos
6	Macarrão	Evita que a massa de farinha se grude na máquina. Aumenta a quantidade de água e diminui a perda por cozimento
7	Macarrão instantâneo	Evita que os macarrões se grudem uns aos outros

8	Massas	O condicionador da massa de farinha e evita que se grudem durante o cozimento
9	Creme de manjar	Faz uma massa de amido com uma textura mais suave e cremosa e evita a desidratação
10	Branqueador de café	Evita a separação de óleo e água
11	Creme batido	Melhora a estabilidade da emulsão
12	Chocolate	Evita ou reduz o esfarelamento
13	Caramelos doces e balas	Melhora a emulsificação do açúcar derretido com o óleo. Evita a separação do óleo
14	Carne processada e salsicha/linguiça	Melhora a capacidade de retenção de água da salsicha/linguiça e do presunto prensado, e evita a separação da fase oleosa das pastas e patês

[000268] Adequadamente, a presente invenção pode fornecer um ou mais dos seguintes efeitos técnicos inesperados no queijo: uma redução do efeito de liberação de óleo nos queijos; um aumento no rendimento do queijo; uma melhora no sabor; uma redução do mal-odor; uma redução no gosto de “sabão”.

[000269] Na produção de alimentos, em particular na produção de queijo, o uso da enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção fornece uma vantagem significativa na capacidade de recuperar a proteína solúvel de produtos de leite. Por exemplo, na produção de queijo quase 20 % de toda a proteína de leite são removidos no soro de leite (isto é, na parte aquosa do leite que permanece depois da formação de coalhos). O soro do leite compreende as proteínas solúveis do leite, enquanto as proteínas hidrofóbicas são mantidas no coalho. Pelo uso da enzima lipídio acil transferase, de acordo com a presente invenção, é possível transferir um grupo acil de um lipídio (preferivelmente de um glicolipídio ou um fosfolipídio), para uma proteína (especialmente para uma proteína do soro do leite, como a lactoglobulina) para formar um condensado entre o ácido graxo e a proteína.

Produzindo assim um produto que é mais hidrofóbico e que ficará no coalho antes que ser carregado pelo soro do leite. Deste modo, uma maior quantidade da proteína de leite poderá ser mantida do material alimentício final, isto é, no produto final a base de leite como o queijo.

[000270] Em um aspecto, a presente invenção está baseada, em parte, na compreensão de que os rendimentos dos alimentos podem ser melhorados, como por exemplo, no queijo, pelo uso de uma enzima lipídio acil transferase. Além disso, ou alternativamente, podem ser melhorados o sabor, a textura, a estabilidade contra a oxidação e o tempo de validade para armazenamento. Além disso, ou alternativamente, o alimento pode ter reduzido seu nível de colesterol ou realçados os conteúdos de ésteres de fitoesterol/estanol.

[000271] Sem desejar ficar preso a qualquer teoria em particular, considera-se que um aumento no rendimento pode ser o resultado da transesterificação da proteína do soro do leite e peptídios, resultando em aumento significativo na hidrofobicidade da proteína do soro do leite e a precipitação da proteína acilada do soro do leite no coalho de queijo.

[000272] Em sistemas biológicos, por exemplo, a deposição de proteínas e de enzimas ligadas à membrana, são realizadas por dois mecanismos diferentes. As proteínas ligadas à membrana ou possuem algumas partes espalhadas da membrana ou possuem domínios hidrofóbicos, ou elas possuem alternativamente um ácido graxo ligado à cadeia de polipeptídio. Os ácidos graxos possuem normalmente um comprimento de cadeia de 14 ou 16 átomos de carbono. Os ácidos graxos estão covalentemente ligados à cadeia de polipeptídio em três posições diferentes, no N -terminal do aminoácido na forma de uma ligação amida, no resíduo de cisteína na forma de uma ligação tioéster, ou na serina ou treonina dos aminoácidos, na forma de uma ligação éster. É necessário somente um ácido graxo por molécula de polipeptídio para incorporar a proteína na membrana de célula.

[000273] Quando um ácido graxo está covalentemente ligado a uma proteína que não seja de membrana, as propriedades físicas e funcionais vão

se modificar drasticamente. A WO97/14713 descreve as proteínas da soja e do glúten transformadas em derivados acil pelo tratamento com uma lipase do *Mucor miehei* (Lipozyme®, Novozymes), e um ácido graxo no solvente orgânico. A lipídio acil transferase pode ser usada, de acordo com a presente invenção, para a produção das proteínas aciladas em um ambiente de alta ou baixa concentração de água.

[000274] Observamos que a proteína acilada forma complexos anfifílicos que podem ser utilizados por diversos produtos cosméticos. A proteína acilada pode formar géis, se ligar à água conservando a umidade, ter propriedades emulsificantes e ser muito ativa na interface entre água e lipídio.

[000275] Assim, a presente invenção pode em um aspecto fornecer uma composição cosmética que compreende uma enzima lipídio acil transferase tal como aqui definido.

[000276] Além disso, a presente invenção pode fornecer o uso de uma enzima acil transferase tal como aqui definido para produzir uma composição cosmética.

[000277] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece um método de produção *in situ* de um éster de proteína em uma composição cosmética, em que o método compreende a etapa de adição à composição cosmética (ou componentes da mesma) de uma enzima lipídio acil transferase tal como aqui definido.

[000278] Muitas proteínas alimentícias são solúveis em soluções aquosas e, por isso, são convenientes para modificação *in situ* pela enzima lipase acil transferase. Na produção de queijo, a beta-lactoglobulina é perdida para a fração do soro do leite. Depois da acilação com uma enzima lipase acil transferase, ou uma variante lipase acil transferase, os resultados iniciais indicam que a β -lactoglobulina pode, contudo, ter sido depositada no micélio superficial de caseína durante a aglomeração do coalho. A β -lactoglobulina possui três sítios potenciais de acilação (resíduos de serina) em três laços superficiais. O leite contém quantidades suficientes de lecitina, um substrato conveniente para uma enzima lipídio acil transferase acilar a β -lactoglobulina. A

lisolecitina formada pode ter um efeito emulsificante adicional.

[000279] As melhorias observadas com a enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção são comparadas com quando são usadas as enzimas lipolíticas sem atividade acil transferase, tais como as triacilglicerol lipases e fosfolipases.

VANTAGENS

[000280] A geração de um emulsificante e um éster de estero/estanol *in situ* de pelo menos um constituinte do material alimentício, significa que o material alimentício conterá, no mínimo, um aditivo a menos. Isto é vantajoso por causa da melhoria na produção. Por exemplo, não é necessário nenhum processamento adicional, não é necessária a adição de ingredientes ou adição de emulsificantes. Além disso, o gênero alimentício podem conter menos “aditivos”. A redução ou a eliminação de “aditivos” é desejável para os consumidores e a inclusão de aditivos frequentemente deve ser declarada ao consumidor na listagem de ingredientes que se colocam no gênero alimentício. Assim, a presente invenção é adicionalmente vantajosa.

[000281] Uma vantagem da presente invenção pode ser a produção *in situ* de um emulsificante em um gênero alimentício sem um aumento prejudicial no conteúdo ácido graxo livre do gênero alimentício.

[000282] A geração de dois emulsificantes e/ou um éster de carboidrato *in situ* de pelo menos um constituinte do material alimentício, significa que o material alimentício conterá no mínimo menos um material aditivo.

[000283] Além disso, quando a enzima lipídio acil transferase atua em um glicolipídio é possível produzir vantajosamente o emulsificante DGMG *in situ* sem um aumento prejudicial no conteúdo ácido graxo livre do gênero alimentício. Reduzindo assim, os efeitos prejudiciais atribuídos a um aumento em ácidos graxos livres, inclusive, mas não limitando a, uma redução do gosto rançoso no queijo, a prevenção da sobredosagem em massa de farinha e nas propriedades da massa de farinha assada.

[000284] Para alguns aspectos, uma vantagem da presente invenção é a redução de níveis de colesterol livre no gênero alimentício.

[000285] Para outro aspecto, uma vantagem da presente invenção é o aumento em ésteres de estanol e/ou esterol no gênero alimentício. Alguns ésteres de esterol/estanol podem ser aromatizantes e/ou suavizantes eficazes. Assim, a presente invenção pode não só resultar na produção *in situ* de um emulsificante em um gênero alimentício, mas também na produção *in situ* de um aromatizante e/ou um suavizante. Sabe-se que alguns ésteres de esterol/estanol reduzem o colesterol do soro de sangue e/ou as lipoproteínas de baixa densidade, quando consumido em um gênero alimentício. Assim, a presente invenção pode ser usada para preparar um gênero alimentício com níveis aumentados de ésteres de esterol e/ou ésteres de estanol.

[000286] Para alguns aspectos, em particular quando a enzima de acordo com a presente invenção é usada em produtos a base de ovos, uma vantagem é a retirada dos carboidratos livres não desejados.

[000287] Também vantajosamente são melhoradas as propriedades de emulsificação do gênero alimentício, levando a melhorias na aparência e/ou nas propriedades de tratando e/ou na estrutura e/ou na consistência e/ou na estabilidade ao calor sem produzir um impacto negativo no gosto.

[000288] Além disso, para algumas modalidades, o efeito de “sobredosar” observado quando se estava usando somente lipase, é vantajosamente efetivamente superado pela adição de uma enzima de acordo com a presente invenção. Isto é devido pelo menos em parte ao fato que os ácidos graxos livres não são produzidos ou só produzidos em um grau insignificante usando a enzima de acordo com a presente invenção.

ISOLADO

[000289] Em um aspecto, preferivelmente o polipeptídio ou a proteína para uso na presente invenção estão em uma forma isolada. O termo “isolado” significa que a seqüência está pelo menos substancialmente livre de pelo menos um outro componente com o qual a seqüência se associa naturalmente na natureza e como encontrado na natureza.

PURIFICADO

[000290] Em um aspecto, preferivelmente o polipeptídio ou a proteína

para o uso na presente invenção está em uma forma purificada. O termo “purificado” significa que a sequência está em um estado relativamente puro, por exemplo, pelo menos aproximadamente 51 % pura, ou pelo menos aproximadamente 75 %, ou pelo menos aproximadamente 80 %, ou pelo menos aproximadamente 90 % pura, ou pelo menos aproximadamente 95 % pura ou pelo menos aproximadamente 98 % pura.

CLONAGEM DE UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDIOS QUE CODIFICA UM POLIPEPTÍDIO DE ACORDO COM A PRESENTE INVENÇÃO

[000291] Uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que tem as propriedades específicas tal como aqui definido ou um polipeptídeo que é conveniente para a modificação pode ser isolada de qualquer célula ou organismo que produza o dito polipeptídeo. Vários métodos são bem conhecidos dentro da técnica de isolamento de sequências de nucleotídeos.

[000292] Por exemplo, um DNA genômico e/ou a biblioteca cDNA podem ser construídos usando o DNA cromossômico ou o RNA mensageiro do organismo que produz o polipeptídeo.

[000293] Se a sequência de aminoácidos do polipeptídeo for conhecida, podem ser sintetizadas sondas de oligonucleotídeos marcados que são utilizadas para identificar os clones que codificam o polipeptídeo da biblioteca genômica preparada a partir do organismo. Alternativamente, poderia ser usada uma sonda de oligonucleotídeo marcado, contendo sequências homólogas a um outro gene de polipeptídeo conhecido, para identificar clones que codificam o polipeptídeo. Nesse último caso, são utilizadas condições de hibridização e de lavagem de mais baixa estringência.

[000294] Alternativamente, os clones que codificam o polipeptídeo podem ser identificados pela inserção de fragmentos do DNA genômico em um vetor de expressão, como um plasmídeo, bactéria de transformação enzimática negativa, com a produção da biblioteca do DNA, e posterior transferência para placas de ágar que contém uma enzima inibida pelo polipeptídeo, permitindo assim que os clones expressem o polipeptídeo a ser identificado.

[000295] Em uma alternativa ainda adicional, a sequência de

nucleotídios que codifica o polipeptídio pode ser preparada sinteticamente por métodos padrão estabelecidos, por exemplo, o método da fosforoamidita descrito por Beucage S. L. *et al.*, (1981) *Tetrahedron Letters* 22, p 1859 - 1869, ou o método descrito por Matthes *et al.*, (1984) *EMBO J.* 3, p 801 - 805. No método da fosforoamidita, os oligonucleotídios são sintetizados, por exemplo, em um sintetizador automático de DNA, purificados, anelados, ligados e clonados em vetores apropriados.

[000296] A sequência de nucleotídios pode ser de material misto de origem genômica e sintética, misto de origem sintética e cDNA, ou misto de origem genômica e cDNA, preparada a partir da ligação de fragmentos de origem sintética, genômica ou cDNA (como apropriado) de acordo com as técnicas padrão. Cada fragmento ligado corresponde a várias partes da sequência inteira de nucleotídios. A sequência de DNA também pode ser preparada pela reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando “primers” específicos, por exemplo, tal como descrito na patente US 4.683.202 ou em Saiki R K e al., (*Science* (1988) 239, páginas 487 - 491).

SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDIOS

[000297] A presente invenção também engloba seqüências de nucleotídios que codificam polipeptídios possuindo as propriedades específicas tal como aqui definido. O termo “sequência de nucleotídio” tal como aqui utilizado, se refere a uma seqüência de oligonucleotídios ou a uma seqüência de polinucleotídios, e variantes, homólogos, fragmentos e derivados dos mesmos (tais como porções dos mesmos). A sequência de nucleotídios pode ser de origem genômica ou sintética ou recombinante, e pode ser de dupla fita ou fita simples se estiver representando a fita senso ou antisenso.

[000298] O termo “sequência de nucleotídio” em relação a presente invenção, inclui o DNA genômico, o cDNA, o DNA sintético, e o RNA. Preferivelmente o termo significa o DNA, mais preferivelmente cDNA para a seqüência de codificação.

[000299] Em uma modalidade preferencial, a sequência de nucleotídios que codifica por si um polipeptídio possuindo as propriedades específicas, tal

como aqui definido, não cobre a sequência nativa de nucleotídeos no seu ambiente natural quando é ligado às suas seqüências naturalmente associadas, ou seja, que também no seu ambiente natural. Para facilidade de referência, chamaremos esta modalidade preferencial de “sequência de nucleotídeos não-nativa”. Neste sentido, o termo “sequência nativa de nucleotídeos” significa uma sequência de nucleotídeos inteira que está no seu ambiente nativo e quando está operativamente ligada a um promotor inteiro com o qual ela está naturalmente associada, o dito promotor estando também no seu ambiente nativo. Assim, o polipeptídeo da presente invenção pode ser expresso por uma sequência de nucleotídeos no seu organismo nativo, mas no qual a sequência de nucleotídeos não esteja sob controle do promotor com o qual ela naturalmente se associa dentro daquele organismo.

[000300] Preferivelmente o polipeptídeo não é um polipeptídeo nativo. Neste sentido, o termo “polipeptídeo nativo” significa um polipeptídeo inteiro que está no seu ambiente nativo e quando tenha sido expressado pela sua sequência de nucleotídeos nativa.

[000301] Tipicamente, a sequência de nucleotídeos que codifica os polipeptídeos possuindo as propriedades específicas, tal como aqui definido, é preparada usando técnicas de DNA recombinante (isto é DNA recombinante). Entretanto, em uma modalidade alternativa da invenção, a sequência de nucleotídeos poderia ser sintetizada, no total ou em parte, usando métodos químicos bem conhecidos na técnica (ver Caruthers MH *et al.*, (1980) *Acids Nuc Res Symp Ser* 215-23 e Chifre T *et al.*, (1980) *Acids Nuc Res Symp Ser* 225-232).

EVOLUÇÃO MOLECULAR

[000302] Uma vez que foi isolada uma sequência de nucleotídeos codificando a enzima, ou foi identificada uma sequência putativa de nucleotídeos codificando a enzima, pode ser desejável modificar a sequência de nucleotídeos selecionada, por exemplo, pode ser desejável mutar a sequência para preparar uma enzima de acordo com a presente invenção.

[000303] As mutações podem ser introduzidas usando oligonucleotídeos

sintéticos. Esses oligonucleotídios contêm seqüências de nucleotídio que flanqueiam os sítios de mutação desejados.

[000304] Um método conveniente é divulgado em Morinaga *et al.*, (*Biotechnology* (1984) 2, p 646 - 649). Um outro método de introduzir mutações na sequência de nucleotídios codificando a enzima é descrito em Nelson e Long (*Analytical Biochemistry* (1989), 180, p 147-151).

[000305] Em vez da mutagênese direcionada a um determinado sítio, tal como descrito anteriormente, pode-se introduzir mutações aleatoriamente, por exemplo, pela utilização de um kit comercial tal como o GeneMorph PCR, kit de mutagênese da Stratagene, ou o Diversify PCR, kit de mutagênese aleatória da Clontech. A EP 0583265 se refere a métodos para otimizar a mutagênese baseado de PCR, que também pode ser combinado com o uso de análogos mutagênicos do DNA, como os descritos na EP 0866796. As tecnologias de PCR propensas ao erro são convenientes para a produção de variantes das enzimas lipídio acil transferases com as características feridas. A WO 0206457 se refere à evolução molecular de lipases.

[000306] Um terceiro método para se obterem novas seqüências é fragmentar seqüências de nucleotídio não-idênticas, usando qualquer número de enzimas de restrição ou uma enzima como a DNase I, e remontar a codificação das seqüências do nucleotídio inteiro para a proteína funcional. Alternativamente, pode-se usar uma ou múltiplas seqüências não-idênticas do nucleotídio e introduzir mutações durante a remontagem da sequência inteira do nucleotídio. As tecnologias de embaralhamento de DNA e de embaralhamento de famílias são convenientes para a produção de variantes do lipídio acil transferases com características preferenciais. Os métodos convenientes para executar o “embaralhamento” podem ser encontrados nas EP 0752008, EP 1138763, EP 1103606. O embaralhamento também pode ser combinado com outras formas de mutagênese do DNA como descrito nas US 6.180.406 e WO 01/34835.

[000307] Assim, é possível produzir numerosas mutações dirigidas a sítios ou aleatórias em uma sequência de nucleotídios, seja *in vivo* ou *in vitro*, e

posteriormente avaliar quanto a funcionalidade melhorada do polipeptídio codificado por várias maneiras. A utilização em métodos de recombinação mediados por *silico* e *exo* (ver WO 00/58517, US 6.344.328, US 6.361.974), por exemplo, a evolução molecular pode ser executada onde a variante produzida conserva homologia muito baixa em relação a enzimas ou proteínas conhecidas. Tais variantes assim obtidas podem ter analogia estrutural significativa em relação a enzimas transferase conhecidas, mas possuem homologia muito baixa em relação à seqüência de aminoácidos.

[000308] Como forma de um exemplo não-restritivo, adicionalmente, as mutações ou as variantes naturais de uma seqüência de polinucleotídeos podem ser recombinadas ou com o tipo selvagem ou com outras mutações ou variantes naturais para produzir novas variantes. Tais novas variantes também podem ser avaliadas quanto à funcionalidade melhorada do polipeptídio codificado.

[000309] A aplicação dos métodos de evolução molecular supracitados, ou semelhantes, permite a identificação e a seleção de variantes das enzimas da presente invenção que possui características preferidas sem qualquer conhecimento prévio de estrutura ou função da proteína, e permite a produção de imprevisíveis mas benéficas mutações ou variantes. Há numerosos exemplos da aplicação da evolução molecular na técnica da otimização ou alteração da atividade de enzimas, tais exemplos incluem, mas não estão limitados a um ou mais dos seguintes: expressão e/ou atividade otimizada em uma célula hospedeira ou *in vitro*, atividade enzimática aumentada, especificidade alterada do substrato e/ou de produto, aumentada ou reduzida estabilidade enzimática ou estrutural, atividade/especificidade enzimática alterada em condições ambientais preferidas, de, por exemplo, temperatura, pH ou substrato.

[000310] Como será evidente para uma pessoa experimentada na técnica, usando instrumentos de evolução molecular uma enzima pode ser alterada para melhorar a funcionalidade da enzima.

[000311] Adequadamente, a enzima lipídio acil transferase usada na

invenção pode ser uma variante, isto é, conter pelo menos uma substituição, eliminação ou adição aminoácido, quando em comparação com uma enzima de origem. As enzimas variantes conservam pelo menos 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % de homologia com a enzima de origem. Enzimas de origem convenientes podem incluir qualquer enzima com atividade esterase ou lipase. Preferivelmente, a enzima de origem se alinha com a sequência de consenso PFAM00657.

[000312] Em uma modalidade preferível uma enzima variante lipídio acil transferase conserva ou incorpora pelo menos um ou vários dos resíduos de aminoácidos da sequência de consenso PFAM00657, encontrados no GDSx, GANDY e blocos de HPT.

[000313] As enzimas, como lipases sem ou com baixa atividade lipídio acil transferase em um ambiente aquoso podem ser mutadas usando instrumentos para evolução molecular para introduzir ou realçar a atividade transferase, produzindo desse modo uma enzima lipídio acil transferase com a atividade transferase significativa conveniente para o uso nas composições da presente invenção.

[000314] Adequadamente, a enzima lipídio acil transferase para uso na invenção pode ser uma variante com a atividade de enzima melhorada em lipídios polares, preferivelmente fosfolipídios e/ou glicolipídios quando em comparação com a enzima de origem. Preferivelmente, tais variantes também possuem baixa ou nenhuma atividade na lise de lipídios polares. A atividade melhorada em lipídios polares, fosfolipídios e/ou glicolipídios pode ser o resultado da hidrólise e/ou da atividade transferase ou uma combinação de ambas.

[000315] A enzima variante lipídio acil transferases para o uso na invenção pode ter atividade reduzida em triglicerídeos, e/ou monoglicerídeos e/ou diglicerídeos comparado com a enzima de origem.

[000316] Adequadamente a enzima variante pode não ter nenhuma atividade em triglicerídeos e/ou monoglicerídeos e/ou diglicerídeos.

[000317] Alternativamente, a enzima variante para uso na invenção pode ter a atividade aumentada em triglicerídeos, e/ou também ter a atividade aumentada em um ou mais dos seguintes, lipídios polares, fosfolipídios, lecitina, fosfatidilcolina, glicolipídios, digalactosil monoglicerídeo, monogalactosil monoglicerídeo.

[000318] As variantes da enzima lipídio acil transferase são conhecidas, e uma ou várias de tais variantes podem ser convenientes para o uso nos métodos e usos de acordo com a presente invenção e/ou nas composições de enzima de acordo com a presente invenção. Como forma somente de exemplo, as variantes da enzima lipídio acil transferase que são descritas nas seguintes referências podem ser usadas de acordo com a presente invenção: Hilton & Buckley *J. Biol. Chem.*, 1991 Jan 15; 266 (2): 997-1000; Robertson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1994 Jan 21; 269 (3): 2146-50; Brumlik *et al.*, *J. Bacteriol.*, 1996 Abr; 178 (7): 2060-4; Peelman *et al.*, *Protein Sci.* 1998 Mar; 7 (3): 587-99.

SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS

[000319] A presente invenção também engloba sequências de aminoácidos de polipeptídios que possuem as propriedades específicas tal como aqui definido.

[000320] Tal tal como aqui utilizado, o termo “sequência de aminoácido” é sinônimo ao termo “polipeptídio” e/ou do termo “proteína”. Em alguns exemplos, o termo “sequência de aminoácido” é sinônimo ao termo “peptídio”.

[000321] A sequência de aminoácidos pode ser preparada/isolada de uma fonte conveniente, ou pode ser feita sinteticamente ou pode ser preparado pelo uso de técnicas de DNA recombinante.

[000322] Adequadamente, as sequência de aminoácidos podem ser obtidas por técnicas padrão dos polipeptídios isolados aqui ensinados.

[000323] Um método conveniente para determinar sequência de aminoácidos de polipeptídios isolados é tal como se segue:

[000324] O polipeptídio purificado pode ser congelado a vácuo e 100

µg do material congelado a vácuo podem ser dissolvidos em 50 µl de uma mistura de uréia a 8 M e bicarbonato de amônio a 0,4 M, pH 8,4. A proteína dissolvida pode ser desnaturada e reduzida durante 15 minutos a 50°C depois de coberta com nitrogênio e adição de 5 µl a 45 mM de ditioneitol. Depois de esfriar à temperatura ambiente, podem ser acrescentados 5 µl a 100 mM de iodo acetamida para os resíduos cisteína para serem derivatizados por 15 minutos na temperatura ambiente, ausência de luz e sob atmosfera de nitrogênio.

[000325] Podem ser acrescentados 135 µl de água e 5 µg da endoproteínase Lys-C em 5 µl da água à mistura de reação acima mencionada e a digestão pode ser executada a 37°C sob atmosfera de nitrogênio durante 24 horas.

[000326] Os peptídios resultantes podem ser separados por HPLC em fase reversa em uma coluna de C18 VYDAC (0,46 x 15 cm; 10 µm; The Separation Group, Califórnia, EUA) usando o solvente A: 0,1 % de TFA em água e o solvente B: 0,1 % de TFA em acetonitrila. Os peptídios selecionados podem ser re-cromatografados em uma coluna de Develosil C18 que usa o mesmo sistema solvente, antes do sequenciamento do N-terminal. O sequenciamento pode ser feito usando um sequenciador 476A da Biosystems Applied que usa ciclos rápidos de líquido pulsado segundo instruções do fabricante (Biosystems Applied, Califórnia, EUA).

IDENTIDADE DA SEQÜÊNCIA OU HOMOLOGIA DA SEQÜÊNCIA

[000327] A presente invenção também engloba o uso de seqüências que possuem um grau de identidade de seqüência ou homologia de seqüência com as seqüências de aminoácidos de um polipeptídio possuindo as propriedades específicas aqui definidas ou de quaisquer seqüências de nucleotídios que codifiquem tal polipeptídio (daqui por diante referidas como “seqüências homólogas”). Aqui, o termo “homólogo” significa uma entidade que possui uma certa homologia com as referidas seqüências de aminoácidos ou referidas seqüências de nucleotídios. Aqui o termo “homologia” pode ser igualado a “identidade”.

[000328] A sequência de aminoácidos e/ou a sequência de nucleotídeos homólogos deverá fornecer e/ou codificar um polipeptídeo que tenha a atividade funcional e/ou melhore a inatividade da enzima.

[000329] No presente contexto, uma sequência homóloga é considerada como incluindo uma sequência de aminoácidos que podem ser pelo menos 75 %, 85 % ou 90 % idêntica, preferivelmente pelo menos 95 % ou 98 % idêntica à referida sequência. Tipicamente, os homólogos compreenderão os mesmos sítios ativos etc, que a referida sequência de aminoácidos. Embora a homologia também possa ser considerada em termos de semelhança (isto é, resíduos aminoácidos que possuem propriedades/funções químicas semelhantes), no contexto da presente invenção é preferível expressar a homologia em termos de identidade de sequência.

[000330] No presente contexto, uma sequência homóloga é considerada como incluindo uma sequência de nucleotídeos que podem ser pelo menos 75 %, 85 % ou 90 % idênticos, preferivelmente pelo menos 95 % um grupo mundo ou 98 % idênticos a uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo da presente invenção (a sequência referida). Tipicamente, os homólogos compreenderão as mesmas sequências que codificam para os sítios ativos etc, como a sequência referida. Embora a homologia também possa ser considerada em termos de similaridade (isto é resíduos aminoácidos que possuem propriedades/funções químicas semelhantes), no contexto da presente invenção é preferível expressar a homologia em termos de identidade de sequência.

[000331] As comparações de homologia podem ser conduzidas visualmente, ou mais normalmente, com a ajuda de programas de comparação de sequência normalmente disponíveis. Esses programas de computador disponíveis comercialmente podem calcular a homologia percentual (%) entre duas ou mais sequências.

[000332] A homologia percentual pode ser calculada sobre sequências contíguas, isto é uma sequência é alinhada com outra sequência e cada aminoácido em uma sequência é diretamente comparado com o

correspondente aminoácido na outra sequência, um resíduo de cada vez. Esse processo é chamado um alinhamento “sem intervalo”. Tipicamente, tais alinhamentos sem intervalo são executados somente sobre um número relativamente curto de resíduos.

[000333] Embora seja um método muito simples e consistente, ele falha ao tentar levar em consideração que, por exemplo, em um par idêntico de sequências de qualquer forma, uma inserção ou eliminação farão com que os resíduos aminoácidos seguintes sejam postos fora do alinhamento, resultando potencialmente assim em uma grande redução do percentual de homologia quando é realizado um alinhamento global. Conseqüentemente, a maior parte de métodos de comparação de sequência são projetados para produzir ótimos alinhamentos que levam em consideração possíveis inserções e eliminações sem penalizar indevidamente a contagem total de homologia. Isto é feito inserindo-se “GAPs” na sequência de alinhamento para tentar maximizar a homologia local.

[000334] Entretanto, esses métodos mais complexos determinam “penalidades de GAP” para cada GAP que ocorre no alinhamento de modo que, para o mesmo número de aminoácidos idênticos, um alinhamento de sequência com a menor quantidade possível de “gaps”, conseguirá uma pontuação mais elevada do que uma sequência com muitos “gaps”. Tipicamente são utilizadas “atribuições de valores aos gaps” como forma de cobrar penalidades relativamente altas pela existência de um “gap” e penalidades mais baixas, para cada resíduo subsequente no “gap”. Esse é o sistema mais utilizado de pontuação de gap. Altas penalidades produzirão naturalmente alinhamentos otimizados com menos “gaps”. A maior parte de programas de alinhamento permite que as penalidades de GAP sejam modificadas. Entretanto, é preferível usar os valores de referência quando se estiver usando tal software para comparação de sequência. Por exemplo, usando o pacote GCG Wisconsin Bestfit, a penalidade de referência para uma sequência de aminoácidos é de -12 para um GAP e de -4 para cada extensão.

[000335] O cálculo da homologia percentual máxima, por isso,

necessita primeiramente da produção de um ótimo alinhamento, levando-se em consideração as “penalidades de GAP”. Um conveniente programa de computador para executar tal alinhamento é o pacote GCG Wisconsin Bestfit (Devereux *et al.*, 1984 *Nuc. Acids Research* 12, p 387). Exemplos de outros softwares que podem executar comparações de seqüência incluem, mas não estão limitados a, o pacote BLAST (Veja Ausubel *et al.*, 1999 *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ª Ed. Capítulo 18), o FASTA (Altschul *et al.*, 1990 *J. Mol. Biol.*, 403-410) e a suite GENEWORKS, de ferramentas de comparação. Ambos, BLAST e FASTA, estão disponíveis para procura “on-line” e “off-line” (veja Ausubel *et al.*, 1999, págs 7-58 a 7-60). Entretanto, para algumas aplicações, é preferível usar o programa GCG Bestfit. Também está disponível uma nova ferramenta chamada de Seqüências BLAST 2, usada para comparar a proteína e a seqüência de nucleotídios (Veja *FEMS Microbiol Lett* 1999, 174(2): 247 - 50; *FEMS Microbiol Lett* 1999, 177(1): 187 - 8 e tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

[000336] Embora a homologia percentual final possa ser medida em termos de identidade, o próprio processo de alinhamento não está tipicamente baseado em uma comparação “tudo-ou-nada” dos pares. Em vez disso, geralmente é usada uma matriz de escala de pontuação de semelhança para cada comparação pareada com base na semelhança química ou na distância evolutiva. Um exemplo comumente usado de tal matriz é a matriz BLOSUM62, a matriz de referência da suite de programas BLAST. Os programas GCG Wisconsin geralmente usam ou valores publicados de referência ou é fornecida uma tabela de comparação com símbolos de encomenda (ver manual do usuário para mais detalhes). Para algumas aplicações, é preferível utilizar os valores publicados de referência para o pacote GCG, ou no caso de outro software, a matriz de referência, tal como a BLOSUM62.

[000337] Alternativamente, as homologias percentuais podem ser calculadas usando as características de múltiplo alinhamento da DNASIS® (Software Hitachi), baseado em um algoritmo, análogo ao CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), *Gene* 73(1), 237 - 244).

[000338] Uma vez que o software tenha produzido um ótimo alinhamento, é possível calcular a homologia percentual, preferivelmente a identidade de seqüência percentual. O software tipicamente faz isto como parte da comparação de seqüência e gera um resultado numérico.

[000339] As seqüências também podem ter eliminações, inserções ou substituições de resíduos de aminoácidos que produzem uma modificação silenciosa e resultam em uma substância funcionalmente equivalente. Substituições deliberadas de aminoácidos podem ser feitas com base nas semelhanças da polaridade, da carga, da solubilidade, da hidrofobicidade, da hidrofiliabilidade e/ou da natureza anfipática os resíduos enquanto é conservada a atividade de ligação secundária da substância. Por exemplo, aminoácidos negativamente carregados incluem o ácido aspártico e o ácido glutâmico; aminoácidos positivamente carregados incluem a lisina e a arginina; e os aminoácidos com grupos dianteiros polares não carregados que possuem valores de hidrofiliabilidade semelhantes incluem a leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina, e tirosina.

[000340] Substituições conservadoras podem ser feitas, por exemplo, segundo a Tabela em baixo. Os aminoácidos no mesmo bloco na segunda coluna e preferivelmente na mesma linha na terceira coluna podem ser substituídos uns pelo outros:

ALIFÁTICOS	Apolar	G A P
		I L V
	Polar – sem carga	C S T M
		N Q
	Polar – com carga	D E
		K R
AROMÁTICOS		H F W Y

[000341] A presente invenção também engloba a substituição homóloga (substituição e troca são ambas usadas aqui para significar a permuta de um resíduo de aminoácido existente, por um resíduo alternativo)

que pode vir a ocorrer, isto é, substituição semelhante-por-semelhante, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. Também pode ocorrer a substituição não-homóloga, isto é, de uma classe de resíduos para outra, ou alternativamente envolvendo a inclusão de um aminoácido não natural tal como a ornitina (desse ponto em diante referida como Z), o ácido diamino butírico ornitina (desse ponto em diante referido como B), a norleucina ornitina (desse ponto em diante referida como O), a pirilalanina, a tienilalanina, a naftilalanina e a fenilglicina.

[000342] As substituições também podem ser feitas por aminoácidos não naturais.

[000343] As variantes das seqüências de aminoácidos podem incluir grupos convenientes de espaçadores que podem ser inseridos entre quaisquer dois resíduos de aminoácido da seqüência, inclusive grupos alquila como metila, etila ou grupos propila, além de espaçadores aminoácidos como a glicina ou resíduos de β -alanina. Uma forma adicional de variação, implicando na presença de um ou mais resíduos de aminoácidos na forma de peptoides, será bem entendido por aqueles experientes na técnica. Para se evitar a dúvida, a “forma de peptóide” é usada para se referir a uma variante de resíduos de aminoácidos na qual o grupo substituinte do carbono alfa está no átomo de nitrogênio do resíduo em vez de no carbono alfa. Os processos para preparo peptídios na forma de peptoide são conhecidos na técnica, por exemplo, Simon RJ *et al.*, *PNAS* (1992) 89(20), 9367 - 9371 e Horwell DC, *Trends Biotechnol.* (1995) 13(4), 132 - 134.

[000344] As seqüências de nucleotídios para uso na presente invenção ou a codificação de um polipeptídio possuindo as propriedades específicas aqui definidas, podem incluir nelas nucleotídios sintéticos ou modificados. Diversos e diferentes tipos de modificação para oligonucleotídios são conhecidos na técnica. Esses tipos incluem cadeias principais de metilfosfanato e fosforotioato e/ou a adição de acridina ou de cadeias de polilisina nas terminações 3' 5' da molécula. Para os objetivos da presente invenção, deve ser entendido que as seqüências de nucleotídios aqui descritas podem ser modificadas por qualquer

método disponível na técnica. Tais modificações podem ser executadas ou para melhorar a atividade *in vivo* ou para ampliar a vida útil das seqüências de nucleotídios.

[000345] A presente invenção também engloba o uso de seqüências de nucleotídios que são complementares às seqüências aqui discutidas, ou quaisquer derivados, fragmento ou derivado das mesmas. Se a seqüência for complementar a um fragmento das mesmas, então que a seqüência pode ser usada como uma sonda para identificar seqüências de codificação semelhantes em outros organismos, etc.

[000346] Os Polinucleotídios que não são 100 % homólogos às seqüências da presente invenção, mas estão dentro do alcance da invenção podem ser obtidos por diversos modos. Outras variantes das seqüências aqui descritas podem ser obtidas, por exemplo, sondando bibliotecas de DNA feitas de uma variedade de indivíduos, por exemplo, indivíduos de populações diferentes. Além disso, outros homólogos ou viral ou bacteriano ou celular, em particular homólogos celulares encontrados em células de mamíferos (por exemplo, células de rato, camundongo, gado bovino e primatas), podem ser obtidos e tais homólogos e fragmentos dos mesmos, em geral, podem ser capazes de se hibridizar seletivamente em relação às seqüências mostradas na seqüência aqui listada. Tais seqüências podem ser obtidas sondando-se bibliotecas de cDNA feitas a partir de bibliotecas de DNA genômico ou a partir de outras espécies de animal, e sondando tais bibliotecas com sondas compreendendo totalmente ou parcialmente qualquer uma das seqüências contidas na listagem anexa de seqüências sob condições de estringência de média para alta. Considerações semelhantes se aplicam à obtenção de espécies homólogas e as variantes alelicas do polipeptídio ou das seqüências de nucleotídio da invenção.

[000347] Variantes, cepas ou espécies homólogas também podem ser obtidas usando um PCR degenerado que usará “primers” projetados para focar seqüências dentro das variantes e dos homólogos codificando as seqüências de aminoácidos conservadas dentro das seqüências da presente invenção. As

seqüências conservadas podem ser preditas, por exemplo, pelo alinhamento das seqüências de aminoácidos de diversos homólogos ou variantes. Os alinhamentos de seqüência podem ser realizados usando softwares de computador conhecidos na técnica. Por exemplo, é largamente utilizado o programa GCG Wisconsin PileUp.

[000348] Os “primers” utilizados em PCR degenerado conterão uma ou várias posições degeneradas e serão utilizados em condições mais baixas de estrigência do que as condições utilizadas para clonar seqüências com “primers” exclusivos de seqüência para seqüências conhecidas.

[000349] Alternativamente, tais polinucleotídios podem ser obtidos por mutagênese direcionada a sítios de seqüências caracterizadas. Isto pode ser útil onde, por exemplo, sejam necessárias alterações nas seqüências silenciosas de codon para otimizar as preferências de codon para uma determinada célula hospedeira na qual as seqüências de polinucleotídios estejam sendo expressas. Outras modificações de seqüências podem ser desejadas de modo a introduzir sítios de reconhecimento de restrição de polipeptídio, ou para alterar a propriedade ou a função dos polipeptídios codificados pelos polinucleotídios.

[000350] Os polinucleotídios (seqüência de nucleotídios) da invenção podem ser usados para produzir um “primer”, por exemplo, um “primer” de PCR, um “primer” de uma reação de amplificação alternativa, uma sonda, por exemplo, marcada com um marcador de revelação por meios convencionais usando marcadores radioativos ou não radioativos, ou os polinucleotídios podem ser clonados em vetores. Tais “primers”, sondas e outros fragmentos terão pelo menos 15, preferivelmente pelo menos 20, por exemplo, pelo menos 25, 30 ou 40 nucleotides na sua extensão, e também são englobados pelo termo polinucleotídios da invenção, tal como aqui utilizado.

[000351] Os polinucleotídios, tais como polinucleotídios de DNA e as sondas, de acordo com a invenção, podem ser produzidos recombinantemente, sinteticamente, ou por qualquer meio disponível daqueles com habilidades na técnica. Eles também podem ser clonados pelas técnicas padrão.

[000352] Em geral, os “primers” serão produzidos por meios sintéticos, implicando uma produção gradual da seqüência desejada de ácido nucléico, um nucleotídio de cada vez. As técnicas para realizar essa produção usando técnicas automatizadas estão completamente disponíveis pela tecnologia.

[000353] Polinucleotídios mais longos serão produzidos geralmente utilizando técnicas recombinantes, por exemplo, usando técnicas de clonagem em por PCR (reação em cadeia de polimerase). Isto implicará na criação de um par de “primers” (por exemplo, de aproximadamente 15 a 30 nucleotídios) flanqueando uma região do lipídio que visa uma seqüência que se deseja clonar, colocando os “primers” em contato com o mRNA ou o cDNA obtido de um animal ou de uma célula humana, realizando a reação em cadeia de polimerase sob condições que levam a amplificação da região desejada, isolando o fragmento amplificado (por exemplo, purificando a mistura de reação em um gel de agarose) e recuperando o DNA amplificado. Os “primers” podem ser projetados para conter sítios de restrição de reconhecimento de enzima convenientes para que o DNA amplificado possa ser clonado em um vetor de clonagem conveniente.

HIBRIDIZAÇÃO

[000354] A presente invenção também engloba seqüências que são complementares às seqüências da presente invenção ou seqüências que são capazes de se hibridizar às seqüências da presente invenção ou às seqüências que são complementares às mesmas .

[000355] O termo “hibridização” tal como aqui utilizado, deverá incluir tanto “o processo pelo qual uma fita de ácido nucléico se junta com uma fita complementar pelo pareamento de bases”, como o processo da amplificação tal como executado pelas tecnologias da reação em cadeia de polimerase (PCR).

[000356] A presente invenção também engloba o uso de seqüências de nucleotídios que são capazes de hibridizar às seqüências que são complementares às seqüências aqui discutidas, ou quaisquer derivados, fragmentos ou derivado das mesmas.

[000357] A presente invenção também engloba seqüências que são complementares às seqüências que são capazes de hibridizar às seqüências de nucleotídioss aqui discutidas.

[000358] As condições de hibridização estão baseadas na temperatura de fusão (Tf) do complexo de ligação dos nucleotídios, tal como ensinado em Berger e Kimmel (1987, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*, volume 152, Academic Press, San Diego, CA), e conferem uma “estrigência” definida, tal como explicado abaixo.

[000359] A máxima estrigência ocorre tipicamente em aproximadamente Tf –5°C (5°C abaixo da Tf da sonda); a alta estrigência entre aproximadamente 5°C até 10°C abaixo da Tf; a estrigência intermediária de aproximadamente 10°C até 20°C abaixo da Tf; e baixa estrigência a aproximadamente 20°C até 25°C abaixo da Tf. Como será entendido por aqueles com habilidade na técnica, uma estrigência máxima de hibridização pode ser usada para identificar ou detectar seqüências idênticas de nucleotídio enquanto uma estrigência intermediária (ou baixa) de hibridização, pode ser usada para identificar ou detectar seqüências de polinucleotídios semelhantes ou relacionadas.

[000360] Preferivelmente, a presente invenção engloba seqüências que são complementares às seqüências que são capazes de hibridizar em altas condições de estrigência ou condições de estrigência intermediárias para seqüências de nucleotídios que codificam polipeptídios que possuam as propriedades específicas tal como aqui definidas.

[000361] Mais preferivelmente, a presente invenção engloba seqüências que são complementares à seqüências que são capazes de hibridizar em altas condições de estrigencia (por exemplo, 65°C e 0,1xSSC {lxSSC = NaCl a 0,15 M, citrato de sódio a 0,015 M, pH 7,0}) a seqüências de nucleotídios que codificam polipeptídios que possuem propriedades específicas tal como aqui definidas.

[000362] A presente invenção também se relaciona a seqüências de nucleotídios que podem hibridizar às seqüências de nucleotídios discutidas

aqui (inclusive seqüências complementares às discutidas aqui).

[000363] A presente invenção também se relaciona a seqüências de nucleotídeo que são complementares às seqüências que podem hibridizar às seqüências de nucleotídeos discutidas aqui (inclusive seqüências complementares às discutidos aqui).

[000364] Também incluídas dentro do escopo da presente invenção estão as seqüências de polinucleotídeos que são capazes de hibridizar às seqüências de nucleotídeos discutidas aqui em condições de estringência intermediária até a estringência máxima.

[000365] Em um aspecto preferível, a presente invenção cobre seqüências de nucleotídeos que podem hibridizar às seqüências de nucleotídeos discutidas aqui, ou o complemento das mesmas, sob condições de estringência (por exemplo, 50°C e 0,2xSSC).

[000366] Em um aspecto mais preferível, a presente invenção cobre seqüências de nucleotídeos que podem hibridizar às seqüências de nucleotídeos discutidas aqui, ou o complemento das mesmas, sob altas condições de estringência (por exemplo, 65°C e 0,1xSSC).

EXPRESSÃO DE POLIPEPTÍDIOS

[000367] Uma seqüência de nucleotídeos para uso na presente invenção ou para codificar um polipeptídeo que tem propriedades específicas, tal como aqui definidas, pode ser incorporada em um vetor replicável recombinante. O vetor pode ser usado para replicar e expressar a seqüência des nucleotídeos, na forma de polipeptídeo, em uma, e/ou de uma, célula hospedeira compatível. A expressão pode ser controlada usando seqüências de controle que incluem promotores ou melhoradores e outros sinais de regulação de expressão. Podem ser utilizados os promotores procarióticos e os promotores funcionais em células eucarióticas. Podem ser usados os promotores específicos de tecidos ou específicos de estímulos. Os promotores quiméricos também podem ser utilizados compreendendo elementos de seqüência de dois ou mais promotores diferentes descritos anteriormente.

[000368] O polipeptídeo produzido por uma célula hospedeiro

recombinante pela expressão da sequência de nucleotídeos pode ser secretado ou contido intracelularmente dependendo da sequência e/ou do vetor usado. As seqüências de codificação podem ser projetadas com seqüências de sinais que direcionam a secreção da substância que codifica seqüências através de uma determinada membrana de célula procariótica ou eucariótica.

VETOR DE EXPRESSÃO

[000369] O termo “vetor de expressão” significa um construtor capaz de expressão *in vivo* ou *in vitro*.

[000370] Preferivelmente, o vetor de expressão é incorporado no genoma do organismo. O termo “incorporado” preferivelmente engloba a incorporação estável dentro do genoma.

[000371] A sequência de nucleotídeos da presente invenção ou a codificação para um polipeptídeo que possua as propriedades específicas tal como aqui definidas, pode estar presente em um vetor, no qual a sequência de nucleotídeos está operacionalmente ligada às seqüências reguladoras de tal modo que as seqüências reguladoras são capazes de fornecer a expressão da sequência de nucleotídeos por um organismo hospedeiro conveniente, isto é o vetor é um vetor de expressão.

[000372] Os vetores da presente invenção podem ser transformados dentro de uma célula de um hospedeiro conveniente tal como descrito abaixo para fornecer a expressão de um polipeptídeo possuindo as propriedades específicas tal como aqui definidas.

[000373] A escolha do vetor, por exemplo, um plasmídeo, um cosmídeo, um vírus ou um vetor fago, muitas vezes dependerá da célula hospedeira na qual o mesmo deverá ser introduzido.

[000374] Os vetores podem conter um ou mais genes de marcadores selecionáveis - como um gene que confere resistência a antibióticos, por exemplo, ampicilina, canamicina, cloranfenicol ou a resistência tetraciclina. Alternativamente, a seleção pode ser realizada pela co-transformação (tal como descrito na WO 91/17243).

[000375] Os vetores podem ser utilizados *in vitro*, por exemplo, para a

produção do RNA ou utilizados a transfectar ou transformar uma *célula hospedeira*.

[000376] Assim, em uma modalidade adicional, a invenção fornece um método para fazer as seqüências de nucleotídios da presente invenção ou seqüências de nucleotídios que codificam polipeptídios que possuem as propriedades específicas, tal como aqui definido, introduzindo uma seqüência de nucleotídios em um vetor replicável, introduzindo o vetor em uma célula hospedeira compatível, e cultivando a célula hospedeira em condições que ocasionam a réplica do vetor.

[000377] O vetor pode, além disso, compreender uma seqüência de nucleotídios que permita ao vetor replicar-se na célula hospedeira em questão. Exemplos de tais seqüências são as origens da replicação dos plamídios pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 e pIJ702.

SEQÜÊNCIAS REGULADORAS

[000378] Em algumas aplicações, uma seqüência de nucleotídios para uso na presente invenção ou uma seqüência de nucleotídios que codifica um polipeptídio possuindo as propriedades específicas tal como aqui definidas, pode ser operacionalmente ligado a uma seqüência reguladora que é capaz fornecer a expressão da seqüência de nucleotídios, como a célula hospedeira escolhida. Como forma de exemplo, a presente invenção engloba um vetor que compreende a seqüência de nucleotídios da presente invenção operacionalmente ligado a uma tal seqüência reguladora, isto é o vetor é um vetor de expressão.

[000379] O termo “operacionalmente ligado” se refere a uma justaposição em que os componentes descritos estão em uma relação que os permite funcionar da maneira desejarem. Uma seqüência reguladora “operacionalmente ligada” a uma seqüência de codificação está ligada de tal modo que a expressão da seqüência de codificação é atingida em condições compatíveis com as seqüências de controle.

[000380] O termo “seqüências reguladoras” inclui promotores e melhoradores e outros sinais de regulação da expressão.

[000381] O termo “promotor” é usado no sentido normal da técnica, por exemplo, um sítio de ligação da RNA polimerase.

[000382] A expressão melhorada da sequência de nucleotídeos que codifica a enzima possuindo as propriedades específicas, tal como aqui definidas, também pode ser atingida pela seleção de regiões reguladoras heterólogas, por exemplo, promotoras, regiões de liderança de secreção e regiões terminadoras.

[000383] Preferivelmente, a sequência de nucleotídeos da presente invenção pode estar operacionalmente ligada a pelo menos um promotor.

[000384] Exemplos de promotores convenientes para direcionar a transcrição da sequência de nucleotídeos em um hospedeiro bacteriano, fúngico ou levedura são bem conhecidos na técnica.

CONSTRUCTOS

[000385] O termo “constructo”, que é um sinônimo de termos como “conjugado”, “cassete” e “híbrido”, inclui uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que tem as propriedades específicas tal como aqui definidas, para o uso de acordo com a presente invenção, diretamente ou indiretamente ligado a um promotor. Um exemplo de uma ligação indireta é o fornecimento de um grupo espaçador conveniente, tal como uma sequência intron, tal como o Sh1-intron ou o ADH-intron, intermediário entre o promotor e a sequência de nucleotídeos da presente invenção. O mesmo é verdade para o termo “fundido” em relação à presente invenção, que inclui a anexação direta ou indireta. Em alguns casos, os termos não cobrem a combinação natural de codificação da sequência de nucleotídeos da proteína comumente associada com o promotor de genes do tipo selvagem e quando eles estão ambos no seu ambiente natural.

[000386] O constructo pode até conter ou expressar um marcador que permite a seleção do constructo genético.

[000387] Para algumas aplicações, preferivelmente o constutor compreende pelo menos uma sequência de nucleotídeos da presente invenção ou uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo possuindo as

propriedades específicas tal como aqui definidas, operacionalmente ligado a um promotor.

CÉLULAS HOSPEDEIRAS

[000388] O termo “célula hospedeira”, em relação à presente invenção, inclui qualquer célula que compreende ou uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo possuindo as propriedades específicas tal como aqui definidas, ou um vetor de expressão tal como descrito acima, e que é utilizada na produção recombinante de um polipeptídeo possuindo as propriedades específicas tal como aqui definidas.

[000389] Assim, uma modalidade adicional da presente invenção fornece células hospedeiras transformadas ou transfectadas com uma sequência de nucleotídeos da presente invenção ou com uma sequência de nucleotídeos que expressa um polipeptídeo possuindo as propriedades específicas tal como aqui definidas. As células serão escolhidas por serem compatíveis com o vetor acima citado e, podem, por exemplo, ser procarióticas (por exemplo, bacterianas), fúngicas, de levedura ou células de plantas. Preferivelmente, as células hospedeiras não são células humanas.

[000390] Os exemplos de organismos hospedeiros bacterianos adequados são as bactérias gram negativas ou as bactérias gram positivas.

[000391] Dependendo da natureza da sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo possuindo as propriedades específicas tal como aqui definidas, e/ou o desejo por um processamento adicional da proteína expressa, os hospedeiros eucarióticos tal como as leveduras, ou outros fungos, podem ser preferidos. Em geral, as células de leveduras são preferidas às células de fungos porque são mais fáceis manipular. Entretanto, algumas proteínas são ou pobremente secretadas pela célula de levedura, ou em alguns casos não são processadas propriamente (por exemplo, hiper glicosilação, na levedura). Nesses casos, um organismo hospedeiro fúngico diferente deveria ser selecionado.

[000392] O uso de células hospedeiras convenientes, tal como leveduras, fungos e células hospedeiras de plantas, fornece modificações pós-

traducional (por exemplo, miristoilação, glicosilação, truncamento, lapidação e fosforilação da tirosina, serina ou treonina) como podem ser necessárias para conferir uma ótima atividade biológica em produtos de expressão recombinante de acordo com a presente invenção.

[000393] A célula hospedeira pode ser deficiente de protease ou ser uma cepa com um mínimo de protease.

ORGANISMO

[000394] O termo “organismo” em relação com a presente invenção inclui qualquer organismo que possa compreender uma sequência de nucleotídeos de acordo com a presente invenção, ou uma codificação de sequência de nucleotídeos de um polipeptídeo possuindo as propriedades específicas, tal como aqui definidas e/ou os produtos obtidos do mesmo.

[000395] Organismos convenientes podem incluir um procarionte, um fungo, uma levedura ou uma planta.

[000396] O termo “organismo transgênico” em relação à presente invenção, inclui qualquer organismo que possa compreender uma sequência de nucleotídeos e acordo com a presente invenção ou uma sequência de nucleotídeos codificando um polipeptídeo possuindo as propriedades específicas tal como aqui definidas, e/ou os produtos obtidos do mesmo, e/ou no qual um promotor possa permitir a expressão da codificação da sequência dos nucleotídeos para um polipeptídeo possuindo as propriedades específicas tal como aqui definidas, dentro do organismo. Preferivelmente a sequência de nucleotídeos é incorporada no genoma do organismo.

[000397] O termo “organismo transgênico” não engloba seqüências codificadas por nucleotídeos nativos, no seu ambiente natural, quando eles estão sob o controle do seu promotor nativo que está também no seu ambiente natural.

[000398] Por isso, o organismo transgenic da presente invenção inclui um organismo que compreende, qualquer um de, ou combinações de, uma codificação de sequência de nucleotídeos para um polipeptídeo possuindo propriedades específicas tal como as definidas aqui, um constructo tal como

definido aqui, os vetores tal como definidos aqui, os plasmídeos tal como definidos aqui, as células tal como definidas aqui, ou os produtos dos mesmos. Por exemplo, o organismo transgênico também pode compreender uma codificação de sequências de nucleotídios para um polipeptídeo possuindo as propriedades específicas, tal como aqui definidas, sob o controle de um promotor heterólogo.

TRANSFORMAÇÃO DAS CÉLULAS/ORGANISMO HOSPEDEIROS

[000399] Como anteriormente indicado, o organismo hospedeiro pode ser um organismo procariótico ou um organismo eucariótico. Exemplos de hospedeiros procarióticos convenientes incluem a *E. coli* e o *Bacillus subtilis*.

[000400] Os ensinamentos na transformação de hospedeiros procarióticos estão bem documentados na técnica, por exemplo, ver Sambrook *et al.*, (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edição, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press). Se um hospedeiro procariótico for usado então a sequência de nucleotídios pode necessitar ser adequadamente modificada antes da transformação, remoção de introns, por exemplo.

[000401] Em outra modalidade o organismo transgenic pode ser uma levedura.

[000402] As células de fungos filamentosos podem ser transformadas usando vários métodos conhecidos na técnica, tal como um processo envolvendo a formação e a transformação do protoplasto seguidas pela regeneração da parede de célula em uma maneira conhecida. O uso do *Aspergillus* como um microrganismo hospedeiro é descrito na EP 0238023.

[000403] Outro organismo hospedeiro pode ser uma planta. Uma revisão das técnicas gerais utilizadas para transformação de plantas pode ser encontrada nos artigos de Potrykus (*Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* [1991] 42: 205 - 225) e Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech*, de março/abril de 1994, 17 - 27). Ensinamentos adicionais para a transformação de plantas podem ser encontrados na EP-A-0449375.

[000404] Os ensinamentos gerais para transformação de fungos, leveduras e plantas são apresentados nas seções seguintes.

FUNGO TRANSFORMADO

[000405] Um organismo hospedeiro pode ser um fungo, tal como um fungo filamentoso. Exemplos de tais hospedeiros convenientes incluem quaisquer membros que pertençam aos gêneros *Thermomyces*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Trichoderma* e assim por diante.

[000406] Os ensinamentos para transformação de fungos filamentosos são revistos na patente US-A-5741665 que afirma que as técnicas padrão para transformação de fungos filamentosos e fungos de cultivo são bem conhecidas na técnica. É encontrada uma extensa revisão de técnicas tal como as publicadas na *N. crassa*, por exemplo, em Davis e de Serres, *Methods Enzymol* (1971) **17A**: 79 - 143.

[000407] Ensinamentos adicionais para transformação de fungos filamentosos são revistos na US-A-5674707.

[000408] Em um aspecto, o organismo hospedeiro pode ser do gênero *Aspergillus*, como o *Aspergillus niger*.

[000409] Um *Aspergillus* transgênico de acordo com a presente invenção também pode estar preparado, por exemplo, pelos seguintes ensinamentos de Turner G. 1994 (*Vectors for genetic manipulation*. Em: Martinelli S. D., Kinghorn J. R. (Editores) *Aspergillus: 50 Years on. Progress in Industrial Microbiology*, vol 29. Elsevier Amsterdam 1994. pp. 641 - 666).

[000410] A expressão genética em fungos filamentosos foi revista em Punt *et al.*, (2002) *Trends Biotechnol*, maio 2002; 20(5): 200 - 6, Archer & Peberdy, *Crit Rev Biotechnol* (1997) 17(4): 273 - 306.

LEVEDURA TRANSFORMADA

[000411] Em outra modalidade, o organismo transgênico pode ser uma levedura.

[000412] Uma revisão dos princípios da expressão genética heteróloga em leveduras é fornecida em, por exemplo, *Methods Mol Biol* (1995), 49: 341 - 54, e *Curr Opin Biotechnol* (1997) outubro; 8(5): 554 - 60.

[000413] Neste sentido, a levedura, tal como a espécie *Saccharomyces cerevisi* ou *Pichia pastoris* (ver *FEMS Microbiol Rev* (2000, 24(1): 45 - 66),

pode ser usada como um veículo de expressão genética heteróloga.

[000414] Uma revisão dos princípios da expressão genética heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* e a secreção de produtos genéticos é dada por E Hinchcliffe e E Kenny (1993, “*Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes*”, *Yeasts*, Vol. 5, Anthony H Rose e J Stuart Harrison, eds, 2ª edição, Academic Press Ltd.).

[000415] Para a transformação da levedura, foram desenvolvidos diversos protocolos. Por exemplo, uma *Saccharomyces* transgênica de acordo com a presente invenção pode ser preparada pelos seguintes ensinamentos de Hinnen *et al.*, (1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75, 1929); Beggs, J D (1978, *Nature*, London, 275, 104); e Ito, H *et al.*, (1983, *J Bacteriology* 153, 163 - 168).

[000416] As células transformadas de levedura podem ser selecionadas usando vários marcadores seletivos, como marcadores auxotróficos, marcadores de resistência a antibióticos dominantes.

[000417] Um organismo de levedura hospedeiro conveniente pode ser selecionado da espécie de leveduras biotecnologicamente relevante como, mas não limitado a, a espécie de levedura selecionada de *Pichia spp.*, *Hansenula spp.*, *Kluyveromyces*, *Yarrowisia spp.*, *Saccharomyces spp.*, incluindo *S. cerevisiae*, ou *Schizosaccharomyces spp.* inclusive a *Schizosaccharomyces pombe*.

[000418] Uma cepa da espécie de levedura metilotrófica *Pichia pastoris* pode ser usada como organismo hospedeiro.

[000419] Em uma modalidade, o organismo hospedeiro pode ser uma espécie *Hansenula*, como a *H. polymorpha* (como descrito na WO 01/39544).

PLANTAS TRANSFORMADAS OU CÉLULAS TRANSFORMADAS DE PLANTAS

[000420] Um organismo hospedeiro conveniente para a presente invenção pode ser uma planta. Uma revisão das técnicas gerais pode ser encontrada nos artigos de Potrykus (*Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* [1991] 42: 205 - 225) e Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech*, março/abril, 1994

17 - 27), ou na WO 01/16308. A planta transgênica pode produzir níveis realçados de ésteres de fitoesterol e ésteres de fitoestanol, por exemplo.

[000421] Desse modo, a presente invenção também se refere um um método para a produção de uma planta transgênica com níveis realçados de ésteres de fitoesterol e ésteres de fitoestanol, compreendendo as etapas de transformar uma célula de planta com uma enzima lipídio acil transferase tal como aqui definido (especialmente com um vetor de expressão ou constructo compreendendo uma enzima lipídio acil transferase tal como aqui definido), e o crescimento de uma planta a partir de uma célula transformada de planta.

SECREÇÃO

[000422] Muitas vezes, é desejável para o polipeptídeo ser secretado do hospedeiro de expressão em meio de cultura de onde a enzima pode ser mais facilmente recuperada. De acordo com a presente invenção, a seqüência condutora da secreção pode ser selecionada com base no hospedeiro de expressão desejado. Seqüências de sinal híbridas também podem ser usadas dentro do contexto da presente invenção.

[000423] Exemplos típicos de seqüências heterólogas condutoras de secreção são aquelas que se originam do gene da amiloglicosidase fúngica (AG) (por exemplo, *glaA* - tanto 18 quanto 24 versões de aminoácidos de *Aspergillus*), o gene do fator-a (leveduras, por exemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Hansenula*) ou o gene da α -amylase (*Bacillus*).

DETECÇÃO

[000424] São conhecidos na técnica vários protocolos para detectar e medir a expressão da sequências de aminoácidos. Os exemplos incluem o imunoensaio de enzima adsorvida (ELISA), o radio imunoensaio (RIA) e a classificação de célula ativada por fluorescência (FACS).

[000425] É conhecida uma ampla variedade de marcadores e técnicas de conjugação por aqueles experientes na técnica e podem ser usadas em vários ensaios de aminoácidos e ácidos nucleicos.

[000426] Diversas empresas tais como a Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), a Promega (Madison, WI), e a US Biochemical Corp

(Cleveland, OH) fornecem comercialmente kits e protocolos desses procedimentos.

[000427] Moléculas relatoras ou marcadores relatores convenientes incluem aqueles radionuclídios, enzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminescentes ou agentes cromogênicos bem como substratos, cofactores, inibidores, partículas magnéticas e assim por diante. Patentes que ensinam o uso de tais marcadores incluem as US-A-3.817.837; US-A-3.850.752; US-A-3.939.350; US-A-3.996.345; US-A-4.277.437; US-A-4.275.149 e US-A-4.366.241.

[000428] Também podem ser produzidas imunoglobulinas recombinantes tal como mostrado na US-A-4.816.567.

PROTEÍNA DE FUSÃO

[000429] Um polipeptídeo possuindo as propriedades específicas tal como aqui definidas, pode ser produzido como uma proteína de fusão, por exemplo, para ajudar na extração e na purificação da mesma. Exemplos de proteínas de fusão parceiras incluem a glutathione-S-transferase (GST), 6xHis, GAL4 (ligação de DNA e/ou domínios de ativação transcricional) e β -galactosidase. Também pode ser conveniente incluir um sítio de clivagem proteolítica entre a proteína parceira de fusão e a sequência de proteína de interesse para permitir a retirada das seqüências da proteína de fusão. Preferivelmente a proteína de fusão não impedirá a atividade da seqüência protéica.

[000430] Os sistemas de expressão de fusão genética na *E. coli* foram revistos em *Curr. Opin. Biotechnol.* (1995), 6(5): 501– 6.

[000431] Em outra modalidade da invenção, a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo que tem as propriedades específicas tal como aqui definidas pode ser ligada a uma sequência heteróloga para codificar uma proteína de fusão. Por exemplo, para avaliação de bibliotecas de peptídios em relação a agentes capazes de afetar a atividade da substância, pode ser útil codificar uma substância quimérica que exprima um epítopo heterólogo que seja reconhecido por um anticorpo comercialmente disponível.

[000432] A invenção será descrita agora, somente com forma de exemplo, com referência às seguintes Figuras e Exemplos.

[000433] A Figura 1 mostra uma sequência de consenso PFAM00657 da versão 6 de banco de dados (SEQ ID N° 1).

[000434] A Figura 2 mostra uma sequência de aminoácidos (SEQ ID N° 2) obtida do organismo *Aeromonas hydrophila* (P10480; GI:121051).

[000435] A Figura 3 mostra uma sequência de aminoácidos (SEQ ID N° 3) obtida do organismo *Aeromonas salmonicida* (AAG098404; GI:9964017).

[000436] A Figura 4 mostra uma sequência de aminoácidos (SEQ ID N° 4) obtida do organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de acesso do Genbank NP 631558).

[000437] A Figura 5 mostra uma sequência de aminoácidos (SEQ ID N° 5) obtida do organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de acesso do Genbank: CAC42140).

[000438] A Figura 6 mostra uma sequência de aminoácidos (SEQ ID N° 6) obtido do organismo *Saccharomyces cerevisiae* (número de acesso do Genbank P41734).

[000439] A Figura 7 mostra um alinhamento de sequências selecionadas à sequência de consenso PFAM00657.

[000440] A Figura 8 mostra um alinhamento parelhado da SEQ ID N° 3 com a SEQ ID N° 2 mostrando 93 % de identidade de sequência do aminoácido. A sequência de sinal é sublinhada. O sinal + denota diferenças. O motivo GDSX que contém o sítio ativo serina 16, e os sítios ativos ácido aspártico 116 e histidina 291 são evidenciados (ver regiões sombreadas). Os números depois do aminoácido são a sequência de sinal menos (-).

[000441] A figura 9 mostra uma sequência de nucleotídios (SEQ ID N° 7) de codificação de uma enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção obtido do organismo *Aeromonas hydrophila*.

[000442] A Figura 10 mostra uma sequência de nucleotídios (SEQ ID N° 8) codificando uma enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção obtida do organismo *Aeromonas salmonicida*.

[000443] A Figura 11 mostra uma sequência de nucleotídeos (SEQ ID Nº 9) codificando uma enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção obtida do organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de acesso do Genbank Nec 003888.1: 8327480.. 8328367).

[000444] A Figura 12 mostra uma sequência de nucleotídeos (SEQ ID Nº 10) codificando uma enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção obtida do organismo *Streptomyces coelicolor* A3 (2) (número de acesso do Genbank AL939131.1:265480..266367).

[000445] A Figura 13 mostra uma sequência de nucleotídeos (SEQ ID Nº 11) codificando uma enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção obtida do organismo *Saccharomyces cerevisiae* (Genbank nº de acesso Z75034).

[000446] A Figura 14 mostra uma sequência de aminoácidos (SEQ ID Nº 12) obtida do organismo *Ralstonia* (número de acesso do Genbank: AL646052).

[000447] A Figura 15 mostra uma sequência de nucleotídeos (SEQ ID Nº 13) codificando uma enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção obtida do organismo *Ralstonia*.

[000448] A Figura 16 mostra a SEQ ID Nº 20. Código de acesso Scoe1 NCBI da proteína CAB39707.1 GI:4539178, que conservou a proteína hipotética [*Streptomyces coelicolor* A3(2)].

[000449] A Figura 17 mostra uma sequência de nucleotídeos mostrada como SEQ ID Nº 21, codificando o código de acesso NCBI da proteína, CAB39707.1 GI:4539178, que conservou a proteína hipotética [*Streptomyces coelicolor* A3(2)].

[000450] A Figura 18 mostra um aminoácido mostrado como SEQ ID Nº 22. Código de acesso Scoe2 NCBI da proteína CAC01477.1 GI:9716139, que conservou a proteína hipotética [*Streptomyces coelicolor* A3(2)].

[000451] A Figura 19 mostra uma sequência de nucleotídeos mostrada como SEQ ID Nº 23, codificando o código de acesso Scoe2 NCBI da proteína, CAC01477.1 GI:9716139, que conservou a proteína hipotética [*Streptomyces*

coelicolor A3(2)].

[000452] A figura 20 mostra uma sequência de aminoácidos (SEQ ID Nº 24) código de acesso Scoe3 NCBI da proteína, CAB88833.1 GI:7635996, proteína putativa secretada. [*Streptomyces coelicolor* A3(2)].

[000453] A Figura 21 mostra uma sequência de nucleotídios mostrada como SEQ ID Nº 25 codificando o código de acesso Scoe3 NCBI da proteína, CAB88833.1 GI:7635996, proteína putativa secretada. [*Streptomyces coelicolor* A3(2)].

[000454] A Figura 22 mostra uma sequência de aminoácidos (SEQ ID Nº 26) código de acesso Scoe4 NCBI da proteína, CAB89450.1 GI: 7672261, proteína putativa secretada. [*Streptomyces coelicolor* A3(2)].

[000455] A Figura 23 mostra uma sequência de nucleotídios mostrada como SEQ ID Nº 27, codificando o código de acesso Scoe4 NCBI da proteína, CAB89450.1 GI:7672261, proteína putativa secretada. [*Streptomyces coelicolor* A3(2)].

[000456] A Figura 24 mostra uma sequência de aminoácidos (SEQ ID Nº 28) código de acesso Scoe5 NCBI da proteína, CAB62724.1 GI:6562793, lipoproteína putativa secretada.

[000457] A Figura 25 mostra uma sequência de nucleotídios mostrada como SEQ ID Nº 29, codificando o código de acesso Scoe5 NCBI da proteína, CAB62724.1 GI:6562793, lipoproteína putativa secretada. [*Streptomyces coelicolor* A3(2)].

[000458] A Figura 26 mostra uma sequência de aminoácidos (SEQ ID Nº 30) código de acesso Srim1 NCBI da proteína, AAK84028.1 GI:15082088, GDLSL-lipase [*Streptomyces rimosus*].

[000459] A Figura 27 mostra uma sequência de nucleotídios mostrada como SEQ ID Nº 31, codificando o código de acesso Srim1 NCBI da proteína, AAK84028.1 GI:15082088, GDLSL-lipase [*Streptomyces rimosus*].

[000460] A Figura 28 mostra uma sequência de aminoácidos (SEQ ID Nº 32). Uma lipídio acil transferase da *Aeromonas hydrophila* (ATCC #7965).

[000461] A Figura 29 mostra uma sequência de nucleotídios (SEQ ID

Nº 33) codificando uma enzima lipídio acil transferase de *Aeromonas hydrophila* (ATCC #7965).

[000462] A Figura 30 mostra uma sequência de aminoácidos (SEQ ID Nº 34) de uma enzima lipídio acil transferase da *Aeromonas salmonicida subsp. Salmonicida* (ATCC #14174).

[000463] A Figura 31 mostra uma sequência de nucleotídeos (SEQ ID Nº 35) codificando uma enzima lipídio acil transferase de *Aeromonas salmonicida subsp. Salmonicida* (ATCC #14174).

[000464] A Figura 32 mostra que homólogos dos genes da *Aeromonas* podem ser identificados usando o serviço de ferramental de pesquisa de alinhamento básico local no Centro Nacional da Informação sobre Biotecnologia, NIH, MD, EUA e os bancos de dados concluídos de genoma. O motivo GDSX foi usado na pesquisa do banco de dados e foram identificadas várias seqüências/genes que potencialmente codificam enzimas com a atividade lipolítica. Os genes foram identificados como sendo do gênero *Streptomyces*, *Xanthomonas* e *Ralstonia*. Como num exemplo abaixo, o *Ralstonia solanacearum* foi alinhado ao gene (satA) da *Aeromonas salmonicida*. O alinhamento empareado mostrou identidade de 23 %. O sítio ativo serina está presente na terminação amino e os resíduos catalíticos de histidina e de ácido aspártico podem ser identificados.

[000465] A Figura 33 mostra a seqüência de consenso PFAM00657.11 [Família 00657, versão 11 de banco de dados] (desse ponto em diante denominada de consenso PFAM) e o alinhamento de várias seqüências à seqüência de consenso PFAM. As setas indicam os resíduos de sítio ativos, as caixas sublinhadas indicam três das caixas de homologia indicadas por [Upton C e Buckley JT (1995) *Trends Biochem Sci* **20**; 179 - 179]. As letras maiúsculas no consenso PFAM, indicam resíduos conservados em muitos membros de família. O símbolo “-” indica uma posição onde o modelo ocultado de Markov, do consenso PFAM, esperou encontrar um resíduo, mas não encontrou e, portanto uma GAP é inserida. O símbolo “-” indica um resíduo sem um resíduo correspondente no consenso PFAM. As seqüências são as seqüência de

aminoácidos listadas nas Figuras 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 e 30.

[000466] A figura 34 mostra a seqüência de consenso PFAM00657.11 [família 00657, versão 11 do banco de dados] (desse ponto em diante denominada de consenso PFAM) e o alinhamento de várias seqüências à seqüência de consenso PFAM. As setas indicam os resíduos de sítio ativos, as caixas sublinhadas indicam três das caixas de homologia indicadas por [Upton C e Buckley JT (1995) *Trends Biochem Sci* 20; 179-179]. As letras maiúsculas no consenso PFAM, indicam resíduos conservados em muitos membros de família. O símbolo “-” indica uma posição onde o modelo ocultado de Markov, do consenso PFAM, esperou encontrar um resíduo, mas não encontrou e, portanto uma GAP é inserida. O símbolo “.” indica um resíduo sem um resíduo correspondente no consenso PFAM. As seqüências são as seqüência de aminoácidos listadas nas Figuras 2, 16, 18, 20, 26, 28 e 30. Todas essas proteínas foram observadas como sendo ativas contra os substratos lipídicos.

[000467] A figura 35 mostra um vetor de expressão petl2-AsalGCAT=pSM contendo o C terminal marcado com uma His do gene lipídio acil transferase da *Aeromonas salmonicida*.

[000468] A Figura 36 mostra os resultados dos testes de extratos celulares em um Kit de Ensaio NEFA, que descreve a atividade de um recombinante, lipídio acil transferase da *A. salmonicida*, através da lecitina. Os poços da esquerda para a direita indicam: um controle positivo, um controle negativo (isto é, extratos de plasmídeo vazio) e amostras coletadas depois 0, 1, 2 e 3 horas de cultivo depois da indução de IPTG.

[000469] A Figura 37 mostra a otimização de crescimento da BL21(DE3)pLysS abrigando o vetor de expressão petl2-AsalGCAT=pSM mostrando que o cultivo a 30°C resultou na produção da enzima com alta atividade para a lecitina. Os extratos de célula foram testados para a atividade de fosfolipase usando o kit de Ensaio NEFA. Poços de da esquerda à direita: controle positivo; controle negativo; 20°C; 30°C.

[000470] A Figura 38 mostra extratos brutos de células de BL21(DE3)pLysS expressando atividade lipídio acil transferase incubada com o

substrato lecitina e a mistura de reação foi analisada usando cromatografia em camada fina mostrando a presença de produtos de degradação. Faixas: 1. Nenhuma enzima; 2. +A.sal-10µl 37°C; 3. +A.sal-20µl 37°C; 4. +A.sal-10µl 24°C; 5. +A.sal-20µl 24°C.

[000471] A Figura 39 mostra a purificação parcial da acil transferase da *Aeromonas salmonicida* mostrando a atividade da fosfolipase associada com a proteína purificada His-marcada. SE = extratos depois do ultrassom, His = purificado com spin-kit Ni-NTA da Qiagen.

[000472] A Figura 40 mostra o vetor de expressão petl2-A.h.GCAT=pSMa contendo o C terminal marcado com uma His do gene da Glicerolipídio Acil Transferase (GCAT) da *Aeromonas salmonicida*, usado para transformar a cepa BL21(DE3)pLysS da *E. coli*.

[000473] A Figura 41 mostra a atividade dos extratos brutos (5 e 10µl) contendo a enzima recombinante GCAT da *Aeromonas hydrophila* que foi testada para a lecitina usando o kit de Ácido Graxo Não Esterificado (NEFA) (Roche, Suíça), mostrando a presença da enzima ativa para o fosfolipídio lecitina.

[000474] A Figura 42 mostra que a otimização de crescimento da BL21(DE3)pLysS abrigando o vetor de expressão petl2-AsaIGCAT=pSM mostrando que o cultivo a 30°C resultou na produção da enzima com a alta atividade para a lecitina. Os extratos celulares foram testados para a atividade da fosfolipase usando o kit de ensaio NEFA.

[000475] A Figura 43 mostra a purificação parcial da acil transferases da *Aeromonas hydrophila* e da *A. salmonicida* mostrando atividade para a fosfolipase associada com a proteína His-marcada purificada. SE = extratos depois do ultrassom, His = purificado com spin-kit Ni-NTA da Qiagen.

[000476] A Figura 44 mostra a expressão dos genes da *Aeromonas* no *Bacillus subtilis* 163, mostrando a produção da enzima segregada com atividade tanto para a lecitina como para a DGDG. O constructo pUB-AH= contendo o gene da *A. hydrophila* e o constructo pUB-AS contendo o gene da *A. salmonicida*, o filtrado de cultura foi incubado com os substratos durante 60

minutos.

[000477] A Figura 45 e a Figura 46 mostram uma placa de TLC durante o desenvolvimento do solvente IV (clorofórmio: metanol:água (65:25:4)); Faixa 1: 40 mg de sitoesterol 30 minutos; Faixa 2: Transferase + 40 mg de sitoesterol 30 minutos; Faixa 3: Transferase + 80 mg de sitoesterol 30 minutos; Faixa 4: Transferase + 40 mg de sitoesterol 120 minutos; Faixa 5: Transferase + 80 mg de sitoesterol 120 minutos; Faixa 6: Transferase + 40 mg de sitoesterol 300 minutos; Faixa 7: 40 mg de sitoesterol 300 minutos; Faixa 8: Colesterol; Faixa 9: Sitoesterol.

[000478] A Figura 47 descreve a reação entre a fosfatidilcolina e colesterol que é catalisada por uma enzima lipídio acil transferase.

[000479] A Figura 48 mostra uma análise TLC dos lipídios extraídos da enzima da gema de ovo tratada ou não tratada: 6) 0,31 PLU/g Transferase #179; 7) 1,25 PLU/g Transferase #178-9; 8) 23,25 PLU/g Fosfolipase #3108; 9) Controle.

[000480] A figura 49 mostra as amostras do teste de maionese produzida pela gema de ovo tratada ou não tratada por enzima: 5) Transferase #179, 0,31 PLU/g; 6) Transferase #178-9, 1,25 PLU/g; 7) Fosfolipase #3108, 23,3 PLU/g; 8) Controle.

[000481] A Figura 50 mostra uma TLC (no solvente I) do lipídio da gema de ovo tratada com uma enzima lipídio acil transferase da *A. hydrophila*.

[000482] A Figura 51 mostra uma TLC (no solvente IV) do lipídio da gema de ovo tratada com uma enzima lipídio acil transferase da *A. hydrophila*.

[000483] A Figura 52 mostra uma análise TLC do lipídio da gema de ovo tratada transferase durante um determinado tempo.

[000484] A Figura 53 mostra a quantidade de ácido graxo e éster de colesterol produzidos como uma função do tempo usando uma enzima lipídio acil transferase (Tranf #178-9) comparado com quando se está usando uma enzima lipolítica de controle, da *Thermomyces lanuginosus*.

[000485] A Figura 54 mostra a atividade transferase relativa como um percentual das atividades de transferase e hidrolítica em reações enzimáticas

na gema de ovo com alta concentração de água, a #1991 (fosfolipase A2) e a #2427 (fosfolipase A1) são fosfolipases de controle, # 178 é uma enzima lipídio acil transferase.

[000486] A Figura 55 mostra o efeito do conteúdo de água sobre o ensaio da atividade transferase da transferase #178 em reações Transferase em Gema de Ovo com alto conteúdo de água.

[000487] A Figura 56 mostra a atividade transferase de uma enzima lipídio acil transferase (#178) como uma função do tempo de reação em reações transferase na gema de ovo com alta concentração de água.

[000488] A Figura 57 e a Figura 58 mostram gráficos que representam o ácido graxo e éster de colesterol como uma função do tempo. Os gráficos representam resultados obtidos para a análise GLC no ensaio para medição de atividade acil transferase usando lecitina e colesterol em um tampão como substrato.

[000489] A Figura 59 mostra uma TLC no solvente I. A gema de ovo tratada com a enzima lipídio acil transferase #138 da *Aeromonas salmonidica* (Faixas nº 1 e 2) ou com uma fosfolipase #2938 (LIPOPAN® F) (Faixa nº 3) ou gema de ovo não tratada (Faixa nº 4).

[000490] A Figura 60 mostra uma TLC no solvente IV. A gema de ovo tratada com a enzima lipídio acil transferase #138 (Faixas nº 1 e 2) ou com fosfolipase #2938 (Faixa nº 3) ou gema de ovo não tratada (Faixa nº 4).

[000491] A Figura 61 mostra a gema de ovo tratada com a enzima lipídio acil transferase #138 (amostras números 1 e 2) e com fosfolipase #2938 (amostra nº 3). Gema de ovo não tratada (amostra nº 4).

[000492] A Figura 62 mostra uma emulsão alimentícia depois de 2 horas a 100°C: 0) Gema de ovo não tratada. 1) Gema de ovo tratada com o lipídio acil transferase #138 durante 210 minutos. 3) Gema de ovo tratada com a fosfolipase controle #2938 durante 210 minutos.

[000493] A Figura 63 mostra placas de TLC mostrando a avaliação da atividade da transferase esterol e glicerol de plantas. PC = fosfatidilcolina, LPC = liso fosfatidilcolina; PE = fosfatidil etanolamina; monogl = monoglicerídeo.

[000494] A Figura 64 mostra uma placa de TLC no solvente I, Amostras de 1 a 6 depois de 24 horas e Amostras de 1 a 4 depois de um tempo de reação de 4 horas. A análise TLC confirma a formação de éster de esterol nas amostras 1, 2, 5 e 6.

[000495] A Figura 65 mostra uma placa de TLC no solvente I onde a atividade transferase de uma acil transferase imobilizada da *Aeromonas salmonicida* foi testada em uma mistura de óleo - com amostras tomadas a 0,5, 1, 3, 6 e 24 h.

[000496] As Figuras 66 e 67 mostram placas de TLC no solvente I e IV. Faixa 1 = lecitina; Faixa 2 = controle, 10 minutos; Faixa 3 = 0,75 PLU, 10 minutos; Faixa 4 = 0,75 PLU, 60 minutos; Faixa 5 = 0,75 PLU, 220 minutos; Faixa 6 = controle, 20 h; Faixa 7 = 0,75 PLU, 20 h; e Faixa 8 = éster de colesterol.

[000497] As Figuras 68 e 69 mostram placas de TLC no solvente IV. Faixa 1 = lecitina; Faixa 2 = controle – 10 minutos; Faixa 3 = 1 PLU, 10 minutos; Faixa 4 = 1 PLU, 60 minutos; Faixa 5 = 1 PLU, 180 minutos; Faixa 6 = 1PLU, 220 minutos; Faixa 7 = 1PLU, 1200 minutos; Faixa 8 = controle, 1200 minutos; Faixa 9 = éster de glicose; Faixa 10 = colesterol; e Faixa 11 = glicose.

[000498] A Figura 70 mostra a reação entre DGDG e glicose quando catalisada por uma enzima lipídio acil transferase.

[000499] A Figura 71 mostra uma sequência de aminoácidos (SEQ ID Nº 36) do constructo de fusão usado para mutagênese do gene da enzima lipídio acil transferase da *Aeromonas hydrophila* do Exemplo 17. Os aminoácidos sublinhados são um peptídeo de sinalização xilanase.

[000500] A Figura 72 mostra uma sequência de nucleotídeos (SEQ ID Nº 45) codificando uma enzima da *Aeromonas hydrophila* incluindo um peptídeo de sinalização xilanase, e;

[000501] A Figura 73 mostra a uma placa de TLC mostrando claramente a formação de um éster de esterol da plantas e um monoglicerídeo. A Faixa 1 está após 1 hora de tempo de reação, a Faixa 2 está após 4 horas de tempo de reação, a Faixa 3 está após 24 horas de tempo de reação, e a Faixa

4 é um esterol da planta.

EXEMPLOS

[000502] Exceto onde esteja declarado a análise TLC foi executada tal como descrito no Exemplo 6 e a análise GLC foi executada tal como descrito no Exemplo 11.

EXEMPLO 1: Clonagem, sequenciamento e expressão heteróloga de uma transferase da *Aeromonas salmonicida subsp. Salmonicida*

Cepas usadas:

[000503] *Aeromonas salmonicida subsp. Salmonicida* (ATCC 14174) foi obtida de ATCC e cultivo noturno a 30°C em meio Luria-Bertani (LB). As células foram centrifugadas e o DNA genômico foi isolado usando os procedimentos para o isolamento de DNA genômico da Qiagen Ltd. Conjunto de DNA genômico em tampão (cat. 19060), protease K (cat. 19131) e RNase A (cat. 19101) foram todos obtidos da Qiagen Ltd. (Boundary court Gatwick Court, West Sussex, RH10 2AX).

[000504] A cepa bacteriana hospedeira BL21(DE3)pLysS (Novagen) foi usada para a produção das enzimas recombinantes da *Aeromonas*. As células competentes da BL21(DE3)pLysS foram usadas como hospedeiras para a transformação com o vetor de expressão petl2-AsalGCAT=pSM. Os transformadores contendo o plasmídio apropriado foram cultivados a 37°C em meio de ágar-ágar de LB contendo 100 µg de ampicilina/ml.

Construção de vetor de expressão petl2-AsalGCAT-pSM:

[000505] Para todas as amplificações de DNA dos genes transferase da *Aeromonas*, o DNA genômico (0,2 - 1 µl) foi usado como padrão e o DNA *pfu* polimerase (2,5 unidades) foi usado com 10 µl de 10x tampão *pfu*, 1 µl de cada “primer” (50 pmol/µl), 200 uM dNTP em um volume total de reação de 100 µl. As reações de PCR foram executadas em um termo ciclador programável que usa as seguintes condições: 95°C durante 30 segundos, 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto e 68°C durante 2 minutos. Uma extensão adicional de 5 minutos a 72°C foi aplicada.

[000506] A amplificação PCR do gene da transferase da *A. salmonicida*

foi realizada em 2 reações PCR separadas. A primeira reação de PCR foi executada usando os pares de “primer”, aslUSNEW(5'AGCATATGAAAA AATGGTTTGT TTGTTTATTG GGG 3' [SEQ ID N° 36]) e asls950new(5'GTG ATG GTG GGC GAG GAA CTC GTA CTG3' [SEQ ID N° 37]). Uma segunda reação de PCR foi executada para incorporar um C-terminal marcado na Histidina usando o produto do PCR da primeira reação e os “primers”: aslUSNEW(5'AGCATATGAAAA AATGGTTTGT TTGTTTATTG GGG 3' [SEQ ID N° 38]) e AHLS1001(5'TTGGATCC GAATTCAT CAATG GTG ATG GTG ATG GTG GGC3' [SEQ ID N° 39]). O produto do PCR da segunda reação foi purificado e digerido com enzimas de restrição NdeI e BamHI. 2 µg de pET 12a DNA vetorial também foram digeridos com enzimas de restrição NdeI e BamHI e tratados com fosfatase. O pet12a tratado com enzima de restrição e o produto do PCR da reação 2 foram purificados e ligados utilização do Kit de Ligação Rápida (Roche, Suíça). A mistura de ligação foi usada para transformar as células TOP10 da *E. coli*.

[000507] Os transformadores foram semeados em placa em meio de ágar-ágar de LB contendo 100 µg/ml de ampicilina.

[000508] O “primer” promotor T7 (5'TAATACGACTCACTATAG3' [SEQ ID N° 40]) e o “primer” terminador T7 (5'CTAGTTATTGCTCAGCGG3' [SEQ ID N° 41]) foram usados para verificar as seqüências e a orientação dos genes da transferase clonados no vetor pET12a. O sequenciamento de DNA foi executado usando um kit de terminadores de ciclode sequenciamento da ABI Prism® BigDye® com 500ng DNA de plasmídeo como padrão e 3,2 pmol do promotor T7 e do terminador de “primers”.

[000509] O constructo mostrado na Figura 35 foi usado para transformar a cepa da bactéria hospedeira competente BL21(DE3)pLysS (Novagen) e transformadores resistentes a ampicilina foram escolhidos e utilizados para a análise de expressão.

A expressão da lipídio acil transferase recombinante da *Aeromonas salmonicida*

[000510] A quantificação da atividade da enzima para a lecitina foi

determinada em extratos de célula usando o de kit de ácidos graxos não esterificados (NEFA) (Roche, Suíça).

[000511] Na Figura 36, a BL21(DE3)pLysS abrigando o vetor de expressão petl2-AsalGCAT=pSM foi cultivado em meio de LB com 100 µg/ml de ampicilina e incubado com agitação a 37°C até que e conseguido OD₆₀₀ = de 0,6 a 1,0. As culturas então são induzidas usando IPTG (0,4 mM) e a incubação foi continuada durante as 3 horas seguintes. Amostras foram retiradas em 0 hora, 1, 2, e 3 horas depois da indução de IPTG. A Atividade de Enzima foi testada usando o kit NEFA e lecitina como substrato.

Otimização de Crescimento da produção de mais enzimas ativas

[000512] A BL21(DE3)pLysS abrigando o vetor de expressão petl2-AsalGCAT=pSM foi cultivada em meio de LB + 100 µg/ml de ampicilina e incubada sob agitação em temperaturas de crescimento diferentes (37°C, 30°C, e 20°C). A ótima condição da produção da enzima ativa lipídio acil transferase se deu quando as culturas foram crescidas a 30°C tal como mostrado na Figura 37.

Purificação parcial da transferase recombinante da *Aeromonas salmonicida*

[000513] A cepa BL21(DE3)pLysS abrigando o vetor de expressão petl2-AsalGCAT=pSM foi cultivada em 37°C e os extratos celulares brutos foram preparados por ação do ultrassom. A enzima recombinante foi também purificada a partir dos extratos celulares brutos preparados por ultrassom que usam o spin kit Ni-NTA da Qiagen. A atividade da fosfolipase foi avaliada usando o kit NEFA e lecitina como substrato. Os extratos celulares brutos de BL21(DE3)pLysS expressando transferase ativa incubada com o substrato lecitina e mistura de reação foram analisados usando cromatografia em camada fina mostrando a presença de produtos de degradação (ver a Figura 38).

Purificação Parcial de transferase recombinante da *Aeromonas salmonicidae*.

[000514] Cepa BL21(DE3)pLysS abrigando o vetor de expressão petl2-

AsalGCAT=pSM foi cultivada em 37°C e os extratos celulares brutos foram preparados por ação do ultrassom. A enzima recombinante foi também purificada dos extratos celulares brutos depois do ultrassom utilizando o Ni-NTA spin kit de Qiagen. A foi testada a atividade de Fosfolipase que usa o kit NEFA e lecitina como substrato (ver a Figura 39).

EXEMPLO 2: Clonagem e Expressão da *Aeromonas hydrophila* transferase em *E. coli*

[000515] *Aeromonas hydrophila* (ATCC #7965) foi obtida do ATCC e cultivadas durante a noite a 30°C em meio Luria-Bertani (LB). As células foram centrifugadas e o DNA genômico foi isolado usando os procedimentos para o isolamento de DNA genômico da Qiagen Ltd. Kit de DNA genômico em tampão (cat. 19060), protease K (cat. 19131) e RNase A (cat. 19101) foram todos obtidos da Qiagen Ltd. (Boundary court Gatwick Court, West Sussex, RH10 2AX).

[000516] A cepa bacteriana hospedeira BL21(DE3)pLysS (Novagen) foi usada para a produção das enzimas recombinantes da *Aeromonas*. As células competentes BL21(DE3)pLysS foram usadas como hospedeiras na transformação com o vetor de expressão petl2a-A.h.GCAT=pSMa. Os transformadores contendo o plasmídio apropriado foram cultivados a 37°C em meio de ágar-ágar de LB contendo 100 µg de ampicilina/ml.

Construção de vetor de expressão petl2a-A.h.GCAT-pSMa:

[000517] Para todas as amplificações de DNA dos genes transferase da *Aeromonas*, o DNA genômico (0,2 - 1 µl) foi usado como padrão e o DNA *pfu* polimerase (2,5 unidades) foi usado com 10 µl de 10x tampão *pfu*, 1 µl de cada “primer” (50 pmol/µl), 200 uMdNTP em um volume total de reação de 100 µl. As reações de PCR foram executadas em um termo ciclador programável que usa as seguintes condições: 95°C durante 30 segundos, 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto e 68°C durante 2 minutos. Uma extensão adicional de 5 minutos a 72°C foi aplicada.

[000518] A amplificação PCR do gene da transferase da *A. hydrophila*(ATCC #7965) foi realizada em 2 reações PCR separadas.

[000519] A primeira reação de PCR foi executada usando os pares de “primer”, AHUS1 (5’GTCATATGAAAAAATGGTTTGTGTGTTTATTGGGATTGGTC3’, SEQ ID N° 42) e ahls950(5’ATGGTGATGGTGGGCGAGGAACCTCGTACTG3’, SEQ ID N° 43).

[000520] Uma segunda reação de PCR foi executada para incorporar um C-terminal marcado na Histidina usando o produto do PCR da primeira reação e os e os pares de “primer”: AHUS1 (5’GTCATATGAAAAAATGGTTTGTGTGTTTATTGGGATTGGTC3’SEQ ID N° 44,) e AHLS1001 (5’TTGGATCCGAATTCATCAATGGTGATGGTGATGGTGGGC3’ SEQ ID N° 45).

[000521] O produto do PCR da segunda reação foi purificado e digerido com enzimas de restrição NdeI e BamHI. 2µg de pET 12a DNA vetorial também foram digeridos com enzimas de restrição NdeI e BamHI e tratados com fosfatase. O pet12a tratado com enzima de restrição e o produto do PCR da reação 2 foram purificados e ligados utilização do Kit de Ligação Rápida (Roche, Suíça). A mistura de ligação foi usada para transformar as células TOP10 da *E. coli*. Os transformadores foram semeados em placa em meio de ágar-ágar de LB contendo 100 µg/ml de ampicilina.

[000522] O “primer” promotor T7 (5’TAATACGACTCACTATAG3’) e o “primer” terminador T7 (5’CTAGTTATTGCTCAGCGG3’) foram usados para verificar as seqüências e a orientação dos genes GCAT clonados no vetor pET12a. O sequenciamento de DNA foi executado usando um kit de terminadores de ciclode sequenciamento da ABI Prism® BigDye® com 500ng DNA de plasmídio como padrão e 3,2 pmol do promotor T7 e do terminador de “primers”.

[000523] O constructo mostrado na Figura 40 foi usado para transformar a cepa da bactéria hospedeira competente BL21(DE3)pLysS (Novagen) e transformadores resistentes a ampicilina foram escolhidos e utilizados para a análise de expressão.

A expressão da *Aeromonas hydrophila* transferase em BL21(DE3)pLysS

[000524] A cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS abrigando o vetor de expressão petl2a-A.h.GCAT=pSMa foi cultivada em meio de LB 100 µg/ml de ampicilina e incubado com agitação a 37°C até ser conseguido OD₆₀₀ = de 0,6 a 1,0. As culturas então são induzidas usando IPTG (0,4 mM) e a incubação foi continuada durante as 3 horas seguintes. Amostras foram coletadas a 0 hora, 1, 2, e 3 horas depois da indução de IPTG. A Atividade de Enzima foi testada usando o kit NEFA e lecitina como substrato (Figura 41).

Otimização de Crescimento da produção de mais enzimas ativas

[000525] A BL21(DE3)pLysS abrigando o vetor de expressão petl2a-A.h.GCAT=pSMa foi cultivada em meio de LB + 100 µg/ml de ampicilina e incubada sob agitação em temperaturas de crescimento diferentes (37°C, 30°C, e 20°C). A ótima condição da produção da enzima ativa lipídio acil transferase se deu quando as culturas foram crescidas a 30°C tal como mostrado na Figura 42.

Purificação parcial de transferase recombinante (GCAT) da *A. hydrophila*

[000526] A cepa BL21(DE3)pLysS abrigando o vetor de expressão petl2a-A.h.GCAT=pSMa foi cultivada em 37°C e os extratos celulares brutos foram preparados por ação do ultrassom. A enzima recombinante foi também purificada dos extratos celulares brutos depois do ultrassom utilizando o Ni-NTA spin kit de Qiagen. A foi testada a atividade de Fosfolipase que usa o kit NEFA e lecitina como substrato (ver a Figura 43).

EXEMPLO 3: A expressão de transferases de *Aeromonas* no *Bacillus subtilis* 163

Construção Plasmídio

[000527] Dois vetores de expressão diferentes do *Bacillus subtilis* (pUB110 e pBE5) foram usados para a expressão heteróloga dos genes da *Aeromonas* no *Bacillus subtilis*. O vetor pUB110 contém o promotor da alfa amylase enquanto o vetor pBE tem o promotor P32 como a região reguladora

da expressão dos genes *Aeromonas* fundidos. No pUB110, o primeiro aminoácido dos genes GCAT maduros da *Aeromonas* foi fundido na estrutura com o último aminoácido da seqüência do peptídio de sinal de xylanase do *Bacillus subtilis* via o sítio de restrição de NheI, criando uns 2 aminoácidos adicionais em frente das proteínas maduras. O pBE5 contém o sinal de seqüenciamento da fusão da cgtase no sítio do NcoI para a secreção da proteína recombinante no filtrado de cultura.

[000528] As reações de PCR foram executadas para se obter a fusão dos genes *Aeromonas* na estrutura em relação ao sinal de seqüenciamento dos vetores pUB110 e pBE5. Os PCRs foram executados usando os seguintes pares de “primer” para o gene da *A. hydrophila*:

Reação de PCR 1: usAHncol
(5'ATGCCATGGCCGACAGCCGTCGCC3', SEQ ID Nº 46) e 1sAH
(5'TTGGATCCGAATTCATCAATGGTGATG3', SEQ ID Nº 47).

Reação de PCR 2: US-AhnheI
(5'TTGCTAGCGCCGACAGCCGTCGCC3', SEQ ID Nº 48) e 1sAH
(5'TTGGATCCGAATTCATCAATGGTGATG3, SEQ ID Nº 49).

[000529] Os PCRs foram executados usando os seguintes pares de “primer” para o gene da *A. salmonicida*:

Reação de PCR 3: US-Asncol
(5'TTGCCATGGCCGACACTCGCCCCGCC3', SEQ ID Nº 50) e 1sAH
(5'TTGGATCCGAATTCATCAATGGTGATG3', SEQ ID Nº 51).

Reação de PCR 4: os US-ASnheI
(5'TTGCTAGCGCCGACACTCGCCCCGCC3', SEQ ID Nº 52) e 1sAH
(5'TTGGATCCGAATTCATCAATGGTGATG3', SEQ ID Nº 53).

[000530] Todos os produtos PCR foram clonados em PCR blunt II (vetor TOPO) e sequenciados com “primers” de sequenciamento reverso e também direto.

[000531] Os clones das reações PCR 1 e 3 foram cortados com NcoI e Bam HI e utilizados como inserções para ligação ao vetor pBE5 cortado com NcoI/BamHI/fosfatase. Os clones das reações PCR 2 e 4 foram cortados com

NheI e Bam HI e utilizados como inserções para ligação ao vetor pUB que foi cortado com NheI/BamHI/fosfatase.

Expressão dos genes da transferase da *Aeromonas* no *Bacillus subtilis* e caracterização da atividade da enzima

[000532] As acil transferases de duas espécies *Aeromonas* foram expressas com sucesso em *E. coli* (resultados acima). Os constructos de fusão genética *Bacillus* pUB110 e pBE5 foram utilizados para transformar o *Bacillus subtilis* e transformadores foram selecionados por semeadura em placas de canamicina. Os transformadores resistentes canamicina isolados e cultivados em meio 2xYT são capazes da expressão heteróloga dos genes *Aeromonas* no *Bacillus*. Os filtrados de cultura possuem atividade digalactosildiacylglicerol (DGDG) galactolipase, além de possuir tanto atividades acil transferase como fosfolipase. A atividade para o digalactosildiacylglicerol (DGDG) foi medida depois de 60 minutos da incubação da cultura sobrenadante com o substrato DGDG de farinha de trigo (obtida na forma sigma) bem como a atividade para a lecitina como mostrado na Figura 44. O *Bacillus* produziu a enzima, depois de uma noite (20-24 horas) até 48 horas de cultivo em meio de cultura, como uma proteína segregada. Em alguns exemplos, a expressão dos genes *Aeromonas* foi mostrada como interferindo na viabilidade de célula e no crescimento de *Bacillus* e de *E. coli*., por isso, é necessário selecionar cuidadosamente cepas de expressão e otimizar as condições de crescimento para assegurar a expressão. Por exemplo, várias cepas do *Bacillus* hospedeiro (B.s163, DB104 e OS 21) foram transformadas com a expressão de vetores por comparação de crescimento. O B.s163 é transformável com 2 genes *Aeromonas* e é capaz de expressar a proteína ativa. O DB104 é transformável com todos os constructos, mas somente a capaz de exprimir a transferase da *A. salmonicida*.

EXEMPLO 4: Fermentação e Purificação de lipídio acil transferases de *Aeromonas* produzido em *E.coli*.

Fermentações de *E. coli*:

Microrganismos

[000533] Foram utilizadas neste estudo duas cepas de *Eschericia coli*,

uma contendo lipídio acil transferase de *Aeromonas hydrophila* (Exemplo 2) e as duas contendo lipídio acil transferases da *Aeromonas salmonicida* (Exemplo 1).

[000534] A cepa de *E. coli* que contém o gene da *A. hydrophila* foi denominada de DIDK0124, e a cepa de *E. coli* que contém o gene da *A. salmonicida* foi denominada de DIDK0125. A fermentação com DIDK0124 foi denominada HYDR00303 e a fermentação com DIDK0125 foi denominada SAL0302. A proteína purificada de HYDR0025 foi denominada REF#138. A proteína purificada de HYDR00303 foi denominada REF#135.

Condições do meio de crescimento da cultura.

LB-agar.

[000535] As placas de LB ágar-ágar foram usadas para manter as cepas contidas: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extrato de levedura, 5 g/l de NaCl, 15 g/l de ágar-ágar, 100 µg/l de ampicilina e 35 mg/l de cloranfenicol. As placas de ágar-ágar foram incubadas a 30°C.

Frascos de agitação LB.

[000536] O meio de LB (50 ml por frasco de agitação) usado para a produção do material inóculo dos cultivos no biorreator contendo: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extrato de levedura, 5 g/l de NaCl, 100 µg/l de ampicilina e 35 mg/l de cloranfenicol. Os frascos de agitação foram inoculados a partir das placas de ágar-ágar de LB, e são incubadas a 30°C e 200 rpm.

Cultivo no Bioreactor.

[000537] Os cultivos no bioreactor foram realizados em um reator com o volume interno de 6 l preenchido com meio até o volume de 4 l, contendo: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extrato de levedura, 5 g/l de NaCl, 8 g/l de KH₂PO₄, 0,9 g/l de MgSO₄.7H₂O, 40 g/l de monohidrato de glicose, 0,4 ml/ADD APT® Foamstop Sin 260 (ADD APT Chemicals AG, Helmond, Países Baixos), 10 mg/l de (NH₄)₂Fe(SO₄)₂.6H₂O, 0,7 mg/l de CuSO₄.5H₂O, 3 mg/l de ZnSO₄.7H₂O, 3 mg/l de MnSO₄H₂O, 10 mg/l de EDTA, 0,1 mg/l de NiSO₄.6H₂O, 0,1 mg/l de CoCl₂, 0,1 mg/l de H₃BO₄, 0,1 mg/l de KI, 0,1 mg/l de Na₂MoO₄.2H₂O, 1 g/l de ampicilina e 35 mg/l de cloranfenicol.

[000538] Os biorreatores foram inoculados com uma quantidade da cultura de LB para assegurar o fim do crescimento depois de aproximadamente 20 horas do cultivo (calculando da taxa de crescimento específica máxima de $0,6 \text{ h}^{-1}$, o OD_{600} do frasco de agitação de LB e o OD_{600} final no bioreactor de aproximadamente 20).

[000539] O SAL0302 foi inoculado com 10 ml da cultura de LB, e HYDR00303 foi inoculado com 4 ml da cultura de LB.

[000540] Os biorreatores foram operados nas seguintes condições: temperatura 30°C , agitação de 800-1000 rpm (dependendo do experimento), aeração 5 l/min, pH 6,9, controle de pH 8,75 % (p/v) NH_3 -água e H_2SO_4 2 M. A indução foi realizada pela adição de isopropil D-tiogalactosídeo a uma concentração final de 0,6 mM, quando 0,4 moles (HYDR00303) e 0,7 moles de CO_2 foram produzidos respectivamente.

Colheita.

[000541] O seguinte procedimento foi usado para a colheita e homogenisation da biomassa:

1) O caldo de fermentação de ambas as fermentações foi centrifugado em $5000 \times g$ e 4°C durante 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. A biomassa foi armazenada em -20°C até o uso. A biomassa foi descongelada e ressuspensa em 500 ml de NaH_2PO_4 de 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, Imidazol de 10 mM e inibidor de protease completo (EDTA-livre) (Roche, Alemanha).

2) A biomassa suspensa foi homogeneizada em 2 kbar e 4°C em uma célula disruptora da Constant Systems Ltd (Warwick, Reino Unido).

3) Os resíduos de célula foram retirados por centrifugação em $10,000 \times g$ e 4°C durante 30 minutos seguidos pela coleta do sobrenadante.

4) O sobrenadante foi clarificado, além disso, por centrifugação em $13.700 \times g$ e 4°C durante 60 minutos, seguidos pela coleta do sobrenadante.

5) O sobrenadante foi filtrado através de $0,2 \mu\text{m}$ filtros Vacu Cap (Pall Life Science, Reino Unido) e o filtrado foi coletado para a purificação cromatográfica imediata.

Purificação de Cromatográfica da Transferase.

[000542] Uma coluna (2,5 x 10 cm) foi empacotada com 50 ml de gel de *Chelating Sepharose ff.* e carregada com sulfato de níquel (segundo o método descrito pelo fabricante, Amersham Biosciences). A coluna foi equilibrada com 200 ml de NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, Imidazole 10 mM. 400 ml da matéria-prima foram aplicados à coluna a uma taxa de fluxo de 5 ml/min. A coluna então foi lavada com NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, Imidazole 10 mM até que a UV₂₈₀ atingisse a linha de base. O GCAT foi então eluído com 40 ml de NaH₂PO₄ de 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM e Imidazole 500 mM.

EXEMPLO 5: Fermentação e Purificação da lipídio acil transferases de *Aeromonas* produzida em *Bacillus subtilis*.

Fermentações

[000543] BAC0318-19, BAC0323-24.

Microrganismo

[000544] Os microrganismos utilizados neste estudo se originam da transformação de uma cepa de *Bacillus subtilis* hospedeiro, #163 com um plasmídio contando o gene que codifica a transferase da *Aeromonas salmonicida* inserido no vetor pUB1100IS. A expressão do gene é controlada por um promotor alfa-amylase e a secreção da transferase é mediada pela sequência de sinal da xylanase do *B. subtilis* (Exemplo 3). As cepas foram denominadas DIDK0138 (fermentação BAC0318-19) e DIDK0153 (fermentação BAC0323-24).

Meio de crescimento e condições de cultura

Meio de pré-cultura

[000545] Um frasco de agitação (500 ml de volume total, com septo) foi adicionado de 100 ml de um meio contendo:

NaCl	5 g/l,
K ₂ HPO ₄	10 g/l,
Farinha de Soja	20 g/l,
Extrato de Levedura, BioSpringer 106	20 g/l,
Antiespuma SIN260	5 ml/l,

pH ajustado para 7,0 antes da autoclavação,

[000546] Depois da autoclavação foram adicionadas 6 ml de uma solução de Nutriose 50 % p/p a cada frasco. Depois da autoclavação também foi acrescentada canamicina em uma concentração de 50 mg/l.

Inoculação

[000547] Um frasco agitado com pré-cultura foi inoculado diretamente com a cultura congelada de um estoque de glicerol a 25 % (p/v). O frasco de agitação foi incubado a 33°C e 175 rpm durante um tempo de aproximadamente 16 horas, durante o qual 50 ml foram utilizados para inocular o fermentador.

Fermentações

[000548] As fermentações foram realizadas em fermentadores de 6 litros de construção própria.

[000549] O meio para a batelada (3 litros) continha:

Solução saturada de cereais (50 % dw)	40 g/l
Extrato de Levedura BioSpringer 153 (50% dw)	10 g/l
NaCl	5 g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,25 g/l
Mn(NO ₃) ₂ .H ₂ O	0,2 g/l
Antiespuma SIN260	1 ml/l
Canamicina (filtro esterilizado do fermentador depois da autoclave)	50 mg/l

[000550] A alimentação continha:

monohidrato de glicose	540 g/kg
MgSO ₄ .7H ₂ O	4,8 g/kg
Anti espumante SIN260	1 ml/l

[000551] Extrato de Levedura BioSpringer 153 (50 % dw) 150 g/kg (autoclavado separadamente)

[000552] A alimentação na fermentação BAC0318 e BAC0323 foi iniciada baseada no acúmulo de CO₂, segundo as equações abaixo:

$$\text{Alimentação} - \text{Fluxo [g/h]} = 0 \quad ; \quad \text{AcCO}_2 < 0,15$$

Alimentação – Fluxo [g/h] = $2,85 + t \cdot 1,54$; $\text{AcCO}_2 \geq 0,15$ e $t < 12$.

Alimentação – Fluxo [g/h] = 21,3; $t > 12$.

t: tempo (horas) do ponto quando o CO_2 acumulado (AcCO_2) atingiu 0,15 moles.

[000553] A alimentação na fermentação BAC0319 e BAC0324 foi iniciada baseada no acúmulo de CO_2 , segundo as equações abaixo:

Alimentação – Fluxo [g/h] = 0 ; $\text{AcCO}_2 < 0,15$

Alimentação – Fluxo [g/h] = $2,0 + t \cdot 1,08$; $\text{AcCO}_2 \geq 0,15$ e $t < 12$.

Alimentação – Fluxo [g/h] = 15; $t > 12$.

t: tempo (horas) do ponto quando o CO_2 acumulado (AcCO_2) atingiu 0,15 moles.

[000554] O pH foi controlado em 7.0 pela adição de 12,5 % (p/v) NH_3 -água ou ácido fosfórico 2M.

[000555] A aeração foi 3 l/min correspondente a 1 vvm.

[000556] A temperatura foi de 33°C.

[000557] O fermentador foi equipado com dois impelidores de 8 cm colocados com uma distância de 10 cm.

Colheita

[000558] A biomassa foi retirada por centrifugação a 16.000 x g durante 10 minutos na temperatura ambiente. O sobrenadante foi esterilizado por filtração, e o filtrado foi usado para purificação e testes de aplicação.

EXEMPLO 6: Testes de aplicação em gema de ovo.

[000559] Nos experimentos seguintes a transferase isolada de *Aeromonas salmonicida* expressa em *E-coli* foi testada na gema de ovo sozinha e na gema de ovo onde tenha sido acrescentado um esteroide de planta.

Material

[000560] Transferase da *Aeromonas salmonicida* REF#138.

[000561] Gema de ovo: de ovo fresco (ovos de galinhas).

[000562] Esteroide de planta: β -sitosterol, Sigma S 5753.

[000563] Placas de TLC: placas de Sílica Merk, nº1.05715.0001.

Análise por TLC.

[000564] A placa de TLC foi ativada em um armário aquecido (110°C) por 1/2 h.

[000565] 100 ml de solvente para eluição foram colocados em uma câmara de cromatografia com tampa. As paredes da câmara foram cobertas com papel de filtro (Whatman 2) de modo a saturar a câmara com o vapor do solvente.

[000566] A placa de TLC foi colocada em uma armação e a amostra foi aplicada a uma distância de 2 cm do fundo da placa. A placa de TLC foi então colocada na câmara TLC com o solvente de eluição. Quando o solvente de eluição chegou a 14 cm do fundo da placa, a placa de TLC foi retirada e seca sobre um fundo escuro e então colocada em um armário aquecido a 110°C durante 10 minutos.

[000567] A TLC-placa então foi imersa no reagente de desenvolvimento, e seca no armário aquecido a 110°C durante 15 minutos.

Solvente de desenvolvimento:

[000568] Número IV: Clorofórmio:Metanol:H₂O (65:25:4).

[000569] Número I: P-éter:MTBE:ácido acético (60:40:1).

[000570] Tampão de desenvolvimento (tampão Vanadato):

[000571] 32 g Na₂CO₃ adicionados de 300 ml H₂O (1M)

[000572] 18,2 g pentóxido de vanádio (V₅O₅) são acrescentados e dissolvidos durante o aquecimento lento.

[000573] A solução é esfriada ao ambiente.

[000574] Cuidadosamente são acrescentados 460 ml de H₂SO₄ de 2,5 M. (460 ml H₂O 61 ml H₂SO₄)

[000575] Água é acrescentada até 1000 ml.

Atividade de Fosfolipase.

[000576] Substrato:

[000577] 0,6 % L- α -Fosfatidilcolina de Planta a 95 % (Avanti # 441601) + 0,4 % de Tritão-X 100 (Sigma X-100) + 5 mM de CaCl₂ é dissolvido em 0,05 M de HEPES em tampão de pH 7.

Procedimento.

[000578] 400 µl de substrato foram acrescentados a um tubo Eppendorf de 1,5 ml e colocados em um misturador térmico Eppendorf a 30°C durante 5 minutos.

[000579] No tempo T = 0, foi acrescentado 50 µl da solução de enzima. Também foi analisado um branco com a água em vez da enzima.

[000580] A amostra foi misturada a 1000 rpm em um misturador térmico Eppendorf a 30°C durante 10 minutos.

[000581] No tempo T = 10 minutos, o tubo Eppendorf foi colocado em outro misturador térmico a 99°C durante 10 minutos para parar a reação.

[000582] O ácido graxo livre nas amostras foi analisado usando o kit NEFA da WAKO GmbH.

[000583] A atividade de enzima PLU-7 pH 7 foi calculada na forma de micro mol de ácido graxo produzido por minuto nas condições de ensaio.

Extração de lipídio.

[000584] 1 g de gema de ovo e 7,5 ml Clorofórmio:Metanol 2:1 foram misturados em um Whirley e centrifugados em 750 x g durante 10 minutos.

[000585] 3 ml da fase clorofórmio foram isolados e usados para a análise de lipídio.

Resultados:

[000586] A transferase (REF#138), da *Aeromonas salmonicida* expressa em *E-coli* foi analisada para a atividade fosfolipase como descrito anteriormente, e também foi testada na gema de ovo com, e sem, β-sitosterol. A amostra foi agitada com um agitador magnético durante a reação. O planejamento do experimento é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1:

Teste	Tempo de reação a 35 °C	Gema de ovo	Sitosterol	Transferase #138
Nº	Minutos	Gramas	Mg	Unidades
1	30	1	40	
2	30	1	40	0,75 PLU

3	30	1	80	0,75 PLU
4	120	1	40	0,75 PLU
5	120	1	80	0,75 PLU
6	300	1	40	0,75 PLU
8	300	1	40	

[000587] A reação foi parada acrescentando 7,5 ml Clorofórmio: Metanol (2:1) e misturando em um misturador Whirley durante 30 segundos. A fase de clorofórmio foi isolada por centrifugação e 2 µl da fase de clorofórmio foi transferido a uma placa de sílica TLC pré-ativada e eluída com o solvente de desenvolvimento Nº I, e outra placa TLC eluída com o solvente de desenvolvimento Nº IV.

[000588] Os resultados da análise TLC são mostrados nas Figuras 45 e 46.

[000589] A reação de Transferase com uma transferase de *Aeromonas salmonicida* na gema de ovo onde foi acrescentado esterol de planta mostrou que a enzima transfere o ácido graxo da lecitina na gema de ovo para o colesterol durante a formação de éster de colesterol. O cromatograma por TLC também indicou que parte do esterol acrescentado à gema de ovo foi transferido para o éster de esterol.

[000590] A quantidade de éster de esterol em relação à quantidade de colesterol que éster formado durante a reação pode ser analisada por HPLC ou GLC.

[000591] É conhecido que os ésteres de esteróis de plantas reduzem a absorção de colesterol no intestino. Também é indicado na literatura que os ésteres de colesterol são menos absorvidos do que o colesterol livre no intestino. Quando uma transferase e um esterol de planta são acrescentados à gema de ovo é obtido um produto que causa a redução da absorção do colesterol, e ao mesmo tempo a lisolecitina é produzida, o que melhora as propriedades de emulsificação da gema de ovo. Uma vantagem adicional de acrescentar transferase e esterol da planta à gema de ovo consiste em que o

éster do esteroide de planta é ingerido em conjunto com o colesterol natural disponível, o que ocasionará o esperado efeito de mais alta redução da absorção de colesterol.

EXEMPLO 7: Modificação de gema de ovo por lipídio acil transferase da *Aeromonas salmonicida*.

[000592] De acordo com a presente invenção é mostrado agora isto é possível produzir a lisolecitina da gema de ovo sem formação substancial de ácido graxo livre pelo uso de uma transferase.

[000593] A lecitina presente na gema de ovo é um emulsificante importante da produção da maionese com a limitação de que a maionese não é estável ao calor. Por isso, foi conhecido durante vários anos o uso de uma fosfolipase do pâncreas para modificar a lecitina da gema de ovo para lisolecitina, que é um emulsificante mais eficiente. O uso da enzima modificada da gema de ovo para a produção de maionese contribuiu para uma melhoria em relação à estabilidade da maionese ao calor durante o processo de pasteurização. Uma limitação da utilização da fosfolipase do pâncreas na gema de ovo é que a quantidade de ácido graxo livre também aumenta, o que contribui para uma estabilidade reduzida contra a oxidação porque os ácidos graxos livres são mais propensos à oxidação do que éster correspondente. Os ácidos graxos livres também podem contribuir para um gosto rançoso.

[000594] A transferase da *Aeromonas salmonicida* foi expressa com sucesso no *B. subtilis* e fermentou em escala de laboratório, tal como descrito no Exemplo 5, foi purificada por cromatografia líquida e usada para modificar lipídios da gema do ovo. A enzima modificada gema de ovo foi usada para produzir uma maionese estável ao calor.

[000595] O transferase da *A. salmonicida* pode ser usada para produzir lisolecitina e éster de colesterol na gema de ovo sem a produção de quantidades significantes de ácidos graxos livres. Isto é sem aumentar ou substancialmente aumentar os ácidos graxos livres no gênero alimentício.

[000596] A enzima modificada da gema de ovo produzida por transferase mostrou propriedades de emulsificação melhoradas e pode ser

usada para fabricação de maionese estável o calor.

[000597] Esta enzima foi altamente funcional na modificação da gema de ovo catalisando a reação de transferência de lipídio entre a lecitina e o colesterol como na Figura 47.

[000598] Este estudo, além disso, investigou o uso de transferase da modificação da gema de ovo e o uso da gema de ovo modificada na produção de maionese estável o calor.

[000599] Este exemplo descreve a fermentação, o isolamento, e a aplicação de transferase em gemas de ovos bem como a aplicação da gema de ovo modificada por enzima na maionese. O exemplo é dividido em duas partes:

A. Aplicação de Transferase em Gema de Ovo.

B. Teste da gema de ovo modificada por enzima na maionese.

EXPERIMENTO

A. Aplicação

Enzima e substrato

[000600] Transferase #78-9 de *A. salmonicida*, purificação 2554-100 C73,15 PLU-7/ml.

[000601] Transferase #179 de *A. salmonicida*, 18,5 PLU-7/ml.

[000602] Fosfolipase A1 LECITASE® Fidel Ultra (Novozymes A/S, Dinamarca).

[000603] Gema de ovo: a gema de ovo líquida com 8 % de sal, SANOVA FOODS, DK.

[000604] Análise TLC executada como descrito anteriormente (ver Exemplo 6).

[000605] Atividade de Fosfolipase: Ver exemplos anteriores.

Extração de lipídio.

[000606] 1 g de gema de ovo e 7,5 ml Clorofórmio:Metanol 2:1 foram misturados em um misturador Whirley durante 30 segundos e centrifugados a 750 x g durante 10 minutos.

[000607] 4 ml da fase de clorofórmio foram isolados e utilizados para

análise adicional de lipídio.

Teste de estabilidade à oxidação.

[000608] O teste de estabilidade de oxidação da maionese foi realizado em um equipamento ML OXIPRESS onde a amostra é intensamente oxidada por meio de calor sob pressão em uma atmosfera de oxigênio.

[000609] Depois de certo tempo, chamado de período de indução (IP), a oxidação da amostra causa certo consumo de oxigênio, que é registrado como a modificação de pressão de um leitor de pressão. Um maior período de indução indica uma melhor estabilidade à oxidação.

Procedimento.

[000610] 5 g de maionese são colocados em um reservatório de vidro e o reservatório de vidro é fechado com um medidor de pressão. O reservatório é cheio com oxigênio a uma pressão de 5 bares. A válvula é aberta para esvaziar o reservatório. Este procedimento é repetido duas vezes e a amostra em uma atmosfera de oxigênio de 5 bares é colocada a 80°C. É medida da pressão do oxigênio como uma função do tempo e o período de indução (IP) calculado em horas.

Resultados.

[000611] Transferases purificadas de *Aeromonas salmonicida*, amostras nº #179 e #178-9 foram utilizadas para tratar a gema de ovo tal como projetado na Tabela 2. O teste inicial mostrou que GCAT transferase deve ser acrescentada com fosfolipase (PLU) de muito mais baixa atividade, do que uma fosfolipase comercial. Isto é explicado pelo fato de que a GCAT é uma transferase e por isso tem atividade hidrolítica muito mais baixa do que uma fosfolipase normal.

Tabela 2:

	Gema de ovo	2344-44	Transferase	Lecitase	Agua	
	Sanofo	C89 18,5	#178-9	ultra		
	8% de sal	PLU-7/ml		#3108		

Nº	Gema de ovo	Transferase #179	18,5 PLU-7/ml	1500 PLU-7/ml		
	g	g	g	ml	g	PLU-7/ml
6	120	2,00			8,00	0,13
7	120		10		0	1,25
8	120			1,86	8,14	23,25
9	120				10	0

[000612] As reações enzimáticas foram conduzidas pesando a gema de ovo e a enzima em um beaker grande. As amostras foram colocadas em um gabinete de aquecimento a 37°C durante agitação lenta. Depois do tempo de reação de 1,2 a 4 horas uma amostra foi retirada para a análise em TLC. Depois de um tempo de reação de 4 horas o produto foi armazenado a 5°C e usado para experimentos com maionese.

[000613] As análises de TLC dos lipídios extraídos da gema de ovo tratada de enzima são mostradas na Figura 48.

[000614] A análise TLC na Figura 48 mostra um claro efeito hidrolítico da fosfolipase #3108 nos triglicerídeos durante a formação de ácidos graxos livres, bem como alguns mono- e diglicerídeos. A Fosfolipase #3108 parece não ter nenhum efeito sobre o colesterol. Ambas amostras de transferase claramente contribuem para a formação de éster de colesterol simultaneamente com a redução do conteúdo de colesterol.

D. Gema de ovo modificada por enzima usada na maionese.

[000615] Para investigar o efeito da modificação das amostras de gema de ovo mencionadas na Tabela 2, as provas de aplicação foram executadas na maionese com um conteúdo de gordura de 50 %. Uma maionese que contém a gema de ovo não tratada também foi produzida.

[000616] O objetivo da investigação foi determinar o impacto sobre as propriedades de emulsificação da gema de ovo enzimaticamente modificada e

o impacto na estabilidade ao calor. Todas as amostras de maionese contiveram o mesmo nível de óleo e foram emulsionadas só com a gema de ovo.

[000617] As amostras de maionese foram todas produzidas usando um misturador Koruma (Disho V60/10) e foram aquecidas durante o processamento a 95°C durante 5 minutos.

[000618] As amostras das maioneses (Figura 49) produzidas pela gema de ovo tratada de enzima mostraram um outro aspecto e permaneceram homogêneas sem separação de óleo. A amostra de controle separou-se em uma fase de óleo e uma fase de água.

[000619] O tamanho de partícula das gotículas de óleo nas amostras de maionese com a gema de ovo tratadas por enzima foi medido em um Malvern Mastersizer. A amostra foi misturada com 0,1 % SDS em tampão fosfato de 0,1 M e pH 7 antes da medição. A leitura foi o tamanho médio de todas as partículas como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3:

Experimento	Enzima	Tamanho médio partícula, µm
6	Transferase #179, 0,31 PLU-7/g	12,9
7	Transferase #178-9, 1,25 PLU-7/g	7,2
8	#3108, Lecitase Ultra, 23 PLU-7/g	5,2

[000620] Os resultados da medição de tamanho de partícula mostram claramente o efeito da dosagem aumentada de transferase da *A. salmonicida*. Com a alta dosagem de transferase o tamanho de partícula está próximo ao da maionese produzida por Lecitase Ultra. Deve, contudo se ter em mente que a Lecitase Ultra produz muitos ácidos graxos, que poderiam contribuir para uma distribuição de partícula mais perfeita.

[000621] O tamanho de gotícula de óleo da maionese preparada com a

enzima é significativamente menor do que o tamanho de gotícula de óleo da maionese preparada sem a enzima (isto é, a maionese de controle).

Estabilidade de oxidação.

[000622] A estabilidade de oxidação das amostras 7 e 8 da maionese foi analisada em um ML OXIPRES com resultados mostrados na Tabela 4.

Tabela 4:

Amostra	Período de indução	Período de indução
	1. Determinação das horas	2. Determinação das horas
7	37,44	38,08
8	35,68	35,52

[000623] A medição da estabilidade de oxidação deu uma diferença significativamente clara na estabilidade à oxidação. A maionese a gema de ovo tratada com transferase 179-8 teve uma estabilidade à oxidação significante melhor do que a maionese com a gema de ovo tratada com Lecitase Ultra. Isto poderia ser explicado pelo fato que Lecitase Ultra produzir mais ácidos graxos livres que são mais propensos à oxidação que o correspondente éster do ácido graxo.

[000624] Uma amostra das gemas de ovos usadas para a produção de maionese foi extraída com o clorofórmio, e os lipídios da gema de ovo foram analisados por GLC com os resultados mostrados na Tabela 5.

Tabela 5:

Experimento	Enzima	Ácido graxo	Colesterol	Éster do colesterol	Triglicerídeos
6	Transferase #179	0,96	0,94	0,49	23,95
7	Transferase #178-9	1,84	0,60	1,06	24,54
8	#3108, Lecitase	14,05	1,16	0,12	2,45

	Ultra				
9	Controle	0,48	1,16	0,13	22,87

[000625] Os resultados da GLC na Tabela 5 confirmam os resultados da análise de TLC de que a Lecitase Ultra produz uma quantidade muito alta de ácidos graxos livres e uma grande parte do triglicerídeo é hidrolisado. Por outro lado a transferase produz somente uma quantidade modesta de ácidos graxos livres e nenhum triglicerídeo é hidrolisado. Também é claramente mostrado que a transferase produz o éster do colesterol a partir do colesterol.

[000626] Os resultados indicam que a quantidade de PC na maionese da “enzima tratada” é reduzida comparando com a maionese de controle, enquanto a quantidade de LPC é o aumentada na maionese tratada pela enzima comparando com a maionese de controle.

[000627] O aumento na quantidade de LPC pode explicar bem as melhoradas propriedades de emulsificação da maionese tratada por enzima comparando com a maionese de controle. O HPLC e as análises de GLC também indicam um nível mais baixo de colesterol livre na maionese tratada por enzima quando comparado com a maionese de controle, provavelmente devido ao colesterol que é usado como uma molécula receptora na reação transferase resultando no aumento da quantidade de ésteres de colesterol na maionese tratada por enzima quando comparada com a maionese de controle. Além disso, os resultados indicam que a quantidade de ácidos graxos livres não aumenta significativamente quando a gema de ovo é tratada com aa transferase. Os resultados, além disso, indicam que a quantidade de ácidos graxos livres produzidos no gênero alimentício tratados com a enzima lipídio acil transferase é significativamente mais baixa do que no gênero alimentício tratados com a fosfolipase de controle, isto é verdadeiro mesmo se a quantidade de lisolecitina formada no gênero alimentício for a mesma.

EXEMPLO 8: Efeito de *Aeromonas salmonicida* transferase em bolos.

[000628] O efeito da GCAT acil transferase a partir da *Aeromonas*

salmonicida é testado em uma receita de bolo. A enzima é testada sozinha e em combinação com outras enzimas lipolíticas. As enzimas são acrescentadas a alguns ingredientes do bolo ou acrescentadas juntamente com outros ingredientes do bolo antes de misturar a massa.

[000629] Os resultados preliminares mostram que a acil transferase combinada com uma enzima de hidrólise de aumenta o volume do bolo e melhora a estrutura da massa cozida quando comparada com o controle.

[000630] Nos experimentos seguintes uma transferase da *A. salmonicida* e suas variantes são testadas sozinhas ou em combinação com enzimas de hidrólise de triglicerídeos. Essas enzimas são ativas nos componentes lipídicos do ovo e suas reduções, bem como dos carboidratos, proteína, glicerol e colesterol (no ovo), são parte da receita do bolo.

Materiais e métodos.

Enzimas:

#179, Acil transferase da *Aeromonas salmonicida*.

Grindamyl EXEL 16, Lipase da *Thermomyces lanuginisus*.

Receita de Bolo:

Ingredientes	Porcentagem	Gramas
Açúcar 35/20	20,37	204
Farinha de bolo, Albatros	18,11	181
Amido de trigo	5,21	52
Farinha de cozimento	0,36	4
Ovo inteiro líquido pasteurizado	22,63	226
Gordura para bolo Vegao (Aarhus United)	18,11	181
Só de leite em pó	0,64	7
Xarope de glicose, 75 % 42 DE	4,53	45
Glicerol	1,36	14

Sal	0,32	3
óleo de sementes	6,34	63
Sorbato de potássio	0,18	1,8

Equipamento:

[000631] Misturador: Hobart N50 com espátula

[000632] Forno: forno para bolos Simon.

[000633] Procedimento:

[000634] Todos os ingredientes devem estar à temperatura ambiente.

1. Bata o açúcar e a gordura por três minutos, começando na segunda velocidade e mova para a terceira a velocidade dentro de 30 segundos.

2. Acrescente os demais ingredientes, começando na primeira velocidade e mova para a segunda a velocidade dentro de 30 segundos, para um tempo de mistura total de cinco minutos.

3. Meça o volume da massa batida em 1 xícara de 1 dl.

4. As formas de bolo devem estar untadas e revestidas com papel.

5. Pese 2 x 350 g da massa de bolo dentro das formas.

6. Espalhe a massa uniformemente com uma espátula.

7. Antes de levar ao forno, despeje um fio de óleo no topo da massa do bolo (longitudinalmente no meio - para fazer o bolo estalar ao meio).

8. Asse por 50 minutos a 180°C.

9. Depois do cozimento retire as formas no forno, e vire-as sobre uma mesa antes de desenformar o bolo.

10. Retire o papel dos bolos e vire-os do para cima.

11. Os bolos são esfriados em uma travessa por 60 minutos antes da pesagem da medição do volume.

Observações:

[000635] As enzimas usadas são acrescentadas no início da mistura ou são acrescentadas a alguns ingredientes do bolo antes de serem acrescentados a outros ingredientes de bolo.

[000636] As enzimas só são ativas durante a mistura ou a reação de componentes de bolo, e as enzimas estão inativadas durante o cozimento do

bolo.

Resultados.

[000637] Os experimentos seguintes foram conduzidos tal como mostrado na seguinte Tabela:

		1	2	3	4
Ovo inteiro	G	250	250	250	250
Xarope de Glicose, 75 % DE 42	G	10	10	10	10
#179 acil transferase, 26 PLU/ml	M1	25		25	
Grindamyl EXEL 16	Mg		37,5	37,5	
Água					25

[000638] O xarope de Glicose e a enzima reagem durante 30 minutos a 37°C e um pouco depois que os ovos são usados para produzir o bolo segundo a receita acima mencionada.

[000639] Os resultados preliminares mostram que uma combinação de acil transferase com uma lipase de hidrólise de triglicerídeo do *Thermomyces lanuginosus* melhora o volume do bolo, e também a estrutura da massa, a qualidade do sabor e a aparência são melhoradas comparada com um controle de água. Os resultados preliminares indicam no caso de bolos pode ser preferível usar uma combinação da enzima lipídio acil transferase e uma lipase.

EXEMPLO 9: o objetivo desses experimentos foi testar um transferase da *A. hydrophila* expressa em *E. coli*.

[000640] A reação transferase de *A. hydrophila* #135 (0,5 NEFA-PLU/ml) foi testada na gema de ovo. Os ajustes experimentais são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6:

	Tempo de reação	Gema de ovo	Concentração #135
Número	Minutos	Gramas	Unidades, PLU-NEFA
1	30	1	0,000

	Tempo de reação	Gema de ovo	Concentração #135
Número	Minutos	Gramas	Unidades, PLU-NEFA
2	30	2	0,100
3	60	2	0,100
4	150	2	0,100
5	240	2	0,100
6	1560	2	0,100
7	1560	1	0,000

[000641] As gemas de ovo foram aquecidas a 37°C e a enzima acrescentada. Depois de tempo de reação foram adicionados 7 ml CHCl₃:Metanol 2:1 e misturou-se em um Whirley por 30 segundos.

[000642] A amostra foi trifugada a 800 x g durante 10 minutos e a fase solvente inferior foi isolada. 2 µl desta amostra foram aplicados para uma placa de Sílica TLC e eluída no solvente de eluição IV. Os resultados da análise TLC são mostrados nas Figuras 50 e 51.

[000643] Os métodos e os materiais mencionados neste Exemplo estão os detalhados em Exemplos em cima.

[000644] As amostras deste experimento também foram analisadas por GLC como derivados de TMS. Os resultados da análise GLC são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7: Análise GLC dos lipídios da gema do ovo.

Nº	Reação	Transferase conc. #135			
	Tempo	Unidades/g de gema	Ácido graxo livre	Colesterol	Éster de colesterol
	Minuto		%	%	%
7	Controle	0	0,25	2,88	0,34
3	600	0,025	0,25	2,68	0,56

4	150	0,025	0,29	1,85	1,72
5	240	0,025	0,53	1,42	3,54
6	1560	0,025	0,95	0,3	4,43

[000645] Da análise GLC do ácido graxo livre, colesterol e éster do colesterol é possível calcular a concentração molar de cada componente e calcular o % de atividade de transferase tal como mostrado na Tabela 7.

Cálculo do percentual de atividade da transferase

[000646] Dos resultados são calculados o aumento no ácido graxo livre, e ésteres de esterol.

[000647] Δ % de ácido graxo = % Acido graxo (enzima) - % ácido graxo (controle).

[000648] Δ % éster de esterol = % éster esterol/estanol (enzima) - % éster esterol/estanol (controle).

[000649] A atividade de transferase é calculada como o % do total de atividade enzimática:

% de atividade transferase =

$$\frac{(\Delta \% \text{ éster de esterol} / (\text{Mv éster de esterol}) \times 100}{\Delta \% \text{ éster de esterol} / (\text{Mv éster de esterol}) + \Delta \% \text{ de ácido graxo} / (\text{Mv ácido graxo})}$$

Wenders .

onde:

Mv éster de esterol = peso molecular médio dos ésteres de esterol.

Mv ácido graxo = peso molecular médio dos ácidos graxos.

Tabela 8: Atividade da transferase da A.hydrophyla #135 na gema de ovo.

Nº	Reação	Conc. da transferase #135				
	Tempo	Unidades / grama de	ácido graxo	Colesterol	Éster de colesterol	Atividade transferase

		gema de ovo	livre			
	Minuto		mM	mM	mM	%
7	Controle	0	8,9	74,5	5,3	-
3	60	0,05	8,9	69,3	8,7	100
4	150	0,05	10,4	47,8	26,5	93
5	240	0,05	18,9	36,7	54,6	77
6	1560	0,05	33,9	7,8	68,4	48

[000650] Tanto a análise TLC como a GLC confirmam que inicialmente a reação transferase da *A. hydrophila* #135 é a reação dominante. Depois de um tempo de reação de 150 minutos ocorre um pouco de atividade hidrolítica. Depois de 1560 minutos a reação transferase e a reação hidrolítica atingem em quase o mesmo nível. Os resultados também indicam que enquanto o colesterol de molécula receptora está disponível é a reação transferase que domina. Quando a concentração de colesterol diminui a atividade hidrolítica fica mais dominante.

EXEMPLO 10: Ensaio para medição da atividade da transferase usando gema de ovo como substrato, daqui por diante referido como “Ensaio da Gema do Ovo”.

[000651] Uma enzima lipídio acil transferase foi isolada do *Aeromonas salmonicida* e expressa no *Bacillus subtilis*. O objetivo deste trabalho é desenvolver um método analítico, que seja capaz de medir tanto a atividade da transferase como a atividade hidrolítica de enzimas e dessas análises ser possível definir tanto a atividade da transferase como a atividade hidrolítica de enzimas que usam um substrato que contenha lecitina e colesterol.

[000652] Neste trabalho a gema de ovo foi usada como substrato para o ensaio de enzima porque a gema de ovo contém tanto lecitina como o colesterol e se conhece que transferases e fosfolipases trabalham muito bem neste substrato.

[000653] Nesse trabalho foi utilizada gema de ovo como substrato para o ensaio enzimático no porque a gema de ovo contém tanto lecitina quanto ao

colesterol e sabe-se que tanto as transferases quanto as fosfolipases trabalham muito bem neste substrato.

[000654] O desconto de se estar usando gema de ovo consiste em que este substrato é uma mistura complexa de água, lipídios, e proteína. Os componentes lipídio incluem glicerídeos, 66,2 %; fosfolipídios, 29,6 %; e colesterol, 4,2 %. Os fosfolipídios compõem-se de 73 % lecitina, 15 % cefalin, e 12 % outros fosfolipídios. Dos ácidos graxos, 33 % são saturados e 67 % insaturados, inclusive 42 % de ácido oleico e 7 % de ácido linoleico (ref. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Inc.)

[000655] Algumas variações na composição de gema de ovo poderiam ser esperadas. Na literatura (*Biochimica et Biophysica Acta*, 1124 (1992) 205-222), contudo é mencionado que “A gema de ovo madura da galinha doméstica possui composições notavelmente constantes de lipoproteína apesar das muitas variações das condições dietéticas e ambientais”, e, além disso, é citado: “Com isso, a gema de ovo continua fornecendo um gênero alimentício de composição quase constante, que serve para manter as suas propriedades químicas e físico-químicas e sua utilização confiável na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica”.

[000656] Esta referência indica que a composição de gema de ovo é muito constante e, por isso, foi decidido usar a gema de ovos de galinhas como substrato para o Ensaio de Gema de Ovo.

[000657] A quantificação de produtos de reação de lipídio do tratamento enzimático da gema de ovo foi feita pela extração de lipídios do substrato seguido pela análise GLC dos componentes do lipídio.

Procedimento.

Materiais.

Gema de ovo: gema de ovo líquida pasteurizada da Danaeg Products A/S, DK-4000 Roskilde.

Tampão HEPES do 21 Sigma. Cat. H3375

Clorofórmio, grau Analítico.

Enzimas.

Lipídio acil transferase purificada de *A. salmonicida* #178-9.

Lipase de *Thermomyces lanuginosus*. GRINDAMYL EXEL 16, item nº 147060 (Controle).

Ensaio de Enzima com substrato de gema de ovo.

[000658] São pesados 5 g de gema de ovo líquida em um frasco de vidro Wheaton de 20 ml e aquecidos a 35°C. Foi adicionado 0,25 ml da solução de enzima e iniciado o cronômetro.

[000659] Regularmente foram transferidas amostras de 0,5 g a um o frasco de 10 ml de vidro Dram.

[000660] São adicionadas 20 µl de HCl 4 M, para parar a reação de enzima e acidificar o sabão de ácido graxo.

[000661] São adicionadas 3 ml de clorofórmio e a amostra é agitada no misturador Whirley por 30 segundos.

[000662] A amostra foi centrifugada em 3000 g durante 10 minutos e 0,8 ml da fase de clorofórmio foi transferido a um vidro de Dram recoberto. O clorofórmio foi evaporado em 60°C sob um fluxo de nitrogênio. O vidro dram foi novamente pesado.

[000663] Os lipídios isolados foram analisados por GLC e TLC.

[000664] Proceda-se a Análise TLC, tal como aqui descrita.

[000665] Proceda-se a Análise GLC, tal como aqui descrita.

Resultados

[000666] Para o Ensaio de Gema de Ovo que usa gema de ovo como substrato foi conduzido o experimento mostrado na Tabela 9.

Tabela 9:

		1	2	3
Gema de ovo, líquida	gramas	5	5	5
Transferase # 178-9,32 PLU-7/ml*	ml			0,25
T. lanuginosus lipase, 200 LIPU/ml	ml		0,25	
Água	ml	0,25		

[000667] Amostra de 0,5 g foi retirada após 15, 30, 60, 120 e 1080 minutos, e o lipídio isolado pela extração por solvente. Os lipídios foram analisados por TLC utilizando os solventes I e IV respectivamente. Uma imagem da placa de TLC é mostrada na Figura 52.

[000668] A análise TLC claramente indica a atividade de transferase #178-9 da *A. salmonicida* (amostra 3). Isto pode ser visto na redução no PC e PE de fosfolipídios. Os resultados também indicam que a quantidade de lisolecitina LPC não é tão alta como esperado. Isto poderia indicar a atividade hidrolítica na lisolecitina ou também poderia ser causado pela extração insuficiente porque lisolecitina é muito polar e por isso pode ficar parcialmente distribuída na fase aquosa.

[000669] Os lipídios isolados pela extração com solvente também foram analisados por GLC para quantificar a quantidade de ácido graxo livre, colesterol e éster de colesterol. Os resultados de GLC são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: Análise de GLC do lipídio da enzima tratada a gema de ovo. Os resultados estão em % baseado no conteúdo de lipídio.

			15	30	60	120	1080
			Min	Min	Min	Min	Min
Ácidos graxos livres	Controle	1	0,328	0,304	0,332	0,333	0,369
	<i>T. lanuginosus</i>	2	0,391	0,376	0,459	0,627	22,909
	<i>A. salmonicida</i> #178-9	3	1,007	1,668	4,013	6,761	15,098
Colesterol	Controle	1	3,075	2,968	3,103	3,056	3,099
	<i>T. lanuginosus</i>	2	3,130	3,032	3,045	3,026	3,225
	<i>A. salmonicida</i> #178-9	3	2,835	1,912	0,356	0,220	0,206

			15	30	60	120	1080
			Min	Min	Min	Min	Min
Éster de colesterol	Controle	1	0,416	0,397	0,422	0,408	0,437
	<i>T. lanuginosus</i>	2	0,436	0,400	0,425	0,419	0,416
	<i>A. salmonicida</i> #178-9	3	1,414	2,988	6,107	6,694	5,760
Triglicerídeos	Controle	1	76,153	73,505	75,565	79,344	77,382
	<i>T. lanuginosus</i>	2	74,099	74,413	77,079	74,284	21,781
	<i>A. salmonicida</i> #178-9	3	73,781	73,342	77,857	82,040	72,117

[000670] Dos resultados foi observado que quase todo o colesterol foi esterificado depois de 60 minutos na mostra 3. Foi concluído que durante 30 primeiros minutos houve excesso substrato para a reação. Os resultados formaram amostras tomadas após 15 de 30 minutos e desse modo foram utilizadas para calcular as atividades da enzima.

[000671] Baseado na informação na Tabela 10 e no fato de que a gema de ovo contém 27 % de lipídios, a quantidade em micromol de ácido graxo e éster de colesterol por ml de enzima foi calculada com os resultados mostrados na Tabela 11.

[000672] Os resultados na Tabela 11 foram obtidos ser os cálculos seguintes dos resultados de ácidos graxos a partir da mostra número 3 (*A. salmonicida*, 15 minutos).

[000673] Lipídio em 5 g gema de ovo = $5 \times 0,27 = 1,35$ g

[000674] 1,35 gramas de lipídio contém 1.007 % de ácidos graxos = $1,35 \times 1,007/100 = 0,01359$ gramas.

[000675] O peso molecular médio de ácidos graxos é 272.

[000676] $0,01359 \text{ g} = 0,01359 \times 1000000/272 \text{ } \mu\text{mol} = 49,9798 \text{ } \mu\text{mol}$

[000677] 0,25 ml enzima é acrescentado.

[000678] $\mu\text{mol de ácido graxo/ml de enzima} = 49,9798/0,25 = 199,9$.

Tabela 11:

Micromol/ml de enzima				
		0 min	15 min	30 min
ácidos graxos livres	Controle		65,01	60,37
	<i>T. lanuginosus</i>		77,61	74,71
	Transferase #178-9		199,86	331,06
Éster de colesterol	Controle		35,09	33,50
	<i>T. lanuginosus</i>		36,77	33,73
	Transferase #178-9		119,29	252,15

[000679] Da Tabela 11 é possível calcular a modificação na quantidade de ácido graxo e éster de colesterol causado pela enzima quanto ao controle como mostrado na Tabela 12.

Tabela 12:

□ Micromol/ml de enzima				
		0 min	15 min	30 min
ácidos graxos livres	<i>T. lanuginosus</i>	0	12,593	14,340
	Transferase #178-9	0	134,843	270,691
Éster de	<i>T.</i>	0	1,677	0,235

□ Micromol/ml de enzima				
		0 min	15 min	30 min
colesterol	<i>lanuginosus</i>			
	Transferase #178-9	0	84,196	218,652

[000680] A quantidade de ácido graxo ou éster de colesterol produzidas como uma função do tempo é mostrada na Figura 53.

[000681] Da inclinação da curva foram calculadas a atividade hidrolítica (formação de FFA) e a atividade da enzima enzima lipídio aciltransferase (formação de éster de colesterol) como uma função do tempo. A atividade transferase relativa (% de atividade acil transferase) e a atividade hidrolítica relativa então foram calculadas tal como mostrado na Tabela 13. A atividade transferase relativa foi determinada usando o protocolo para a determinação do % de atividade de acil transferase como descrito mais a frente. Por exemplo, cálculo da atividade relativa para #178-9: Atividade total é a atividade FFA + atividade transferase = $9,023 + 7,2884 = 16,311 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$; Atividade transferase relativa = $7,2884 \times 100 / 16,311 = 44,7$; Atividade hidrolítica relativa = $9,023 \times 100 / 16,311 = 55,3$.

Tabela 13:

<i>T. lanuginosus</i>	atividade FFA	0,4780	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$
<i>A. salmonicida</i> #178-9	atividade FFA	9,0230	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$
<i>T. lanuginosus</i>	Atividade Éster de colesterol	0,0078	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$
<i>A. salmonicida</i> #178-9	Atividade Éster de colesterol	7,2884	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$
<i>T. lanuginosus</i>	Atividade	1,6	

	transferase relativa		
A. <i>salmonicida</i> #178-9	Atividade transferase relativa	44,7	
T. <i>lanuginosus</i>	Atividade hidrolítica relativa	98,4	
A. <i>salmonicida</i> #178-9	Atividade hidrolítica relativa	55,3	

[000682] Os resultados na Tabela 13 confirmaram que a enzima transferase de *A. salmonicida* tem uma atividade transferase significativa, mas os resultados também confirmaram que esta enzima tem uma atividade hidrolítica significativa.

[000683] A lipase de *T. lanuginosus* tem principalmente a atividade hidrolítica, e a atividade transferase relativa 1,6 não foi uma prova de nenhuma atividade transferase, mas foi explicada pela incerteza da análise.

Conclusão.

[000684] A gema de ovo foi usada como substrato para a medição da atividade transferase e hidrolase da enzima lipídio acil transferase de *Aeromonas salmonicida* e uma lipase da *Thermomyces lanuginosus*. Em condições de ensaio houve inicialmente uma relação linear entre éster de colesterol e a formação de ácidos graxos livres e do tempo para a enzima lipídio acil transferase. Baseado nesta relação linear foi possível calcular a atividade hidrolítica (formação de FFA) e a atividade transferase (formação de éster de colesterol). A atividade hidrolítica relativa e a atividade transferase também foram calculadas. A enzima lipídio acil transferase (neste caso um GCAT) da *Aeromonas salmonicida* mostrou atividade hidrolítica quase igual a atividade transferase nas condições do ensaio.

[000685] A lipase da *Thermomyces lanuginosus* mostrou atividade

hidrolítica muito baixa e a atividade transferase não foi significativa.

EXEMPLO 11: Ensaio de Transferase em Gema de Ovo com Alta concentração de Água.

Introdução

[000686] Uma enzima lipídio acil transferase de acordo com a presente invenção foi isolada de *Aeromonas salmonicida* e expressa no *Bacillus subtilis*. Os experimentos iniciais mostraram que esta enzima é muito eficiente na transferência de ácido graxo da lecitina ao colesterol usando a gema de ovo como um substrato.

[000687] Nos experimentos seguintes a reação transferase foi estudada no detalhe adicional que usa gema de ovo como um substrato com o foco especial na concentração de água no substrato.

Procedimento.

Materiais.

Gema de ovo: gema de ovo líquida pasteurizada da Danaeg Products A/S, DK-4000 Roskilde.

Tampão HEPES do 21 Sigma. Cat. H3375

Clorofórmio, grau Analítico.

Squalane, grau analítico.

Enzimas.

#178-9 Lipídio acil transferase de *A. salmonicida*, de acordo com a presente invenção.

#2427 Fosfolipase A1 de *Fusarium oxysporum*. LIPOPAN® F da Novozymes, DK (enzima lipolítica comparativa).

#1991 Fosfolipase A2 do Pâncreas, LIPOMOD 22L da Biocatalysts, Reino Unido (enzima lipolítica comparativa).

Ensaio de enzima com gema de ovo como substrato.

[000688] São pesados 5 g de gema de ovo líquida em um frasco de vidro Wheaton de 20 ml e aquecidos a 35°C.

[000689] Foi adicionada água e uma solução de enzima e iniciado o cronômetro.

[000690] Regularmente foram transferidas amostras de 0,5 g a um o frasco de 10 ml de vidro Dram.

[000691] São adicionadas 20 µl de HCl 4 M, para parar a reação de enzima e acidificar o sabão de ácido graxo.

[000692] São adicionadas 3 ml de clorofórmio e a amostra é agitada no misturador Whirley por 30 segundos.

[000693] A amostra foi centrifugada em 3000 g durante 10 minutos e 0,8 ml da fase de clorofórmio foi transferido a um vidro de Dram recoberto. O clorofórmio foi evaporado em 60°C sob um fluxo de nitrogênio. O vidro dram foi novamente pesado.

[000694] Os lipídios isolados foram analisados por GLC.

Análise GLC

[000695] Autosistema Perkin Elmer 9000 de cromatografia capilar a gás equipado com WCOT coluna de sílica fundida 12,5 m x 0,25 mm ID x 0,1 µ de espessura de filme de fenil-metil- silício 5 % (CP Sil 8 CB da Chrompack).

[000696] Gás carreador: Hélio.

[000697] Injetor: injetor split a frio PSSI (temp. inicial 50°C aquecido a 385°C), o volume 1,0 µl.

[000698] Detector FID: 395°C

[000699] Programa de Forno: 1 2 3

[000700] Temperatura de Forno, °C: 90 280 350

[000701] Isotérmico,tempo,minuto: 1 0 10

[000702] Taxa de Temperatura,°C/min: 15 4

[000703] Preparação de Mostra: 30 mg da amostra foram dissolvidos em 9 ml de heptano:piridina, 2:1 contendo um padrão interno de heptadecano, 0,5 mg/ml. 300 µl da solução de mostra foi transferida a um frasco de encrespamento, foram adicionadas 300 µl de MSTFA (N – Metil – N – trimetil silil - trifluoracetamida) e foi deixada reagir durante 20 minutos a 60°C.

[000704] Cálculos: os fatores de resposta de mono- di- e triglicerídeos e ácidos graxos livres foram determinados a partir do padrão 2 (mono-di-triglicerídeo), para o Colesterol, Colesteril palmitato e Colesteril estearato. Os

fatores de resposta foram determinados no material de referência puro (pesando para 1 mg do material puro).

Resultados

[000705] A gema de ovo que contém 2 % de esqualane foi usada como substrato para as reações. O esqualane foi acrescentado como um padrão interno da análise GLC, para quantificar os componentes de lipídio na gema de ovo.

[000706] O experimento foi estruturada tal como mostrado na Tabela 14.

Tabela 14:

		1	2	3	4	5	6	7	8
Substrato, gema de ovo com 2 % esqualane	g	5	5	5	5	5	5	2,5	2,5
Transferase # 178-9,14 PLU-7/ml	ml		0,25			0,25		0,13	
LIPOPAN® Fsolution, 200 PLU-7/ml	ml			0,25					0,13
#1991 Fosfolipase A2, 6300 PLU/ml	ml				0,25		0,25		
Água	ml	0,25				3,8	3,8	8,75	8,75

[000707] Amostras foram tiradas depois de 30, 60 e 120 minutos e analisadas segundo o método descrito anteriormente (foram coletados 0,5 ml (experimentos 1 a 4) 0,86 ml (experimentos 5 e 6) e 2,2 ml (experimentos 7 e 8) de amostras).

[000708] Os resultados da análise GLC são mostrados na Tabela 15. Os resultados de GLC foram expressos em percentual do substrato (gema de ovo). A Tabela também indica o tempo de reação e a soma total de água na mistura de reação.

Tabela 15:

Enzima	Tempo de reação	% de água na reação	GLC	GLC	GLC
	Minutos		% de ácidos graxos	% de colesterol	% de éster de colesterol
Controle	120	54	0,247	0,863	0,083
#178	30	54	0,422	0,669	0,445
#178	60	54	0,515	0,549	0,672
#178	120	54	0,711	0,364	1,029
#2427	30	54	2,366	0,848	0,090
#2427	60	54	3,175	0,837	0,088
#2427	120	54	3,926	0,833	0,082
#1991	30	54	1,606	0,911	0,083
#1991	60	54	1,701	0,838	0,080
#1991	120	54	1,781	0,763	0,053
#178	30	73	0,377	0,764	0,495
#178	60	73	0,488	0,665	0,719
#178	120	73	0,626	0,426	0,931
#2427	30	73	2,471	0,853	0,092
#2427	60	73	3,284	0,858	0,087
#2427	120	73	4,176	0,837	0,081
#178	30	89	0,344	0,720	0,308
#178	60	89	0,443	0,725	0,446
#178	120	89	0,610	0,597	0,607
#2427	30	89	0,510	0,167	0,010
#2427	60	89	0,602	0,133	0,010
#2427	120	89	0,867	0,147	0,009

[000709] Baseado nas análises de ácido graxo, colesterol e éster de colesterol foi possível calcular a quantidade de ácido graxo livre, e éster de colesterol produzido como uma função de tempo de reação e do conteúdo de

água. Baseado nesses resultados foi então possível calcular o total de atividade enzimática como a soma da formação de ácidos graxos e a formação do éster de colesterol. A atividade hidrolítica relativa e a atividade transferase relativa (isto é % acil de atividade transferase) então foram calculadas com os resultados mostrados na Tabela 16.

[000710] Os resultados em Tabela 16 também foram analisados por meio de estatística usando um Multifator Statgráfico ANOVA. Os resultados estatísticos na Figura 54 confirmam que Fosfolipase A1, #2427 e fosfolipase A2, #1991 não têm nenhuma atividade transferase enquanto que a transferase #178-9 mostrou quase 50 % de atividade transferase nessas condições de ensaio.

[000711] O efeito do conteúdo de água no ensaio na atividade transferase da transferase #178 também foi analisado por meio de estatística como mostrado na Figura 55. Esses resultados indicam que na faixa de variação da água de 54 para 89 % no ensaio não houve nenhum efeito forte do conteúdo de água sobre a atividade transferase relativa.

[000712] O impacto de tempo de reação na atividade de transferase para a transferase #178 foi avaliado com resultados mostrados na Tabela 16 e a Figura 56. Os resultados na Figura 56 indicam que a atividade transferase relativa diminui como uma função do tempo de reação. Isto poderia ser explicado pelo fato que a maior parte do colesterol de molécula receptora é consumida e por isso a atividade hidrolítica relativa aumenta. Os valores negativos da reação transferase para #2427 só indicam nenhuma atividade transferase dentro da variação do método analítico.

Tabela 16:

Enzima	Tempo de reação em minutos	Percentual de água no meio racional	ácido graxo produzido	Colesterol consumido	Éster de colesterol produzido	Percentual de atividade hidrolítica Ca	Percentual de atividade transferase
#178	30	54	0,175	0,194	0,362	53	47

Enzima	Tempo de reação em minutos	Percentual de água no meio racional	ácido graxo produzido	Colesterol consumido	Éster de colesterol produzido	Percentual de atividade hidrolítica Ca	Percentual de atividade transferase
#178	60	54	0,268	0,314	0,589	52	48
#178	120	54	0,464	0,499	0,946	53	47
#2427	30	54	2,119	0,015	0,007	100	0
#2427	60	54	2,928	0,026	0,005	100	0
#2427	120	54	3,679	0,030	-0,001	100	0
#1991	30	54	1,359	-0,048	0,000	100	0
#1991	60	54	1,454	0,025	-0,003	100	0
#1991	120	54	1,534	0,100	-0,030	101	-1
#178	30	73	0,130	0,099	0,412	42	58
#178	60	73	0,241	0,198	0,636	47	53
#178	120	73	0,379	0,437	0,848	51	49
#2427	30	73	2,224	0,010	0,009	100	0
#2427	60	73	3,037	0,005	0,004	100	0
#2427	120	73	3,929	0,026	-0,002	100	0
#178	30	89	0,097	0,143	0,225	50	50
#178	60	89	0,196	0,138	0,363	56	44
#178	120	89	0,363	0,266	0,524	62	38
#2427	30	89	0,263	0,696	-0,073	113	-13
#2427	60	89	0,355	0,730	-0,073	110	-10
#2427	120	89	0,620	0,716	-0,074	105	-5

Conclusão.

[000713] A enzima lipídio acil transferase da *Aeromonas salmonicida* foi testada na gema de ovo como substrato e com níveis diferentes do conteúdo de água. Esta enzima foi comparada com o controle enzimas lipolíticas, nominalmente Fosfolipase A1 de *Fusarium oxysporum* e Fosfolipase

A2 do pâncreas.

[000714] Os resultados comprovaram que só o transferase catalisou a reação transferase entre lecitina e colesterol durante a formação de éster de colesterol. Os resultados mostraram que na variedade de 54 % à água de 89 % no substrato a atividade transferase relativa foi quase a mesma de transferase de *Aeromonas salmonicida*.

EXEMPLO 12: “Ensaio de Transferase em Substrato Tamponado” para medição de atividade acil transferase (e.g. para uso em um gênero alimentício que usam lecitina e colesterol).

[000715] A enzima lipídio acil transferase foi isolada de *Aeromonas salmonicida* e exposto no *Bacillus subtilis*. Esta enzima é muito eficiente na transferência de ácido graxo de lecitina ao colesterol durante a formação de éster de colesteróis. Também foi mostrado que a enzima tem um pouco de atividade hidrolítica, que é observada pela formação de ácido graxo livre. Fosfolipases tradicionais (EC 3.1.1.4 e EC 3.1.1.32) possuem a capacidade hidrolizar a lecitina durante a formação de ácidos graxos livres e lisolecitina, e nenhuma reação transferase foi informada para essas enzimas.

[000716] Detalhamos aqui um ensaio que é capaz de medir tanto transferase como a atividade hidrolítica de enzimas e assim identificar a enzima lipídio acil transferases de acordo com a presente invenção, o ensaio usa um substrato que contém lecitina e o colesterol. Neste trabalho foi usado um substrato baseado em fosfatidilcolina e colesterol disperso em tampão. A quantificação de produtos de reação foi feita pela extração de lipídios do substrato seguido pela análise GLC dos componentes de lipídio.

Procedimento.

Materiais.

L-alpha-fosfatidilcolina 95 % (Plant) Avanti nº 441601

Colesterol: cat. Sigma. C 8503

Colesteril Palmitato, Sigma C 6072

Colesteril Estearato, Sigma C 3549

HEPES em tampão cat. Sigma. Nº H 3375

Clorofórmio, grau Analítico.

Enzimas

GCAT Purificado de *A. salmonicida* #178-9

[000717] Análise TLC foi executada como descrito no Exemplo 6.

[000718] Análise GLC foi executada como descrito no Exemplo 11.

[000719] Resultados: ensaio de Transferase baseado em fosfatidilcolina e colesterol como substrato.

[000720] Em seguida a atividade transferase da transferase foi testada com um substrato baseado em fosfatidilcolina e colesterol segundo o seguinte procedimento.

[000721] 450 mg de fosfatidilcolina (> 95 % PC Avanti item nº 441601) e 50 mg de colesterol foram dissolvidos no clorofórmio e evaporarou-se à secura sob vácuo. 300 mg de mistura colesterol/fosfatidilcolina foram transferidos a um vidro Wheaton e foram acionados 15 ml de tampão HEPES 50 mM pH 7. O lipídio foi disperso no tampão durante a agitação.

[000722] O substrato foi aquecido a 35°C durante a mistura com um agitador magnético e foi acrescentado 0,25 ml solução de enzima. Esse é um ambiente com concentração muito elevada de água aproximadamente 95 %.

[000723] As amostras de 2 ml foram tiradas depois de 0, 5, 10, 15, 25, 40 e 60 minutos de tempo de reação.

[000724] Imediatamente foram acrescentados 25µl 4M HCl para acidificar o ácido graxo livre e parar a reação de enzima. 3,00 ml clorofórmio foram acrescentados, e a amostra foi agitada energeticamente em um agitador Whirley durante 30 segundos. A amostra foi centrifugada e 2 ml da fase de clorofórmio foi isolado e filtrado em filtros de 0,45 µm e transferido para dentro de Dram, tarado de 10 ml. O clorofórmio foi evaporado sob uma corrente de nitrogênio a 60°C, e as amostras foram pesadas novamente. O lipídio extraído foi analisado por GLC.

[000725] Os resultados da análise GLC estão mostrados na Tabela 17. Os resultados são expressos no % calculado no lipídio extraído. É ilustrada a quantidade de ácido graxo e éster de colesterol que se formou como uma

função do tempo. A figura 57 pode ser concluída da Figura 57 em que a reação de enzima não é linear como uma função do tempo, porque inicialmente é observado que segue forte tanto como atividade hidrolítica quanto de transferase. Depois de aproximadamente 10 minutos e até aproximadamente 60 minutos a reação mostra uma resposta quase linear de ácido graxo e formação de éster de colesterol como uma função do tempo. Por isso, se decidiu ver a reação enzimática neste intervalo de tempo.

Tabela 17:

Minutos	0	5	10	15	25	40	60
Colesterol, %	10,064	8,943	8,577	8,686	8,102	7,856	7,809
éster de colesterol, %	0,000	1,571	2,030	2,058	2,282	2,659	3,081
FFA total, %	0,260	1,197	1,239	1,466	2,445	2,943	3,940

[000726] Do conhecimento sobre a quantidade do lipídio na mistura de reação e a quantidade da enzima acrescentada foi possível calcular a formação de ácido graxo e éster de colesterol expresso em, $\mu\text{mol/ml}$ enzima (Tabela 18 e Figura 58).

Tabela 18:

Minutos	10	15	25	40	60
	$\mu\text{mol/ml}$	$\mu\text{mol/ml}$	$\mu\text{mol/ml}$	$\mu\text{mol/ml}$	$\mu\text{mol/ml}$
FFA total	58,1	68,7	114,6	138,0	184,7
Éster de colesterol	88,8	90,0	99,3	115,6	133,8

[000727] Dos resultados na Tabela 18 e da inclinação das curvas na Figura 58 foi possível calcular a quantidade de ácido graxo e éster de colesterol

como uma função do tempo e expresso em $\mu\text{mol}/\text{min}$ por ml de enzima.

[000728] O cálculo da atividade hidrolítica e da atividade transferase é mostrado na Tabela 19. A atividade transferase relativa foi determinada usando o protocolo para a determinação do % acil da atividade transferase como descrito anteriormente.

Tabela 19:

Atividade hidrolítica (ácido graxo)	2,52	$\mu\text{mol}/\text{min}$ por ml enzima
Atividade transferase (éster de colesterol)	0,94	$\mu\text{mol}/\text{min}$ por ml enzima
Atividade total	3,45	$\mu\text{mol}/\text{min}$ por ml enzima
Atividade transferase relativa	27,1	%
Atividade hidrolítica relativa	72,9	%

Avaliando outras enzimas com relação a atividade transferase.

[000729] O método acima mencionado foi usado para avaliar enzimas lipolíticas diferentes quanto a atividade transferase e atividade hidrolítica. As enzimas foram testadas tal como mostrado na Tabela 20.

Tabela 20:

		1	2	3	4	5
Substrato	ml	15	15	15	15	15
#178-9 Transferase <i>A. salmonicida</i> 32 PLU-7/ml	ml	0,25				
5 % #3016, LIPOPANO F (<i>F. oxysporum</i>)	ml		0,25			
5 %, <i>Thermomyces lanuginosus</i>	ml			0,25		
5 % <i>Candida rugosa</i> #2983	ml				0,25	
5 % <i>Candida cylindracea</i> #3076	ml					0,25

[000730] O substrato contendo de 300 mg de fosfatidilcolina/colesterol disperso no tampão de HEPES de 50 mM pH 7,0 foi aquecido a 35°C com a agitação. A solução de enzima foi acrescentada e a amostra foi mantida em

35°C com a agitação. As amostras foram tiradas com o intervalo regular e extraídas com o Clorofórmio. Os lipídios isolados foram analisados por GLC com resultados mostrados na Tabela 21a.

Table 21a:

Amostra								
1	Transferase 178-9							
	Minutos	0	5	10	15	25	40	60
	FFA	1,216	2,516	2,983	2,62	2,894	3,448	3,911
	Colesterol	7,547	6,438	6,365	6,15	6,136	5,936	5,662
	Éster de colesterol	0	1,835	2,177	2,44	2,58	2,851	3,331
2	<i>Fusarium oxysporum</i> (LIOPAN® F)	0	5	10	15	25	40	60
	FFA	1,216	1,345	1,796	1,95	2,487	2,424	2,977
	Colesterol	7,547	7,309	7,366	7,33	7,429	7,341	7,326
	Éster de colesterol	0	0,26	0,386	0,35	0,267	0,36	0,394
3	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	0	5	10	15	25	40	60
	FFA	1,216	0,853	0,875	1	0,896	1,106	1,009
	Colesterol	7,547	7,384	7,639	7,63	7,675	7,603	7,529
	Éster de colesterol	0	0	0	0	0	0	0
4	<i>Candida rugosa</i>	0	5	10	15	25	40	60

	(#2938)							
	FFA	1,216	0,982	0,987	1,02	1,135	1,131	1,15
	Colesterol	7,547	7,438	7,656	7,66	7,638	7,575	7,585
	Éster de colesterol	0	0	0	0	0	0	0
5	<i>Candida cylandracea</i> (#3076)	0	5	10	15	25	40	60
	FFA	1,216	1,032	1,097	1,07	1,203	1,131	1,43
	Colesterol	7,547	7,502	7,425	7,65	7,619	7,502	7,411
	Éster de colesterol	0	0	0	0	0	0	0

[000731] Da análise GLC foi observado que só a enzima lipídio acil transferase (178-9) produziu a quantidade significativa de éster de colesterol e ácidos graxos. O Fosfolipase de *Fusarium oxysporum* também deu um aumento constante no ácido graxo livre, mas só uma pequena formação na quantidade inicial de éster de colesterol foi formado, mas nenhum aumento no éster de colesterol como uma função do tempo foi observada.

[000732] Baseado no conhecimento sobre a quantidade do substrato lipídico e as análises de GLC foi possível calcular a atividade transferase relativa e a atividade hidrolítica relativa baseada nos resultados de tempo de reação de 10 para 60 minutos. Os resultados de Transferase 178-9 e *Fusarium oxysporum* lipase são mostrados na Tabela 21b. Outras enzimas testadas não mostraram nenhuma atividade.

Tabela 21b:

	Transferase 178-9	<i>Fusarium oxysporum</i>
Atividade hidrolítica, micro mol/minuto/ml de enzima	1,03	0,96

	Transferase 178-9	<i>Fusarium oxysporum</i>
Atividade transferase, micro mol/minuto/ml de enzima	0,40	0,01
Atividade total, micro mol/minuto/ml de enzima	1,43	0,98
Atividade hidrolítica relativa	71,8	98,7
Atividade transferase relativa	28,2	1,3

[000733] O resultado mostrado na Tabela 21b confirma uma atividade transferase significativa da enzima lipídio acil transferase (experimento 178-9). Também é observado que a atividade transferase relativa está em boa concordância com o experimento mencionado na Tabela 19.

[000734] É, todavia, observada uma forma de atividade transferase muito baixa *Fusarium oxysporum* fosfolipase. Este nível de transferase é tão de lâmpadas que ele está incluído na incerteza da análise. Como esperado a fosfolipase do *Fusarium oxysporum* tem uma atividade hidrolítica significativa.

Conclusão.

[000735] Em vez da gema de ovo (mostrado no Exemplo 11) um substrato artificial baseado em fosfatidilcolina purificado e colesterol foi usado como um substrato para medir a atividade de transferase de *Aeromonas salmonicida*. Em um tempo de reação entre 10 minutos de 60 minutos o ensaio deu uma formação quase linear de ácidos graxos livres e éster de colesterol como uma função do tempo. A atividade hidrolítica e a atividade de transferase foram calculadas com base na atividade entre tempo de reação de 10 e 60 minutos.

[000736] A concentração de substratos neste ensaio foi relativamente mais baixa do que na gema de ovo, e a quantidade de água no ensaio foi relativamente mais alta.

[000737] Baseado nos resultados do ensaio da enzima lipídio acil

transferase (neste exemplo um GCAT) de *Aeromonas salmonicida* em um substrato artificial de fosfatidilcolina/colesterol em tampão conclui-se que esta enzima tem atividade transferase muito boa também em um sistema com um conteúdo de água muito alto.

[000738] Ambos os ensaios baseados na gema de ovo (ver o Exemplo 11) e fosfatidilcolina/colesterol em tampão (Exemplo 12), podem ser utilizados para medir a atividade transferase e a atividade hidrolítica de enzimas. A gema de ovo é preferida do ponto de vista em que a atividade hidrolítica e a atividade transferase são lineares como uma função do tempo, mas o fosfatidilcolina/colesterol em tampão só é linear dentro de certo prazo.

EXEMPLO 13: Emulsões Alimentares

[000739] O efeito da gema de ovo líquida modificada por enzima foi testada em uma receita de emulsão alimentícia padrão com 60 % de óleo.

[000740] Os métodos padrão e os materiais estão segundo o que está detalhado nos Exemplos acima.

[000741] A gema de ovo foi tratada com uma lipídio acil transferase de *Aeromonas salmonicida* (#138) ou fosfolipase, nominalmente uma enzima comercialmente disponível LipopanF® (Novozymes A/S, Dinamarca) (#2938) como mostrado na Tabela 22.

Tabela 22. Tratamento de gema de ovo por enzima.

		1	2	3	4
Gema de ovo, produto de	grama	10	10	10	10
Sanofo nº 1123P2					
#138, 10 PLU/ml	ml	1	1		
#2938, 200 PLU/ml	ml			1	
Água	ml				1
Tempo de reação	min	210	360	210	210

[000742] A análise TLC dos lipídios de gema de ovo da gema de ovo tratada a enzima (Tabela 9) é mostrado nas Figuras 59 e 60.

[000743] Neste experimento a dosagem de #2938 foi aumentada por

um fator de 10 e isto deu uma atividade muito clara na gema de ovo. A quantidade de ácido graxo livre aumentou significativamente e a lecitina (PC) foi hidrolisada a lisolectina (LPC). A transferase #138 deu uma reação transferase clara porque o colesterol livre foi convertido ao éster de colesterol e parte da lecitina foram convertidos a lisolectina.

[000744] Outro aspecto interessante da modificação de enzima foi a consistência do produto. A amostra tratada com Fosfolipase #2938 ficou muito sólida, enquanto que as amostras tratadas com a enzima lipídio acil transferase #138 guardou a mesma coerência líquida que a amostra de controle (ver a Figura 61).

[000745] Essas gemas de ovo modificadas foram testadas em uma receita de Emulsão Alimentar mostrada na Tabela 23.

Tabela 23. A maionese com a gema de ovo modificada por enzima.

	0	1a	2a	3a	4a
	%	%	%	%	%
Rapsolie	60	60	60	60	60
Gema de ovo, produto de Sanofo nº 1123P2	2,8				
Gema de ovo modificada n.1		2,8			
Gema de ovo modificada n.2			2,8		
Gema de ovo modificada n.3				2,8	
Gema de ovo de controle (não tratada) n. 4					2,8
Água	39	36,2	36,2	36,2	36,2
Vinagre, 10% de ácido acético	1	1	1	1	1

[000746] Gemas de ovo Modificadas 1 e 2 foram tratadas com a lipídio acil transferase; e a gema de ovo modificada 3 foi tratada com a fosfolipase comercialmente disponível.

[000747] A emulsão alimentícia foi produzida por uma emulsão de óleo em água de acordo com o seguinte procedimento: a gema de ovo e água foram pesadas em um Becker. O óleo foi pesado separadamente.

[000748] Um misturador Turrax (20000 revoluções por minuto) foi

imerso na fase de água. O óleo foi bombeado à fase de água em uma velocidade constante mais de 2 minutos. A mistura foi continuada durante 1 novo minuto. O vinagre foi então adicionado acrescentado e misturou-se durante 5 segundos.

[000749] A estabilidade da emulsão foi testada em um gabinete de aquecimento a 100°C. Depois de 2 horas a 100°C a emulsão foi avaliada (ver a Figura 62).

[000750] A estabilidade de emulsão da gema de ovo não tratada esteve bastante bem neste experimento. Tratamento de gema de ovo com a enzima lipídio acil transferase #138, contudo melhorou a estabilidade porque a quantidade da separação de água foi reduzido. A gema de ovo tratada com fosfolipase #2938 forneceu uma emulsão muito movediça com a separação quase completa do óleo - e a fase de água em 100°C.

[000751] É considerado que em algumas aplicações o uso das composições e métodos da invenção pode fornecer uma estabilidade térmica melhorada de emulsões, como no molho para salada de óleo em água e os assemelhados. Isto é particularmente inportante em emulsões alimentícias que são pasteurizadas para assegurar uma validade 10 mais longa e/ou são aquecidas antes de serem servidas, por exemplo, em refeições pré-prontas para re-aquecer antes de serem servidas (por exemplo, refeições de microondas). Embora não se deseje estar limitado por qualquer teoria em particular, é considerado que em algumas aplicações o acúmulo de ácido graxo livre pode ser prejudicial à estabilidade térmica de tais emulsões. Deve ser reconhecido que uma estabilidade térmica melhorada das emulsões nos alimentos preparados usando os métodos da invenção alimentícios produzidas usando os métodos da invenção, pode não ser encontrada, ou até não ser desejável desejável, em todas as aplicações alimentícias. Será evidente à pessoa experiente na técnica em que aplicações tais características são desejáveis, e a estabilidade das emulsões pode ser facilmente determinada usando um simples teste calor, equivalente, por exemplo, a pasteurização ou o reaquecimento e microondas. Os inventores descobriram que em uma

modalidade preferida as emulsões alimentícias obtidas utilizando as enzimas da presente invenção possuem a estabilidade térmica melhorada.

EXEMPLO 14: Reação de Transferase em Gema de Ovo enriquecida com esterol de planta:

[000752] A forma transferase da *Aeromonas salmonicida* foi capaz de catalisar a formação de lisolecitina, do monoglicerídeo e dos ésteres dos esteróis de planta na gema de ovo enriquecida com glicerol e esterol de planta. De A mesma enzima também foi testada em um sistema de pouca concentração de água que contém óleo de palma, lecitina, esterol de planta e glicerol. Através da análise da TLC e GLC, foi mostrado que nessas condições de reação, foram produzidos monoglicerídeos e éster do esterol de planta.

Introdução:

[000753] A transferase da *Aeromonas salmonicida* foi testada para a atividade transferase em um sistema de lecitina, gordura, esterol de planta e glicerol quase isento de água.

Materiais:

Gema de ovo: gema de ovo líquida pasteurizada da Danaeg Products A/S, DK-4000 Roskilde GCAT purificação de transferase 178-9, 32 PLU-7/ml (Jornal 2254-100).

Lecitina de soja. Yolkin da Aarhus United, Dinamarca.

Óleo de palma 43, de Aarhus United, Dinamarca.

L- α fosfatidilcolina 95 % de planta (Avanti #441601).

Sitoesterol, Sigma n. S5753

Esterol de Planta: o Generol N122 de Cognis, Alemanha.

Item de Glicerol de n. 085915

Resultados:

[000754] A avaliação inicial da atividade da transferase sobre esterol de planta e glicerol foi conduzida em uma gema de ovo tal como mostrado na tabela 24.

Tabela 24:

		1	2	3	4
--	--	----------	----------	----------	----------

Gema de ovo	Gramas	1	1	1	1
Glicerol	Gramas	0,1	0,1		
Citoesterol:óleo, 3:7	Gramas			0,13	0,13
Transferase #178-9	Gramas	1		1	
Água			*		*

* - a quantidade de água corresponde à quantidade de água da solução da enzima, 83 µl.

[000755] Os ingredientes foram misturados e aquecidos a 37°C e conservados nesta temperatura durante a agitação com um agitador magnético.

[000756] Foram coletadas amostras de 0,1 g depois de 3 e 23 horas e analisadas por TLC.

[000757] Os resultados da análise TLC são mostrados na Figura 63.

[000758] Os resultados na Figura 63 indicam que tanto o colesterol como os esteróis de plantas foram esterificados pela reação transferase, acompanhados com a formação de lisolecitina (experimentos 3 e 4), porque quase todos esteróis e o colesteróis livres foram convertidos ao éster correspondente na amostra 3.

[000759] Os resultados também indicaram que uma amostra só com glicerol e gema de ovo produziu monoglicerídeo. A quantidade de monoglicerídeo tem que ser confirmada pela análise GLC. Quando esterol foi adicionado em conjunto com o glicerol (experimento 3) a quantidade de monoglicerídeo foi muito baixo e não detectável por TLC. Isto indicou que enquanto houve excesso de esterol ou colesterol a reação de transferase que usa glicerol foi inexpressiva.

[000760] Em outro experimento a enzima transferase 178-9 foi adicionada a uma mistura de soja e lecitina, glicerol e esterol de planta, para estudar a atividade catalítica da enzima nesta mistura de reação. A composição das misturas de reação nesses experimentos é mostrada na Tabela 25.

Tabela 25:

		1	2	3	4	5	6
Lecitina de soja	gramas	1,875	2,25	1,875	2,5	3,5	3,5
Esterol de planta; Generol N 122	gramas	0,225	0,225	0	0	0,225	0,5
Oleo de palma 43	gramas	2,675	2,25	2,8	2,125	1,062	0,831
Glicerol	gramas	0,225	0,275	0,325	0,375	0,248	0,238
Transferase #178-9, 32 PLU/ml	ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

[000761] O experimento foi conduzido misturando os componentes de lipídio durante a agitação a 46°C. A enzima foi acrescentada e as amostras foram tiradas depois de 4 e 24 horas.

[000762] As amostras foram analisadas por TLC como mostrado na Figura 64.

[000763] A amostra do experimento 2, 4 e 5 depois de tempo de reação de 24 horas também foi analisada por GLC com resultados mostrados na Tabela 26.

Tabela 26:

		2	4	5
Glicerol	%	3,16	5,71	4,17
Ácidos graxos	%	4,23	5,36	6,67
Mono	%	2,24	3,87	3,92
Esterol	%	2,13		2,62
Éster de esterol	%	2,89		2,14

[000764] Os resultados confirmaram que transferase 178-9 foi capaz de catalisar a formação dos ésteres de esterol de planta e de mono glicerídeos a partir da mistura de reação à contendo soja, lecitina, glicerol e esterol de planta. Tal mistura de reação poderia ser de interesse para uso na produção de margarina onde monoglicerídeo é desejável para que as suas propriedades de emulsificação e os ésteres de esterol de planta são necessários para manter um efeito de diminuição do colesterol.

Conclusão.

[000765] CGAT transferase de *Aeromonas salmonicida* foi capaz de catalisar a formação de ésteres de esterol de planta e de monoglicerídeo na gema de ovo na qual foram adicionados esterol de planta e glicerol. A mesma enzima também catalisou a formação de ésteres do esterol da planta e de monoglicerídeo em uma mistura de óleo de palma, lecitina, esterol de planta e glicerol. Esta enzima, por isso, tem o interesse do uso na fabricação de margarina e outros óleos que contêm produtos alimentícios onde monoglicerídeo e lisolecitina sejam necessários para uma emulsificação melhorada e efeitos de redução do colesterol pela presença do éster de esterol de planta.

EXEMPLO 15: imobilização de uma enzima lipídio acil transferase de *Aeromonas salmonicida* e seu uso na síntese de ésteres de esterol.

[000766] Uma enzima lipídio acil transferase (neste caso um GCAT) de *A. salmonicida* foi imobilizada em Celite pela precipitação com acetona. 10 ml da solução de enzima em tampão de 20 mM de TEA em pH 7 foi agitada lentamente com Celite de 0,1 g de Celite 535535 (da Fluka) durante 2 horas na temperatura ambiente.

[000767] 50 ml a acetona gelada foi acrescentada durante a agitação continuada.

[000768] O precipitado foi isolado por centrifugação a 5000 x g durante 1 minuto.

[000769] O precipitado foi lavado 2 vezes com 20 ml de acetona gelada.

[000770] O Celite foi seco na temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora.

[000771] A transferase imobilizada foi testada em uma mistura de óleo contendo fosfatidilcolina a 13 % e esterol de planta a 7 %. (Tabela 27).

Tabela 27:

	%
Lecitina Avanti	12,0
Esterol de planta, Generol 122N	6,6
Óleo de palma 43	71,4
Glicerol	5,0
Transferase imobilizada #178, 45 U/g	2,0
Água	3,0

[000772] A lecitina, o esterol de planta e o óleo de soja foram aquecidos a 46°C e o esterol de planta foi dissolvido. Foi acionada a transferase imobilizada.

[000773] A reação transferase continuou a 46°C durante a agitação com agitador magnético. As amostras foram retiradas para análises depois 1/2, 1, 3, 6 e 24 horas e analisadas por TLC. A reação foi parada depois de 24 horas e a enzima imobilizada foi recuperada por filtração.

[000774] As amostras foram analisadas por TLC como mostrado na Figura 65.

[000775] A análise TLC claramente mostra o efeito de transferase imobilizada de *A. salmonicida* na transformação de colesterol no éster de colesterol. Também é observado que é formada uma pequena quantidade de monoglicerídeo. A enzima também foi mostrada possuindo uma alta atividade em ambientes com elevada concentração de água (de 6 a 89 %), no uso da transferase, e com outras transferases para uso na invenção, desse modo também podem ser usadas em aplicações de enzimas imobilizadas em ambientes contendo uma quantidade de água significativa. Isto permite a substituição dos solventes utilizados pela atual lipases imobilizada no

bioconversor de lipídios que usam transferases.

EXEMPLO 16: A transferase da *Aeromonas hydrophila* pode transferir de um fosfolipídio para um esterol para formar éster de esterol, e/ou uma molécula de açúcar para formar um éster de açúcar.

[000776] Uma enzima lipídio acil transferase de *Aeromonas hydrophila* expressa em *E. coli* (Hydro 0303 HVP), marcada #139 foi purificada em uma *Chelating Sepharose FF*, HR 2,5/10 colunas e analisada para atividade fosfolipase. A atividade transferase foi avaliada na gema de ovo para atividade de enzima e na gema de ovo para funcionalidade da enzima. A enzima também foi testada na gema de ovo contendo glicose.

Atividade de fosfolipase.

[000777] Transferase #139 isolada de um *Chelating Sepharose FF*, HR 2,5/10 colunas foi ensaiada por NEFA-PLU(pH7). A atividade foi de 1,15 Unidades NEFA-PLU/ml.

Gema de ovo.

[000778] Em uma aplicação de testagem inicial, foi testada a transferase #139 na gema de ovo segundo o seguinte procedimento:

[000779] Foi pesado 1 g de gema de ovo fresca em um frasco de 10 ml com tampa de rosca. Foi adicionada a preparação de enzima e o frasco foi misturado em vórtice. A amostra foi colocada a 37°C e agitada com um agitador magnético.

[000780] A reação foi parada pela adição de 7,5 ml de uma mistura de Clorofórmio:Metanol (2:1) e agitada em um misturador Whirley durante 30 segundos. A fase de clorofórmio foi isolada por centrifugação e 2 µl da fase de clorofórmio foram transferidos a uma placa de TLC sílica pré-ativada e eluída com o tampão de corrida nº I. E outra TLC-placa no tampão de corrida nº IV.

[000781] O planejamento do experimento está mostrado na Tabela 28.

Tabela 28:

Teste número	Tempo de reação (min)	Peso da gema de ovo (g)	Unidades da transferase #139
-----------------	--------------------------	----------------------------	---------------------------------

1	10	1	
2	10	1	0,75 KEFA-PLU
3	60	1	0,75 KEFA-PLU
4	300	1	0,75 KEFA-PLU
5	1200	1	
6	1200	1	0,75 KEFA-PLU

[000782] A análise de TLC é mostrada na Figura 66 e na Figura 67. A análise TLC claramente demonstra a reação transferase da transferase #139. O colesterol é convertido ao éster de colesterol e a quantidade de lecitina é reduzida. Os resultados, contudo também indicam que lisolecitina só é acumulada em uma quantidade muito pequena porque transferase #139 também é ativa a sobre a lisolecitina. Esta observação é apoiada pela formação de ácidos graxos livres (FFA).

Gema de ovo e glicose

[000783] Foi anteriormente mostrado que a transferase da *Aeromonas salmonicida* (#138) foi capaz de usar a glicose como molécula receptora em uma reação transferase. Também foi testado se a transferase #139 pode usar a glicose como molécula receptora. O planejamento experimental é visto na Tabela 29.

Tabela 29:

Teste Nº	Tempo de reação (min)	Peso da gema de ovo (g)	Peso de glicose a 70 % (mg)	Unidades de transferase #139
1	10	1	500	
2	10	1	500	1 KEFA-PLU
3	60	1	500	1 KEFA-PLU
4	180	1	500	1 KEFA-PLU
5	300	1	500	1 KEFA-PLU
6	1200	1	500	1 KEFA-PLU
7	1200	1	500	

[000784] Os produtos de reação foram analisados por TLC (Figuras 68 e a Figura 69).

[000785] A análise TLC indica a formação de éster de glicose depois de 220 min de tempo de reação (Faixa 69 da Figura 6) mas depois de 1200 min de tempo de reação nenhum éster de glicose é mais visto. Por isso, deve ser concluído que transferase #139 tem tanto transferase como a atividade hidrolítica. Isto também é apoiado pelo fato de a quantidade de ácidos graxos livres firmemente aumentar como uma função do tempo de reação.

Resumo:

[000786] A transferase de *Aeromonas hydrophila* foi testado na gema de ovo. Os resultados confirmam que esta enzima catalisa a formação de éster de colesterol concomitante com a formação de lisolecitina. Depois de longo tempo de reação quando a maior parte do colesterol foi consumido ácido graxo livre também é formado. Por isso, pode ser concluído que a enzima tem a atividade transferase primária, mas também a atividade hidrolítica que é observada quando só a água foi disponível como molécula doadora.

[000787] Em um experimento com gema de ovo e glicose foi observado que transferase de *Aeromonas hydrophila* é capaz de catalisar a formação de éster de glicose *in situ* em um ambiente alimentício com elevada quantidade de água (Figura 70).

EXEMPLO 17: Variantes de uma enzima lipídio acil transferase de *Aeromonas hydrophila* (Ahyd2) (SEQ ID N° 36 (ver a Figura 71)).

[000788] Foram introduzidas mutações usando o kit de mutagenese direcionada “QuikChange® Multi-Site” da Stratagene, La Jolla, CA 92037, EUA, depois das instruções fornecidas pela Stratagene.

[000789] As variantes em Tyr256 mostraram atividade aumentada para fosfolipídios.

[000790] As variantes em Tyr256 e Tyr260 mostraram atividade aumentada para a galactolipídios.

[000791] As variantes em Tyr265 mostram atividade transferase aumentada com galactolipídios como o doador acil.

[000792] Os números indicam posições quanto à sequência seguinte: Uma enzima de *Aeromonas hydrophila* a sequência de aminoácidos da qual é mostrada como SEQ ID Nº 36 na Figura 71 (os aminoácidos sublinhados mostram um peptídeo de sinal de xylanase). A sequência de nucleotídeos é tal como mostrada na SEQ ID Nº 54 na FIGURA 72.

EXEMPLO 18: Uso de reação Acil transferase para a produção de éster de esterol de planta e monoglicerídeo para a produção de margarina.

[000793] Uma acil transferase de *Aeromonas salmonicida* expressa no *Bacillus subtilis* foi testada em uma mistura de óleo de palma que contém lecitina de planta, esterol de planta e glicerol. A enzima acil transferase mostrou a capacidade de utilizar tanto o esterol de planta como o glicerol como moléculas receptora durante a produção do éster de esterol de planta e monoglicerídeo. A mistura de reação foi usada para produzir uma margarina de mesa de boa qualidade baseada no monoglicerídeo na mistura de reação e ao mesmo tempo a margarina foi enriquecida pelo éster de esterol de planta, que foi mostrado como possuindo um efeito de redução do colesterol. O objetivo deste trabalho foi estudar a possibilidade de produzir monoglicerídeo e éster de esterol de planta pela reação enzimática de lecitina, esterol de planta e glicerol dissolvidos na gordura vegetal.

[000794] Os experimentos iniciais mostraram que foi possível usar acil transferase de *Aeromonas salmonicida* para produzir monoglicerídeo e o éster de esterol de planta a partir de lecitina, glicerol e esterol de planta.

[000795] Neste experimento tal mistura de reação foi usada para produzir a margarina de mesa.

Materiais:

Lipídio acil transferase de *Aeromonas salmonicida*, #196 C101, 18.6 PLU/g (Jornal 2254-104).

Óleo de Palma 43, de Aarhus Unido, DK.

L-a-Fosfatidilcolina 95 % de Planta (Avanti #441601).

Esterol de planta: Generol N122 de Cognis, Alemanha.

Glicerol Item n. 085915.

Monoglicerídio Destilado, Dimodan HP da Danisco.

Produção de margarina.

1. Misturar os ingredientes da fase aquosa. (se necessário, aquosos pasteurize a fase aquosa aquecendo-a a aproximadamente 80°C). Ajuste o pH para 5,5.
2. Derreter a fase graxa a uma temperatura de aproximadamente 40 a 45°C.
3. Aquecer o emulsificante com um pouco do óleo em uma proporção de 1 parte de emulsificante para 5 partes de óleo a uma temperatura entre 75 a 80°C, que está entre 5 a 10°C mais elevada do que o ponto de fusão do emulsificante. Quando esta mistura estiver completamente derretida e bem misturada, junte-a ao restante do óleo aquecido, agitando continuamente.
4. Acrescentar o aromatizante.
5. Acrescentar a fase aquosa à fase graxa, agitando continuamente.
6. Esfriar em um resfriador tubular (de capacidade normal e com esfriamento normal) até uma temperatura de saída de 8 a 10°C.

Resultados

[000796] Acil transferase de *A. salmonicida* foi testada em uma mistura de óleo de palma tal como mostrado na Tabela 30. A lecitina, o esterol de planta, o glicerol e o óleo de palma foram aquecidos até 60°C sob agitação de modo a solubilizar o esterol da planta e a lecitina.

Tabela 30:

Substrato	%
Lecitina – da Avanti	12
Esterol da planta, Generol 122N	6,6
óleo de palma, ponto de fusão 43°C	76,4
Glicerol	5

[000797] O substrato foi esfriado a 48°C e acil transferase #196 foi adicionada na quantidade mostrada na Tabela 31. A mistura de reação foi

guardada a 48°C durante 24 horas sob agitação lenta.

Tabela 31:

	gramas
Substrato	220
Transferase #196 C101, 18.6 PLU/g	15

[000798] Amostras da mistura de reação foram tiradas depois de um tempo de reação de 1, 4 e 24 horas, e analisadas por TLC no solvente I (Figura 73). Os resultados da TLC claramente mostraram a formação do éster de esteroide de planta e monoglicerídeo. Na Figura 73, a primeira Faixa é depois de um tempo de reação de 1 hora, a Faixa 2 é de um tempo de reação de 4 horas, a Faixa 3 é de um tempo de reação de 24 horas e a Faixa 4 é de um esteroide de planta.

[000799] A reação foi parada depois de 24 horas tempo de reação e os resíduos de esteroide de planta não dissolvidos foram retirados, e a solução limpa foi usada para produzir a margarina.

Margarina.

[000800] A mistura de reação que contém monoglicerídeo e éster de esteroide de planta foi usada para produzir a margarina de mesa segundo a receita mostrada na Tabela 32.

Tabela 32:

Jour Nº 3734	1	2
Fase aquosa		
Fase aquosa	16	16
Sal	0,5	0,5
Leite em pó desnatado	1	1
Sorbato de potássio	0,1	0,1
EDTA	0,015	0,015
pH	5,5	5,5
Fase Aquosa Total	16,6	16,6

Fase oleosa		
Óleo de palma 43	25	25
Óleo de canola	75	75
Fase Oleosa Total	83,2	78,4
Dimodan HP	0,2	
Mistura reacional		5

[000801] A margarina produzida da mistura de reação foi avaliada como de boa qualidade com bom espalhamento, e boa sensação de boca e sem qualquer sabor desagradável. A margarina estava comparativamente em um nível de qualidade equivalente ao da margarina de referência produzida pela Dimodan HP usando monoglicerídeos destilados.

[000802] A única diferença observada foi que a margarina Jour 3734, com a mistura de reação nº 2, ficou ligeiramente mais firme, o que foi explicado pelo fato que esta receita conteve mais óleo de Palma 43 do que a margarina de referência.

EXEMPLO 19: Uso de uma enzima lipídio acil transferase durante a produção de pão.

[000803] Uma das limitações de se usar lipases na produção do pão é que o ácido graxo livre é formado durante a reação lipase. É bem conhecido que a formação de muito o graxo livre terá um impacto negativo no desempenho do cozimento da massa de farinha, porque o glúten se torna demasiadamente rígido, formando uma massa de farinha compacta (isto é menos elástica) que não pode se expandir durante a fermentação e o cozimento.

[000804] A formação de ácido graxo livre também deve ser evitada do ponto de vista da estabilidade oxidativa, porque os ácidos graxos livres são mais propensos à oxidação de lipídio do que o correspondente triglicerídeo.

[000805] Na presente invenção os problemas com a formação de

ácidos graxos livres quando se adiciona uma enzima lipolítica a uma massa de farinha foram superados pela utilização de uma enzima lipídio acil transferase que, em vez de produzir ácidos graxos livres, transfere um ou mais ácidos graxos do lipídio acil doador para uma molécula receptora não aquosa presente na massa de farinha, como um carboidrato, uma proteína ou peptídeo, ou se usado no pão com a gordura de leite, a um esteroide, alternativamente ou em combinação com outros receptores listados acima que podem ser acrescentados na massa de farinhada, por exemplo, fitoesteróis ou fitoestanois. Preferivelmente, a molécula receptora em uma massa de farinha pode ser uma ou várias entre glicose, sacarose ou maltose e/ou outros carboidratos normalmente disponíveis em uma massa de farinha.

[000806] Nos experimentos seguintes a acil transferase é testada em experiências de produção de pão em mini escala. A formação de produtos de reação, e os componentes lipídicos na massa de farinha são completamente avaliáveis já que comprovadamente podem ser completamente extraídos com água saturada com butanol e analisados por HPLC e análise GLC.

Materiais e métodos:

Enzimas:

Acil Transferase, 550 PLU-7/ml.

Lipopan™ F BG, uma lipase comercial da Novozymes. 12000 LIPU/g ou Grindamyl Exel 16.12000 LIPU/g.

Lecitina pó, 95 % fosfolipídio (disponível pela Danisco A/S, Dinamarca).

Digalactosil diglicerídeo da farinha de trigo integral (de Sigma D4651).

Farinha:

[000807] Sølvmel nº 2001084 (farinha de trigo dinamarquesa, obtida de Havnemøllerne, Odense, Dinamarca).

Mini teste de cozimento:

[000808] Farinha 50 gramas, levedura Seca 10 gramas, glicose 0,8 gramas, sal 0,8 gramas, 70 ppm e ácido ascórbico e, água 400 unidades Brabender foram sovados em um misturador Brabender para cerca de 50 g durante 5 minutos a 30°C.

[000809] O tempo de descanso foi 10 minutos a 34°C. A massa de farinha foi pesada para separar pedaços da massa de farinha de 15 g cada. São então moldadas em um dispositivo especial onde a massa de farinha é rolada entre uma placa de madeira e uma armação de plexiglas. As massas de farinha são então resguardadas em formas de assadeira por 45 minutos a 34°C, e são assadas em fornos caseiros do tipo Voss por 8 minutos a 225°C.

[000810] Depois de assar os pães são esfriados à temperatura ambiente e depois de 20 minutos os pães são pesados e o volume é determinado pelo método do deslocamento da semente de canola. Os pães então cortados e são avaliados o miolo e a casca.

Resultados e conclusão:

[000811] Os resultados preliminares indicam que a enzima lipídio acil transferase claramente demonstrou um efeito positivo tanto no volume do pão como na aparência do pão. Em particular, os resultados preliminares indicam que o uso da enzima lipídio acil transferase resulta no volume específico do pão aumentado comparando com o que foi obtido com o controle (nenhuma enzima) e isto obtido com o uso de uma enzima lipolítica comercialmente disponível, nominalmente Grindamyl Exel 16 ou LipopanF™.

EXEMPLO 20: sorvete padrão com gordura de leite.

[000812] A função dos emulsificantes utilizados nos sorvetes é para trazer certo controle, na cristalização da gordura e na desestabilização gradual do sorvete devido a desabsorção da proteína durante o envelhecimento do solvente. Essas alterações melhoram a qualidade do sorvete. Normalmente são utilizados mono e diglicerídeos para a produção de sorvetes, mas também se conhece o uso de emulsificantes polares como os polissorbatos e os ésteres de açúcar em combinação com os mono e diglicerídeos para facilitar a desestabilização controlada da gordura e produzir um sorvete mais cremoso e de estrutura mais suave e lisa.

[000813] Os emulsificantes utilizados nos sorvetes são normalmente adicionados na mistura de sorvete na forma de pó. Recentemente, entretanto mostrou-se que os mono e diglicerídeos podem ser produzidos por reação

enzimática da gordura existente nas receitas de sorvete pela ação da lipase. O problema de se utilizar lipase, entretanto é que a lipase também catalisar a formação de ácidos graxos livres, quando a água está disponível na mistura de reação.

[000814] Entretanto é surpreendente observar que a lipídio acil transferase supera a limitação da lipase devido a acil transferase ser capaz de transferir o ácido graxo da lecitina e outros lipídios/moléculas aos receptores como o estero, colesterol, a glicose, o glicerol e a de proteínas e os peptídeo sem a formação de quantidades significantes de ácidos graxos livres.

[000815] Um dos principais ingredientes do sorvete é o creme de leite contendo 38 % de gordura de leite. O creme de leite também contém pequenas quantidades de lecitina, que um doador de moléculas para a acil transferase. ("*Complex milk lipids account for about 1 % of the total milk fat and are mainly composed of phospholipids*". Ref. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry Copyright© 2003 da Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.). O creme de leite também contém pequenas quantidades de colesterol, que era uma molécula receptora para a acil transferase.

[000816] Dos constituintes do sorvete, é assim possível produzir tanto monoglicerídeo como emulsificantes polares como liso-lecitina e éster de açúcar, que são conhecidos pelos efeitos benéficos que causam na produção de sorvete.

[000817] Um novo efeito benéfico forma-se a reação de acil transferase e o creme de leite que é a formação de éster de colesterol, que poderia diminuir a absorção de colesterol no intestino.

Receita de sorvete.

	Com emulsificante	Como enzima
O creme de leite e 38 %	23,65	23,65
Leite desnatado	53,30	53,30
Leite é pó desnatado	4,90	11,30

	Com emulsificante	Como enzima
Açúcar	12,00	12,00
Xarope de glicose, DE 42, 75% TS	4,25	4,25
Glicerol	1,0	1,0
Mistura estabilizadora	0,2	0,2
Cremodan SE 30	0,6	
Lipídio acil transferase, 500 PLU/g		0,1
Aromatizante Grindsted 2976	0,1	0,1
Pigmentos	+	+

Processo para a produção de sorvete.

1. Aquecer o creme de leite, o xarope de glicose e o glicerol a aproximadamente 40°C. Acrescentar a lipídio acil transferase e deixam a mistura reagir durante 30 minutos. Uma amostra é tirada para a análise.
2. Aqueça todos os outros ingredientes líquidos a aproximadamente 40°C.
3. Acrescente outros ingredientes secos. (a mistura de estabilizador é misturada com o açúcar antes da adição).
4. Quando os ingredientes secos estiverem dissolvidos acrescentam a mistura de glicose creme de leite.
5. Pasteurizar a 80 - 85°C / 20 - 40 segundos.
6. Homogeneíze a 80°C (190 bar para a receita 1 e 175 bar da receita 2).
7. Resfriar até a temperatura de envelhecimento, 4°C.
8. Congelar em sorveteria contínua até a desejada expansão (100 % recomendado).
9. Deixar solidificar a - 40°C.
10. Armazenar abaixo de - 25°C.

Resultados

[000818] O uso da acil transferase na produção de sorvete contribui

para a produção de um sorvete com gosto muito bom e excelente sensação cremosa na boca, comparável quando se prepara o sorvete com o emulsificante comercial Cremodan SE 30. O derretimento do sorvet produzido pelo lipídio acil transferase também é melhorado.

Exemplo 21: Acil transferase em Queijo.

[000819] O queijo é o fresco ou maturado, produto sólido ou semisólido obtido coagulando leite, leite desnatado, leite parcialmente desnatado, a nata, a nata do soro do leite, ou o leitelho, ou qualquer combinação desses materiais, pela ação do coalho ou outros agentes de coagulação convenientes, e parcialmente drenando do soro de leite que resulta de tal coagulação.

[000820] O rendimento de queijo depende principalmente da gordura e conteúdos de proteína do leite. O sal (especialmente sais de cálcio) e concentrações de proteína, bem como a acidez, são muito importantes para a coagulação. (Ref. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* Copyright© 2003 da Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.).

[000821] Tal esforço foi feito para otimizar e aumentar o rendimento de queijo na otimização do processo de fabricação do queijo (USP 4.959.229) ou pela utilização de métodos de coagulação melhorados (USP 4.581.240), que aumentam a quantidade da proteína do soro do leite no coalho.

[000822] Na presente invenção a quantidade da proteína do soro do leite no coalho é aumentado pela modificação enzimática da proteína do soro do leite pelo tratamento do leite durante a manufatura do queijo com um lipídio acil transferase.

[000823] Quando um ácido graxo está covalentemente ligado a uma proteína não-membrana como β -lactoglobulina, as propriedades físicas e funcionais irão se modificar drasticamente.

[000824] Para a produção de queijo da presente invenção acil o transferase é acrescentado ao leite antes ou ao mesmo tempo em que o coalho é acrescentado ao leite.

[000825] Durante a precipitação da caseína, a acil transferase é capaz de usar lecitina e outros lipídios no leite como doador e usar peptídios ou

proteína como molécula receptora durante a formação de proteína acilada ou peptídios acilados.

[000826] A modificação nas propriedades hidrofóbicas da proteína do leite contribui para um aumento da precipitação de proteína no coalho durante a produção de queijo.

[000827] Como o aumento no rendimento de queijo obtido pela presente invenção origina-se da retenção aumentada no coágulo do queijo da proteína que é normalmente perdida no soro de leite, um método conveniente, diretamente relacionado ao mecanismo da invenção, está baseado na determinação da quantidade da proteína que termina no soro de leite. Menos proteína no soro de leite necessariamente significa mais proteína no coalho, e rendimento de queijo mais alto.

[000828] O teste da quantidade da proteína no soro de leite pode ser executado do seguinte modo. Leite desnatado ou integral é aquecido a uma temperatura conveniente para a coagulação de coalho, tipicamente 30 – 35°C em um copo grande 100 ml. Opcionalmente é acrescentado 1 % em volume de bactérias ácido láctico, e coalho padrão é acrescentado em uma quantidade correspondente a, por exemplo, 0,03 - 0,05 %. Quando o leite se converteu em um coágulo bastante sólido para permitir que ele seja cortado em cubos com um comprimento de lado de aproximadamente 0,5 cm, tal corte é feito com uma faca amolada. Desse modo se inicia a dessoração, e depois de 30 minutos de um período de espera, que permite que o coalho se assente, uma amostra do soro do leite é retirada, e centrifugada em uma centrífuga de laboratório por 10 minutos. Esta amostra é analisada para o conteúdo de proteína, usando, por exemplo, o método Kjeldahl. Alternativamente, e/ou como um complemento, a amostra pode ser analisada com métodos que permitem que seja estabelecido o tipo e a quantidade dos componentes de proteína individuais.

EXEMPLO 22 “Ensaio em Ambiente com Baixa Quantidade de Água”

[000829] Reações de transferase de enzimas lipolíticas em ambiente

de pouca água.

Procedimento

Materiais

Colesterol cat. Sigma. C8503

L-alpha-Fosfatidilcolina 95 % (Planta) Avanti #441601

Óleo de soja, Aarhus Unido, DK.

Clorofórmio, de grau Analítico.

Enzimas

#179, GCAT de *A. salmonicida*

2427, Fosfolipase A1 de *Fusarium oxysporum*. LIPOPAN® F de Novozymes, Dinamarca.

#1991, Fosfolipase A2 de Pâncreas, LIPOMOD 22L de Biocatalysts, Reino Unido.

#2373, *Candida Antarctica* lipase, Novozyme 525 L da Dinamarca Novozymes.

Ensaio de enzima

[000830] 13.1 % de lecitina e 6.6 % de colesterol são dissolvidos no óleo de soja aquecido a 60°C com agitação.

[000831] O substrato foi pesado em um frasco de vidro Wheaton de 20 ml e aquecido a 46°C.

[000832] A água e a solução de enzima foram acrescentadas e o cronômetro foi disparado.

[000833] Foram coletadas amostras de 50 mg em intervalos regulares que foram transferidas para um frasco Dram de 10 ml e congeladas.

[000834] Os lipídios isolados foram analisados por GLC.

Análise de GLC.

[000835] A análise de GLC foi executada tal como descrita no Exemplo 11.

Resultados

[000836] O experimento foi planejado como mostrado na Tabela 33.

[000837] O substrato a base de óleo de soja contendo 13,1 % de

lecitina e 6,6 % de colesterol, foi aquecido a 46°C. A solução de enzima foi acrescentada e o cronômetro iniciado.

[000838] Depois de 30, 60 e 120 minutos de tempo de reação as amostras foram tiradas para a análise de GLC.

Tabela 33:

		1	2	3	4	5
Substrato	gramas	5	5	5	5	5
Transferase#179-	ml		0,3			
C72, 56PLU-7/ml						
#2427, 200 PLU-7/ml	ml			0,3		
Pâncreas PLA	2 ml				0,3	
#1991 6300 PLU/ml						
Novozyme 525 L,	ml					0,3
#2373, 200 LIPU/ml						
Água	ml	0,3				
% de água		6	6	6	6	6

[000839] Os resultados da análise GLC estão mostrados na Tabela 34. Os resultados são expressos em percentual baseada na composição total de amostra. Baseado no resultado do GLC foi possível calcular a quantidade de ácido graxo e éster de colesterol produzido pela reação enzimática quanto à amostra de controle sem acrescentar enzima. Nessas condições experimentais o total de atividade enzimática foi previsto como a atividade hidrolítica medida pela formação de ácidos graxos livres e a atividade transferase prevista foi avaliada pela formação do éster de colesterol. Desses resultados e com a informação do peso molecular do ácido graxo e do éster de colesterol foi possível calcular a atividade hidrolítica molar relativa e a atividade transferase molar relativa como mostrado na Tabela 35.

Tabela 34:

Enzima	Tempo de Retenção	Ácido Graxo %	Colesterol %	Éster de colesterol
--------	-------------------	---------------	--------------	---------------------

	(min)			%
controle	120	0,533	7,094	0,000
#179	30	0,770	5,761	2,229
#179	60	0,852	5,369	2,883
#179	120	0,876	4,900	3,667
#2427	30	3,269	7,094	0,000
#2427	60	3,420	7,094	0,000
#2427	120	3,710	7,094	0,000
#1991	30	2,871	7,094	0,000
#1991	60	3,578	7,094	0,000
#1991	120	3,928	7,094	0,000
#2373	30	1,418	7,094	0,000
#2373	60	1,421	7,094	0,000
#2373	120	1,915	7,094	0,000

Tabela 35:

Enzima	Tempo de reação em minutos	ácido graxo produzido	Colesterol usado	Éster de colesterol produzido	% atividade hidrolítica	% atividade transferase
#179	30	0,238	1,334	2,229	20	80
#179	60	0,319	1,725	2,883	21	79
#179	120	0,343	2,195	3,667	18	82
#2427	30	2,737	0,000	0,000	100	0
#2427	60	2,887	0,000	0,000	100	0
#2427	120	3,177	0,000	0,000	100	0
#1991	30	2,338	0,000	0,000	100	0
#1991	60	3,046	0,000	0,000	100	0
#1991	120	3,395	0,000	0,000	100	0
#2373	30	0,885	0,000	0,000	100	0

#2373	60	0,885	0,000	0,000	100	0
#2373	120	1,383	0,000	0,000	100	0

Conclusão

[000840] Nesses experimentos foi observado que todas as enzimas testadas mostraram a atividade hidrolítica porque a quantidade de ácido graxo aumentou. Entretanto a única enzima que mostrou a atividade transferase foi GCAT da *A. salmonicida*. Por isso, é concluído que em um sistema oleoso com lecitina e colesterol que contém água a 6 %, fosfolipase A1 de *Fusarium oxysporum*, fosfolipase A2 do pâncreas e uma lipase de *Candida antárctica* só mostrou a atividade hidrolítica.

[000841] Todas as publicações mencionadas nas especificações mencionadas acima, são aqui incorporadas pela referência. Várias modificações e as variações dos métodos descritos e o sistema da presente invenção serão evidentes àqueles experientes na técnica sem fugir do escopo e do espírito da presente invenção. Embora a presente invenção tenha sido descrita com relação a modalidades preferenciais específicas, deve ser entendido que a invenção como reivindicado não deve ser indevidamente limitada a tais reivindicações específicas. De fato, várias modificações dos modos descritos para executar a invenção, que são óbvios para aqueles experimentados em bioquímica e biotecnologia ou campos relacionados, são compreendidas como estando dentro do escopo das seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma lipídio acil transferase para preparar, a partir de um material alimentício, um produto de massa ou um produto assado compreendendo um emulsificante **caracterizado pelo fato de** que o emulsificante é gerado a partir dos constituintes do material alimentício pela lipídio acil transferase

em que a lipídio acil transferase compreende o motivo da sequência de aminoácidos GDSX, em que X é um ou mais dos seguintes resíduos aminoácidos L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M ou S.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de** que o produto de massa ou produto assado é um pão, um produto frito, um salgadinho, bolos, tortas, brownies, biscoitos, macarrões, itens de lanche ou massa.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, **caracterizado pelo fato de** que o produto de massa ou produto assado é um pão.

4. Uso, de acordo com as reivindicações de 1 a 3, **caracterizado pelo fato de** que pelo menos dois emulsificantes são produzidos.

5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado pelo fato de** que pelo menos um dos emulsificantes é um éster de carboidrato.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo fato de** que pelo menos um dos emulsificantes é um éster de proteína.

7. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado pelo fato de** que um ou mais de éster de esterol ou éster de estanol ou éster de proteína ou éster de carboidrato ou um diglicerídeo ou monoglicerídeo é produzido *in situ* no gênero alimentício.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo fato de** que o éster de esterol é um ou mais de éster de alfa sitosterol, éster de beta sitosterol, éster de estigmasterol, éster de ergosterol, éster de campesterol ou

éster de colesterol.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo fato de** que o éster de estanol é um ou mais de beta-sitostanol ou ss-sitostanol.

10. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado pelo fato de** que a lipídio acil transferase é uma que quando testada usando o Ensaio de Transferase em uma Gema de Ovo com Elevada Quantidade de Água em uma gema de ovo com 54 % de água, tem até 100 % de atividade de transferase relativa.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado pelo fato de** que a lipídio acil transferase tem uma porcentagem inicial de atividade de acil transferase medida após 10 % do consumo da molécula doadora de pelo menos 1 % da atividade de transferase relativa.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado pelo fato de** que a porcentagem inicial de atividade de acil transferase medida após 10 % do consumo da molécula doadora é de pelo menos 5 %.

13. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado pelo fato de** que a lipídio acil transferase é uma que quando testada usando o Ensaio de Transferase em Substrato Tamponado tem pelo menos 2 % de atividade de acil transferase.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado pelo fato de** que o substrato acceptor de acil é um carboidrato, uma proteína, um esterol, um estanol ou glicerol.

15. Uso, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado pelo fato de** que o substrato acceptor de acil é um carboidrato.

16. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado pelo fato de** que a lipídio acil transferase é uma que quando testada usando o Ensaio de Transferase em um Ambiente com Baixa Concentração de Água tem uma atividade de transferase relativa de pelo menos 1 %.

17. Uso, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado pelo fato de**

que o substrato acceptor de acil é um carboidrato, uma proteína, um esterol, um estanol ou glicerol.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado pelo fato de** que o substrato acceptor de acil é um carboidrato.

19. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado pelo fato de** que a lipídio acil transferase é definida como uma enzima que possui atividade de acil transferase e que compreende o motivo da sequência de aminoácido GDSX, em que X é um ou mais dos seguintes resíduos de aminoácidos L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M ou S.

20. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado pelo fato de** que a lipídio acil transferase compreende a H-309 ou compreende um resíduo de histidina em uma posição correspondente a His-309 na sequência de aminoácidos da enzima lipolítica da *Aeromonas hydrophila* mostrada como SEQ ID Nº 2 ou SEQ ID Nº 32.

21. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado pelo fato de** que a lipídio acil transferase é obtida de um organismo de um ou mais dos seguintes gêneros: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfitobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* e *Candida*.

22. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado pelo fato de** que a lipídio acil transferase compreende uma ou várias das seguintes sequências de aminoácidos: (i) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID Nº 2; (ii) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID Nº 3; (iii) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID Nº 4; (iv) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID Nº 5; (v) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID Nº 6; (vi) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID Nº 12, (vii) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID Nº 20, (viii) a sequência de aminoácidos mostrada

como SEQ ID N° 22, (ix) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 24, (x) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 26, (xi) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 28, (xii) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 30, (xiii) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 32, (xiv), ou a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 34.

23. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado pelo fato de** que o emulsificante é um ou mais dentre os seguintes: um monoglicerídeo, uma lisofosfatidilcolina, um digalactosil monoglicerídeo (DGMG).

24. Método de produção de um produto de massa ou um produto assado compreendendo um emulsificante **caracterizado pelo fato de** que o método compreende a etapa de adicionar uma lipídio acil transferase a um produto de massa ou um produto assado

em que a lipídio acil transferase compreende o motivo da sequência de aminoácidos GDSX, em que X é um ou mais dos seguintes resíduos aminoácidos L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M ou S.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado pelo fato de** que o produto de massa ou produto assado é um pão, um produto frito, um salgadinho, bolos, tortas, brownies, biscoitos, macarrões, itens de lanche ou massa.

26. Método, de acordo com a reivindicação 24 ou a reivindicação 25, **caracterizado pelo fato de** que o produto de massa ou produto assado é um pão.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 24 a 26, **caracterizado pelo fato de** que pelo menos dois emulsificantes são produzidos.

28. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 24 a 27, **caracterizado pelo fato de** que a lipídio acil transferase é uma que é capaz de transferir um grupo acil de um lipídio para um ou mais dos seguintes aceptores

de acil: um estero, um estanol, um carboidrato, uma proteína ou uma subunidade dos mesmos, glicerol.

29. Método, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado pelo fato de** que pelo menos um dos emulsificantes é um éster de carboidrato.

30. Método, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado pelo fato de** que pelo menos um dos emulsificantes é um éster de proteína.

31. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 24 a 30, **caracterizado pelo fato de** que um ou mais de éster de estero ou éster de estanol ou éster de proteína ou éster de carboidrato ou um diglicerídeo ou monoglicerídeo é produzido *in situ* no gênero alimentício.

32. Método, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado pelo fato de** que o éster de estero é um ou mais dentre o éster de alfa sitosterol, éster de beta sitosterol, éster de estigmasterol, éster de ergosterol, éster de campesterol ou éster de colesterol.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado pelo fato de** que o éster de estanol é um ou mais dentre o beta-sitostanol ou ss-sitostanol.

34. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 24 a 33, **caracterizado pelo fato de** que a lipídio acil transferase é uma que quando testada usando o Ensaio de Transferase em uma Gema de Ovo com Elevada Quantidade de Água em uma gema de ovo com 54 % de água, tem até 100 % de atividade de transferase relativa.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, **caracterizado pelo fato de** que a lipídio acil transferase tem uma porcentagem inicial de atividade de acil transferase medida após 10 % do consumo da molécula doadora de pelo menos 1 % da atividade de transferase relativa.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, **caracterizado pelo fato de** que a porcentagem inicial de atividade de acil transferase medida após 10 % do consumo da molécula doadora é de pelo menos 5 %.

37. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 24 a 35,

caracterizado pelo fato de que a lipídio acil transferase é uma que quando testada usando o Ensaio de Transferase em Substrato Tamponado tem pelo menos 2 % de atividade de acil transferase.

38. Método, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado pelo fato de** que o substrato acceptor de acil é um carboidrato, uma proteína, um esterol, um estanol ou glicerol.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, **caracterizado pelo fato de** que o substrato acceptor de acil é um carboidrato.

40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 24 a 39, **caracterizado pelo fato de** que a lipídio acil transferase é uma que quando testada usando o Ensaio de Transferase em um Ambiente com Baixa Concentração de Água tem uma atividade de transferase relativa de pelo menos 1 %.

41. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 24 a 40, **caracterizado pelo fato de** que a lipídio acil transferase é definida como uma enzima que possui atividade acil transferase e que compreende o motivo da sequência de aminoácido GDSX, em que X é um ou mais dos seguintes resíduos de aminoácidos L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M ou S.

42. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 24 a 41, **caracterizado pelo fato de** que a lipídio acil transferase compreende a H-309 ou compreende um resíduo de histidina em uma posição correspondente a His-309 na sequência de aminoácidos da enzima lipolítica da *Aeromonas hydrophila* mostrada como SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 32.

43. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 24 a 42, **caracterizado pelo fato de** que a lipídio acil transferase é obtida de um organismo de um ou mais dos gêneros seguintes: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfitobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* e *Candida*.

44. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 24 a 43, **caracterizado pelo fato de** que a lipídio acil transferase compreende uma ou várias das seguintes sequências de aminoácidos: (i) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 2; (ii) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 3; (iii) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 4; (iv) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 5; (v) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 6; (vi) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 12, (vii) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 20, (viii) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 22, (ix) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 24, (x) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 26, (xi) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 28, (xii) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 30, (xiii) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 32, ou (xiv) a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID N° 34.

45. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 24 a 44, **caracterizado pelo fato de** que o emulsificante é um ou mais dentre os seguintes: um monoglicerídeo, uma lisofosfatidilcolina, um digalactosil monoglicerídeo (DGMG).

Figura 1

SEQ ID No. 1

```

1 ivafGDSltD geayygsdsdg ggwgaglaCr Ltallrlrar prgvdvfnrg isGrtsdGrl
61 ivDaivallF laqalglpnL pPYLsgdflr GANFAsagAt Ilptegpfli QvqPkdfksq
121 vlelrqalgI lqellrllpv ldakspdlvt imiGtNPlit saffgpkste sdrnsvvpef
181 kdnrlqlkr Lrsnngarii viitlvilnl gplGClPlkl alalassknv daagclerln
241 eevadfneal relaiskled qlrkdglpDv kgaDvpyvDl ysifqdldgi qnpsayvyGF
301 ettkaCCGyG gryNynrvCG naglcnvtak aCnpssylls flfwDgfHps ekGykavAea
361 1

```

Figura 2

SEQ ID No. 2

```

1 mkkwfvcllg lvaltvqaad srpaferivm fgdsldstgk myskmrgyIp sspyyegrf
61 sngpvwleql tnefpgltia neaeggptav aynkiawnpk yqvinnldye vtqflqkdsf
121 kpddlvilwv gandylaygw nteqdakrvr daisdaanrm vlngakeill fnlpdlgqnp
181 sarsqkvvea ashvsayhnq lllnlarqla ptgmvkifei dkqfaemlrD pgnfglsdqr
241 nacyggyvww kpfasrsast dsqIsafnpq erlaiagnpl laqavaspmA arsaatlncE
301 gkmfwdqvhP ttvvhaalse paatfiesqy eflah

```

Figura 3

SEQ ID No. 3

```

1 mkkwfvcllg lialtvqaad trpaferivm fgdsldstgk myskmrgyIp sspyyegrf
61 sngpvwleql tkqfpgltia neaeggatav aynkiawnpk yqvynnlDye vtqflqkdsf
121 kpddlvilwv gandylaygw nteqdakrvr daisdaanrm vlngakqill fnlpdlgqnp
181 sarsqkvvea vshvsayhnk lllnlarqla ptgmvkifei dkqfaemlrD pgnfglsdve
241 npcYdggyvw kpfatravst drqlsafspq erlaiagnpl laqavaspmA rrasaplnce
301 gkmfwdqvhP ttvvhaalse raatfietqy eflahg

```

Figura 4

SEQ ID No. 4

```

1 mpkpallrrvm tatvaavgtI algltdatAh aapaqatptI dyvalgdsys agsgvlpvdp
61 anllclrsta nyphviadtT garltdvtcg aaqtadftra qypgvapqlD algtgtDlvt
121 ltiggndnst finaitacgt agvlsggkgs pckdrhgtsf ddeieantyp alkeallgvr
181 arapharvaa lgyppwitpat adpscflklp laagdvpYlr aigahlnDav rraasetgat
241 yvdfsgvsdg hdaceapgtR wiepllfghs lvpvhpnaIg errmaehtmd vlgld

```

Figura 5

SEQ ID No. 5

```

1 mpkpalrrvm tatvaavgtl algltdatata aapaqatptl dyvalgdsys agsgvlpvdp
61 anllclrsta nyphviadt garltdvtcg aqtdadtra gypgvapqld algtgtdlvt
121 ltiggnadnst finaitacgt agvlsggkgs pckdrhgtsf ddeieantyp alkeallgvr
181 arapharvaa lgyppwitpat adpacflklp laagdvpplr aiqahlndav rraaeetgat
241 yvdfegvsdg hdaceapgrt wiepllfghs lvpvhpnalg errmaehtmd vlglid

```

Figura 6

SEQ ID No. 6

```

1 mdyekfillfg dsitefafnt rpiedgkdqy algaalvney trkwdilqrg fkgysrwal
61 kilpeilkhe snivmatifl gandacsagp qsvplpefid nirqmwslmk syhirpiig
121 pglvdrekwe kekseeialg yfrtnenfai ysdalaklan eekvpfvaln kafqggggda
181 wqqlitdglh fagkykifh dellkvietf ypyhpknmq yklkdwrdvl ddgsnims

```

Figura 7

Alinhamento de pfam00657.6 consenso consequente com P10480

```

*->ivafGDSlTdg.....eayygdsdggwgagladrl
iv+fGDSl+d+++ ++ ++ ++++++ ++s+g w +l + +
P10480 28 IVMFGEDELSDTgkmyskmrgylpsappYY3GRFSNGFVWLEQLNRF 74

tall..rlrarprgvcvfnrgisGrtsd3rlivDalvallFlaqlglpn
+ l + ++++++ +n+ +
P10480 75 PGLFiaNEABGGPTAVAYNKISWNPK----- 100

LpPYLsgdfllrGANPAsagAtilptsgpfliQvqFkdfksqvlelrgalg
++ ++
P10480 101 -----YQVINN 105

llqellrlipvidakspdlvtimidtNDlitsaffgpkstesdnvavpe
l+s+ +l ++ k+ dlw+++G+ND+ ++ ++ +++++
P10480 107 LDYEVTQFLQKDSFKEDDLVILWVGANDV-----LAVGWNTFQDAKR 149

fkdnlrqliklrLrsnrgariivliltvlilnlgplGCPlklalalasskn
++d +++++r+ rga+ +++++nl+ lG+ P+
P10480 149 VRDAISDAANRNV-LNGAK-----EILLFNLPDLGQEPS----- 181

vdaegclerlneavacfnearlaiskledqlrkdglpdkgadvpvyvD
+++ +e + +a+nn+l la ql+++g+++++d +++
P10480 182 ARS2KVVEAASHVSAYHNQLLLNLA-----RQLAPTGMVKLFBIKQFAE 225

lysifqdldgiqnpsayv.y...3Fe.ttkacCGyGgr.yNyn.rv.CG
+ +q+-+ + + +s+++++ +s+ +s+a+++++ +N++r+ ++
P10480 227 MLRCPQNFGLSDQRNACyGgyvvKPFa3RSASTDSQLSafNPQeRLaIA 275

nag.l.c.nvtskaC.npsayll.sflfwDgflhpsekGykavAealc-+
+++ l + +s+a++ +s+ ++++++fwD++Rp+ ++e+ e
P10480 277 GNPLLaQaVASPMAArSASTLNCA3KMPfDQVHPTTVVHAZLSRFA 322

```

Alinhamento de pfam00657.6 consenso consequente com AAG09804

```

*->ivaifGDSl7dg.....eayygdsgggwgagladrl
iv+fgDSLd+++ ++ ++ ++++++ ++s+g w +l + +
AAG09804 28 IVMFGDSLRLrgkmyskargylpsapPYEGRFSGNGFVWLEQLTKQF 74

tallrlrarprgvdvfnrgioGrtcdGrliivDalvalliPlaqelglpnlp
+g+++ n + +G+t
AAG09804 75 -----PGLTIANEAKGGAT----- 88

PYLsgdflrGANFAsagAtIlptsgpfliQvqFkdfksqvlelrqa....
++++ + +++++ +
AAG09804 89 -----AVAYNKISWNPkyj 102

..lgllqellrlilpvidakspdlvtimigtNDLitsaffgpkstesdrnw
++l+++ +l +++ k+ dl++++G+ND- ++ ++ ++
AAG09804 103 vYNNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY-----LAYGWNTEJ 144

svpefkdnrlqliklrLrsnngariivlitlviinlgplGCIPklalala
+++++d +++++r+ nge+ +++++nl+ lG+ P+
AAG09804 145 DAKRVERDAISDANRMV-LN3AK-----QILLFNLPLDQGNPS----- 181

sekndasgclerlneavadfnealrclaiskledqllkdylpdkgadv
+++ +e + +a++n+l +la +ql+++g+++++d
AAG09804 182 ----ARSKVVFAVSHVSAY+NKT..TNT..-----RQLAPTGMVKLSFIDK 222

pyvDlysfqldlgigpsayv.y...GFe.ttkacCGyGgr.yNyn.r
++++ +q+++ + ++ +++++ ++ t++ ++ ++ + +++++d
AAG09804 223 QFAEMLRDPQNEGLSDVENPCYdGgyvKFPaTRSVETDRCLSaSPQeR 272

v.CGnag.l.c.nvtakaC.npsyll.sflfwDgffpsekGykavAeal
+ +++++ l + +++++a++ +s ++++++fwD++Ep+ ++a+ c+
AAG09804 273 LaIAGNPILaQaVASPMARr3ASPLNCEGMFWDQVHPTTVVHAALSER 322

```

<-*

AAG09804

Alinhamento da pfam00657.6 consenso sequencial com NP_631558

```

*->ivaifGDSl7dg.....eayygdsgggwgagladrltallrlrarprgvdvi
+va+GDS ++g +g + +Ll + + + + +
NP_631558 12 YVALGDEYEMC-----CCVLPVDIANL-----LCLRGTASYPTV 75

nrgisGrtcdGrliiv.a.l.val)PlaqelglpnlpPYLsgdflrGANF
+ ++G++ D + + +
NP_631558 76 IADTTGAR-----ITDvTcGaAQ----- 93

AsagAtIlptsgpfliQvqFcd:ksqvlelrqelglqellrlilpvidak
+++ ++ + ++ +-
NP_631558 94 -----TADKTRAQYFQVAPQLDALGT 114

spdlvtimigtNDL.....itsaffgpkstesdravsvp
+ dlvt+ ig+ND ++ + + ++ + ++ + +k ++ + ++
NP_631558 115 GTDLVTLTIGGNDKstfinaitacgtagvLGGKGSFCKORAGTSFDDRT 164

efkdn..lrqliklrLrs.nngariivlitlviinlg.....plG
e +++ l++++ +r+++ +a++ +l +++++ ++ + - G
NP_631558 165 EANTYpaLKEALLGVRArAPARVAALGYFWITPATadpscfklplAAG 214

ClPlklalalassknvdasgclerlneavadfnealrclaiskledqllr
P+ l+ ++a n a+ + a
NP_631558 215 DVEPY-----LRAIQALINDVRRRA 234

dglpdkgadvpyvDlysfqldlgigpsayvYGFettkaCCGyGgryN
+- + +yVD+ ++
NP_631558 235 -----EETGATYVDFSGVSCG----- 250

ynrvCGnaglcmtakaC.npsyll.sflfwDgf...HpssekGykavAe
++aC+ p +++ + l+ + + + Hp++ G +-Ae
NP_631558 251 -----HLACBAKGTkwiePLLFQHSILVPMHPTNALGSKNTAE 286

al<-*
+
NP_631558 287 HT 288

```

Alinhamento da pfam00657.6 consesso sequencial com CAC42140

```

*->ivafGDSLIdgeayygdsdgggwgagladrLtalrlrarprgvdvf
+va+GDS ++G      +g + ++L      + + + ++ +
CAC42140  42  YVALGDSYSAG-----SGVLPVDRANL----LCLKSTARIPIHV 75

nrgioCxtedCzlivD.a.l.vallPlaqsiglphLpPYLegdfirGANT
+ ++Q+-      D + + +
CAC42140  76  IADTTQAE-----ITDvTnGzAQ----- 93

AsagAtI-ptscpfliQvqFkdFksqvlrlrqalqllgellrlrlpvidak
+++ ++ + ++ +-
CAC42140  94  -----TADFTRAQYFGVAPQLDALGT 114

spdlvtinigtadL.....itsaifgpkstssdravsvp
+ dlvt+ ig+ND ++ + + ++ + ++ + +k ++ - ++
CAC42140  116 GTDLVPLTIGGNDKetfinaitaogtagvleOCKKSPCKDRHCTSPDDEI 164

efkdn...lrqlikrLrs.nngariiviltlivilnlg.....plG
@ ++- L++++ +R+++ +AE+ +L ++i+++ +++ + - G
CAC42140  165 EANTYpalKEALLGVRArAPHARVAALGYFWITPNTadpccflklplAAQ 214

CIPikLalalassknvdasgulerlneavaofnealrelaiskledqirk
P+      1+ ++a n s+r a
CAC42140  215 DVFY-----LRAIQAFLNDAVRRRA----- 234

dglpdkgadvpvDlysi fgdldgiqnpcyvyCFottkaCCGyGgryN
+- + +yvD+ ++
CAC42140  235 -----EETGATYVDFSGVSDG----- 250

yrrvCGnaglcrrvtakaC.npsyll.silfwDgf...HpsakGykavAe
++aC+ p +++ + lf + + + Hs++ G +-Ae
CAC42140  251 -----HDAcAPGTRWIEPLLFHSLVpVHPNALGERRNAE 286

```

```

          al<-*
          +
CAC42140  287 HT    288
Ainhamento de pfam00657.6 consenso sequencial de com      P41734
          *->ivafGDSlTdg...eayygdsdggwgagladrLtallrilarprg
          ++FGDS+T+   +++ + + d+ ga+l + +   +r+
P41734    6  FLLFGDSITEFafntRFIEDGKDQYALGAALVNEY-----TRK 43

          vdvfnrgisGrtsdGrliivDalvallFlaqlslglpnLpPYLsgdflrGAN
          +d+ rg++G+t
P41734    44 MDILQRGFPGYT----- 55

          FAsagAtIlptsgpfliQvqFkdfksqylelrqalglqlrllrpvlida
          +r+al++l+e+l+ +
P41734    56 -----SRWALKILPILKH-----E 70

          kspdlvtimiGtNDlitsaffgpkstesdrnvsvpfkdnlrqlikrLrs
          + + ti++G+ND+   ++ +++ v++pef+dn+rq+++++s
P41734    71 SNIVMATIFLGANDA-----CSAGPQSVPLPEPIDNIRQMVSIMKS 111

          nngariivlitlviInlgplGCLFlklalalassknvdasgclerlneav
          ++++ii++++lv ++   ++ k ++ + + r+ne +
P41734    112 YHIRPIIIGPLVDREKW-----EKEKSEIALGYFRTNENF 148

          adfnealrelaiskledqlrkdglpdkvgaadvpyvDlysifqdlldgignp
          a + al +la   ++ +vp+v l+++fq+ +g++++
P41734    149 AIYSDALAKLA-----NEEKVPFVALNKAPQBBGGDAWQ 182

          sayvyGFettkaCCGyGgryNynrvCGnaglcnvtakaCnpssyllsflf
          +   l+
P41734    183 Q-----LL 185

          wDgfHpsekGykavAeal<-*
          Dg+H+s kGyk+++++l
P41734    186 TDGLHPSGKGYKIFHDEL 203

```

Figura 8

```

A.sal 1  MKKWFVCLLGLIALTVQAAADTRPAFSRIVMPGDSLSDTGKMYSKMRGYLPSSPPYYBGRF 60
          + +
A.hyd 1  MKKWFVCLLGLVALTVQAAADSRPAFSRIVMPGDSLSDTGKMYSKMRGYLPSSPPYYBGRF 60

A. sal 61  SNGPVWLEQLTKQFPGLTIANEAEGGATAVAYNKISWNPKYQVINNLDYEVTVQLQKDSF 120
          ++ +
A. hyd 61  SNGPVWLEQLTNEFPGLTIANEAEGGPTAVAYNKISWNPKYQVINNLDYEVTVQLQKDSF 120

A. sal 121  KPDDLVLWVGANDYLAYGWNTBQDAKRVDAISDAANRMVNLGAKQILLFNLFDLGQNP 180
          +
A. hyd 121  KPDDLVLWVGANDYLAYGWNTBQDAKRVDAISDAANRMVNLGAKQILLFNLFDLGQNP 180

A. sal 181  SARSQKVVEAVSHVSAYHNKLLNLARQLAPTGMVKLFEDKQFAEMLRDPQNFGLSDVE 240
          + +
A.hyd 181  SARSQKVVEAASHVSAYHNQLLLNLARQLAPTGMVKLFEDKQFAEMLRDPQNFGLSDQR 240
          ++

A. sal 241  NPCYDGGYVWKPFATRSVSTDRQLSAFSPQERLAIAGNPLLAQAVASPMARRSASPLNCE 300
          + ++ + + + + +
A. hyd 241  NACYGGSYVWKPFASRSASTDSQLSAFNPQERLAIAGNPLLAQAVASPMARRSASTLNCE 300

A. sal 301  GKMPWDQVHPTTVVHAALSERAAATFIETQYBFLAH 335
          + +
A. hyd 301  GKMPWDQVHPTTVVHAALSEPAATFIBSQYBFLAH 335

```

Figura 9

```

1  ATGAAAAAAT GGTTCGTGTG TTTATTGGGA TTGGTCGCGC TGACAGTTCA GGCAGCCGAC
61  AGCCGTCOCG CCTTCTCCCG GATCGTGATG TTTGGCGACA GCCTCTCCGA TACCGGCAAG
121  ATGTACAGCA AGATGCGCGG TTACCTCCCC TCCAGCCCCC CCTACTATGA GGGCCGCTTC
181  TCCAACGGGC CCGTCTGGCT GGAGCAGCTG ACCAACGAGT TCCCGGGCCT GACCATAGCC
241  AACGAGCGGG AAGGCGGACC GACCGCCGTG GCTTACAACA AGATCTCCTG GAATCCCAAG
301  TATCAGGTCA TCAACAACCT GGACTACGAG GTCACCCAGT TCCTGCAAAA AGACAGCTTC
361  AAGCCGGACG ATCTGGTGAT CCTCTGGGTC GGCGCCAAGC ACTATCTGGC CTATGGCTGG
421  AACACAGAGC AGGATGCCAA GCGGGTGGC GACGCCATCA GCGATGCGGC CAACCGCATG
481  GTGCTGAACG GCGCTAAGGA GATACTGCTG TTCAACCTGC CGGATCTGGG CCAGAACCCC
541  TCGGCCCCGA GCCAGAAGGT GGTGAGGGCG GCCAGCCATG TCTCCGCCTA CCACAACCAAG
601  CTGCTGCTGA ACCTGGCAGC CCAGCTGGCT CCCACCGGCA TGGTGAAGCT GTTCGAGATC
661  GACAAGCAGT TTGCCGAGAT GCTGCGTGAT CCGCAGAACT TCGGCCTGAG CGACCCAGAGG
721  AACGCCCTGCT ACGGTGGCAG CTATGTATGG AAGCCGTTTG CCTCCCGCAG CGCCAGCACC
781  GACAGCCAGC TCTCCGCCCT CAACCCGCGG GAGCGCCTCG CCATCGCCGG CAACCCGCTG
841  CTGGCCCAAG CCGTGGCCAG CCCCATGGCT GCCCAGAGCG CCAGCAACCT CAACTGTGAG
901  GGCAAGATGT TCTGGGATCA GGTCCACCCC ACCACTGTCTG TGCACGCCGC CCTGAGCGAG
961  CCGCCCGCCA CCTTCATCGA GAGCCAGTAC GAGTTCCTCG CCCAC

```

Figura 10

```

1  ATGAAAAAAT GGTTCGTGTG TTTATTGGGA TTGATCGCGC TGACAGTTCA GGCAGCCGAC
61  ACTCGCCCCG CCTTCTCCCG GATCGTGATG TTCGGCGACA GCCTCTCCGA TACCGGCAAA
121  ATGTACAGCA AGATGCGCGG TTACCTCCCC TCCAGCCCCC CCTACTATGA GGGCCGCTTC
181  TCCAACGGAC CCGTCTGGCT GGAGCAGCTG ACCAAGCAGT TCCCGGGCTC GACCATCGCC
241  AACGAAGCGG AAGGCGGTGC CACTGCCGTG GCTTACAACA AGATCTCCTG GAATCCCAAG
301  TATCAGGTCT ACAACAACCT GGACTACGAG GTCACCCAGT TCTTGCAGAA AGACAGCTTC
361  AAGCCGGACG ATCTGGTGAT CCTCTGGGTC GGTGCCAATG ACTATCTGGC ATATGGCTGG
421  AATACGAGC AGGATGCCAA GCGAGTTCGC GATGCCATCA GCGATGCGGC CAACCGCATG
481  GTACTGAACG GTGCCAAGCA GATACTGCTG TTCAACCTGC CGGATCTGGG CCAGAACCCC
541  TCAGCCCCGA GTCAAGAAGT GGTGAGGGCG GTCAGCCATG TCTCCGCCTA TCACAACAAG
601  CTGCTGCTGA ACCTGGCAGC CCAGCTGGCT CCCACCGGCA TGGTAAAGCT GTTCGAGATC
661  GACAAGCAAT TTGCCGAGAT GCTGCGTGAT CCGCAGAACT TCGGCCTGAG CGACCTCGAG
721  AACCCCTGCT ACGACGCGCG CTATGTGTGG AAGCCGTTTG CCACCCGCGG CGTCAGCACC
781  GACCCGCCAGC TCTCCGCCCT CAGTCCGCGG GAACGCTCTG CCATCGCCGG CAACCCGCTG
841  CTGGCACAGG CCGTGGCCAG TCCTATGGCC CGCCGCGAGC CCAGCCCCCT CAACTGTGAG
901  GGCAAGATGT TCTGGGATCA GGTACACCCG ACCACTGTCTG TGCACGCAGC CCTGAGCGAG
961  CCGCCCGCCA CCTTCATCGA GACCCAGTAC GAGTTCCTCG CCCACGGATG A

```

Figura 11

```

1  ATGCCGAAGC CTGCCCTTCG CCGTGTCATG ACCGCGACAG TCGCCGCCGT CGGCAGGCTC
61  GCCCTCGGCC TCACCGAGGC CACCGCCAC GCGCGGCCCG CCCAGGCCAC TCCGACCCCTG
121  GACTACGTCT CCGTCGGCGA CAGCTACAGC GCGGCTCTCG GCGTCTTGCC CGTCGACCCC
181  GCCAACTGCT TCTGTCTGCG CTCGACGGCC AACTACCCCC ACGTCATCGC GGACACGAGC
241  GGCGCCCGCC TCACGGACGT CACCTGCGGC GCGCGCGAGA CCGCGGACTT CACGCGGGCC
301  CAGTACCCG GCGTCGCACC CCAGTTGGAC GCGCTCGGCA CCGGCACGGA CCTGGTTCAGC
361  CTCACCATCG GCGCAACGA CAACAGCACC TTCATCAACG CCATCACGGC CTGCGGCACG
421  GCGGGTGTCC TCAGCGGCGG CAAGGGCAGC CCTGCAAGG ACAGGCACGG CACCTCCTTC
481  GACGACGAGA TCGAGGCCAA CACGTACCCC GCGCTCAAGG AGGCGCTGCT CCGCGTCCGC
541  GCCAGGGCTC CCCACGCCAG GGTGGCGGCT CTCGGCTACC CGTGGATCAC CCCGGCCACC
601  GCGGACCCGT CCTGCTTCCT GAAGCTCCCC CTCGCCGCCG GTGACGTGCC CTACCTGCGG
661  GCCATCCAGG CACACCTCAA CGACGCGGTC CCGCGGGCCG CCGAGGAGAC CGGAGCCACC
721  TACGTGGACT TCTCCGGGGT GTCCGACGGC CACGACGCTT GCGAGGCCCC CGGCACCCGC
781  TGGATCGAAC CGCTGCTCTT CCGGCACAGC CTCGTTCCCG TCCACCCCAA CGCCCTGGGC
841  GAGCGCGCGA TGGCCGAGCA CACGATGGAC GTCCCTCGGC TGGACTGA

```

Figura 12

```

1  TCAGTCCAGG CCGAGGACGT CCATCGTGTG CTCGGCCATG CGCCGCTCGC CCAGGGCGTT
61  GGGGTGGACG GGAACGAGGC TGTGCCCCGAA GAGCAGCGGT TCGATCCAGC GGGTGCCGGG
121 GGCCTCGCAG GCGTCGTGGC CGTCGGACAC CCCGGAGAAG TCCACGTAGG TGGCTCCGGT
181 CTCCTCGGCG GCCCGCCGGA CCGGTCGTT GAGGTGTGCC TGGATGGCCC GCAGGTAGGG
241 CACGTCACCG GCGGCGAGGG GGAGCTTCAG GAGCAGGAC GGGTCGGCGG TGGCCGGGGT
301 GATCCACGCG TAGCCGAGAG CCGCCACCCT GCGCTGCGGA GCCCTGGCGC GGACGCCGAG
361 CAGCGCCTCC TTGAGCGCGG GTACGTGTT GGCCTCGATC TCGTCGTGCA AGGAGGTGCC
421 GTGCCGTGTC TTGCAGGGGC TGCCCTTGCC GCGCTGAGG ACACCCGCCG TGCCGCAGGC
481 CGTGATGGCG TTGATGAAGG TGCTGTTGTC GTTGCCGCCG ATGCTGAGCG TGACCAGGTC
541 CGTGCCGGTG CCGAGCGCGT CCACTGGGG TGCGACGCC GGGTACTGCG CCCGCGTGAA
601 GTCGGCGGTC TGCGCGGCGC CGCAGGTGAC GTCCGTGAGG CCGGCGGCCG TCGTGTCCGC
661 GATGACGTGG GGGTAGTTGG CCGTCGAGCG CAGACAGAGC AGGTTGGCGG GGTGACGGG
721 CAGGACGCCG GAGCCGGCGC TGTAAGTGTG CCGGAGGGCG ACGTAGTCCA GGGTCGGAGT
781 GGCCCTGGCG GCGCGGCGT GGCCTGTGGC GTCGGTGAGG CCGAGGCGCA GCGTGCCGAC
841 GGCGGCGACT GTCGCGGTCA TGACACGGCG AAGGCGAGG TTCGGCAT

```

Figura 13

```

1  ATGGATTACG AGAAGTTTCT GTTATTTGGG GATTCCATTA CTGAATTTCG TTTTAATACT
61  AGGCCCATTG AAGATGGCAA AGATCAGTAT GCTCTTGGAG CCGCATTAGT CAACGAATAT
121 ACGAGAAAAA TGGATATTCT TCAAAGAGGG TTCAAAGGGT ACACTTCTAG ATGGGCGTTG
181 AAAATACCTC CTGAGATTTT AAAGCATGAA TCCAATATTG TCATGGCCAC AATATTTTGG
241 GGTGCCAACG ATGCATGCTC AGCAGGTCCC CAAAGTGTCG CCTCCCCGA ATTTATCGAT
301 AATATTCGTC AAATGGTATC TTTGATGAAG TCTTACCATA TCCGTCTAT TATAATAGGA
361 CCGGGGCTAG TAGATAGAGA GAAGTGGGAA AAAGAAAAAT CTGAAGAAAT AGCTCTCGGA
421 TACTTCCGTA CCAACGAGAA CTTTGCCATT TATTCCGATG CCTTAGCAAA ACTAGCCAAT
481 GAGGAAAAAG TTCCCTTCGT GGCTTTGAAT AAGGCGTTTC AACAGGAAGG TGGTGATGCT
541 TGGCAACAAC TGCTAACAGA TGGACTGCAC TTTTCCGGA AAGGGTACAA AATTTTTCAT
601 GACGAATTAT TGAAGTTCAT TGAGACATTC TACCCCAAT ATCATCCCA AAACATGCAG
661 TACAAACTGA AAGATTGGAG AGATGTGCTA GATGATGGAT CTAACATAAT GTCTTGA

```

Figura 14

(SEQ ID No. 12)

10	20	30	40	50	60
MNLRQWMGAA	TAALALGLAA	CGGGGTDQSG	NPNVAKVQRM	VVFGDSLSDI	GTYPVPAQAV
70	80	90	100	110	120
GGGKFTTNPG	PIWAETVAAQ	LGVTLTPAVM	GYATSVQNCP	KAGCFDYAQS	GSRVTDPNGI
130	140	150	160	170	180
GHNGGAGALT	YPVQQQLANF	YAASNNTFNG	NNDVVFVLAG	SNDIFFWTTA	AATSGSGVTP
190	200	210	220	230	240
AIATAQVQQA	ATDLVGIVKD	MIAGATQVY	VFNLPDSSLT	PDGVASGTTG	QALLHALVGT
250	260	270	280	290	300
FNTTLQSGLA	GTSARIIDFN	AQLTAAIQNG	ASFGFANTSA	RACDATKINA	LVPSAGGSSI
310	320	330	340		
FCSANTLVAS	GADQSYLFAD	GVHPTTAGHR	LIASNVLARL	LADNVAH	

Figura 15

(SEQ ID No. 13)

```

atgaaectgc gtcaatggat gggcgccgcc acggetgccc ttgccttggg cttggccgcg      60
tgccggggcg gtgggaccga ccagagccgc aatcccaatg tcgccaaagg gcagcgcatg      120
gtggtgttgc gcgacagcct gagcgatata ggcaacctaca ccccgctgcg gcaggcggtg      180
ggcgccggca agttcaccac caaccggggc cggatctggg ccgagaccgt ggcgcgcgaa      240
ctggcgctga cgtccagccc ggcgggtgat ggctaagcca cctcgtgca gaattgccc      300
aaggccggct gcttcgacta tgcgcagggc ggctcgccg tgaccgatcc gaacggcatc      360
ggccacaacg gcggcgccgg ggcgctgacc tacccggttc agcagcagct cggcaacttc      420
taecggcgca gcaacaacac attcaacggc aataacgatg tcgtcttcgt gctggccggc      480
agcaacgaca tttctctctg gaccactgcg gcggccacca gcgctccgg cgtgacgccc      540
gccattgcca cggcccagggt gcagcaggcc gcgaaggacc tggtcggcta tgtcaaggac      600
atgatcgcca aggggtgcgc gcaggtctac gtgttcaacc tgcgcgacag cagcctgacg      660
ccgaacggcg tggcaagcgg caggaacggc caggcgctgc tgcacgcgt ggtggggcag      720
ttcaacgca cgtcgcaaaag cgggctggcc ggcaactcgg cgcgcacat cgaactcaac      780
gcacaactga ccgcccggat ccagaatggc gectcgcttc gcttcgcaa caccagcgcc      840
cgggcctgcg accccaccaa gatcaatgcc ctggtgcgca gcgcggggcg cagctcgctg      900
ttctgctcgg ccaacacgct ggtggcttcc ggtgcggacc agagctacct gttcgccgac      960
ggcgtgcacc cgaaccaggg cggccatcgc ctgatcgcca gcaacgtgct ggcgcgccg      1020
ctggcgggata acgtcgcgca ctga      1044

```

Figura 16

(SEQ ID No. 20)

```

1 mlysyvavgd sfteyvgdpg pdgafvgwad rlavlladrr pegdftytnl avrgllldqi
61 vaeqvprvvg lapdlvsfaa ggnndiirpgt dpdevaerfe lavaaltaaa gtvlvttgfd
121 trgvpvklhl rgkiatyngv vraiadrygc pvidlwlslrs vqdrrawdad rhlslpeght
181 rvalraggal glrvpadpdg pwpplpprgt ldvrrddvhw areylvpwig rrlrgessgd
241 hvtakgtlap daiktriaav a

```

Figura 17

(SEQ ID No. 21)

```

1 gtgatcggt cgtacgtggc ggtggggggac agcttcaccg agggcgctcg cgaacccggc
61 ccgagcgggg cgttcgtcgg ctgggcggac cggctcgccg tactgctcgc ggaacggcgc
121 ccgagggcg acttcacgta caggaacctc gccgtgcgcg gcaggctcct cgaacagatc
181 ttggcggaac aggtcccgcg ggtcgtcgga ctgcgcgccg acctcgtctc gttcgcgggc
241 ggcggcaacg acatcctccg gcccgggcacc gatcccgacg aggtcgccga gcgggttcgag
301 ctggcggtgg ccgcgctgac cgcgcgggcc ggaacgctcc tggtagccac cgggttcgac
361 acccgggggg tgcccgtcct caagcacctg cgcggcaaga tcgccacgta caacgggcac
421 gtcgcgcgca tcgcgcagcg ctacgggtgc cgggtgctcg acctgtggtc gctgcgggagc
481 gtccaggacc gcaggcggtg ggaacggcgac cggctgcacc tgcgcggga ggggcacacc
541 cgggtggcgc tgccgcggcg gcaggccctg ggctcgccgc tcccggccga cctgaccag
601 ccccggcgc cctgcgcgc gcgcggcacg ctgcacgtcc ggcgcgacga cgtgcactgg
661 gcgcgcaggt acctggtgcc gtggatcggg ccgcggctgc gggcgagtc gtcgggcgac
721 cagctgacgg ccaaggggac gctgctgcgc gacgccatca agacgcggat cgcgcgggtg
781 gcctga

```

Figura 18
(SEQ ID No. 22)

```

1  mgtndpaytsl vavgdsftg madllpdgsy rgwadllatr maarepgfry anlavrgkli
61  ggivdeqvdv aaamgadvit lvvglnndtlr pkcdmarvrd lltgaverla phceqlvlmr
121 spgrgqgvle rfrprmealf aviddiagrh gavvvdlyga qsladprmwv vdrihltaeg
181 hrrvaeavwg slghapedpe whapipatpp pgwvtrrtad vrfarqhlip wigrrltgrs
241 sgdglpakrp dlipyedpar

```

Figura 19 (SEQ ID No. 23)

```

1  atgcagacga accccggcga caccagtctc gtgcgcgtcg ggcactcctt caccgagggc
61  atgtcggacc tgcctgcccga cggctcctac cgtggctggg cgcacctcct cgcaccocgg
121 atggcggccc gctcccccggt ctteccgtac gccaacctgg cggcgccggg gaagctgac
181 ggacagatcg tcgacgagca ggtggacgtg gccgcgcga tgggagccga cgtgatcacg
241 ctggtcgccg ggtcaacga cagctgcgg cccaagtggg acatggcccg ggtgcgggac
301 ctgctgaccc aggcctgga acgctcgcc cgcactgog agcagctggt gctgatgcgc
361 agtcccggtc gccagggtcc ggtgctggag cgttcocggc cccgcacgga ggcctgttc
421 gccgtgatcg acgacctggc cgggcgcgac ggcgcctggg tgcctgacct gtacggggcc
481 cagtgcctgg ccgacctcgc gatgtgggac gtggacggc tgcacctgac cgcaggggac
541 caccgcgggg tcgcggaggg ggtgtggcag tcgctcggcc acgagccga ggaccccgag
601 tggcacgcgc cgtccccggc gacgcgcgc cgggggtggg tgacgcgcag gaccgcggac
661 gtccgggttg cccggcagca cctgctgccc tggataggcc gcaggctgac cgggcgctcg
721 tcgggggacg gctgcggcgc caagcccccg gacctgctgc cctacgagga cccgcacggg
781  tga

```

Figura 20
20 (SEQ ID No. 24)

```

1  mtrgrdggag apptkhrall aaivtlivai saaiyagasa ddgsrdhalq aggripgrda
61  apastgawvg awatapaaae pgtettglag rsvrnvvhts vggtgartil snlyggsplt
121 vhasialaa gpdtaaaiaa tmrrltrggs arviipggg vmsdtariai pyganvltt
181 yspipsgpvt yhpqarqtsy ladgdrtdv tavayttptp ywryltaldv lsheadgtvv
241 afgdsitdga rsqsdanhrw tdvlaarlhe aagdrdtpv ysvvnegisg nrlltsrpgz
301 padnpsgler fgrdvlerth vkavvvvlgv ndvlaspela drdailtqlr tlvdraharg
361 lrvvgatitp fggyggytea retmrqevne eirsgrvfdt vvdldkalrd pydprmrard
421 ydagdhlpqg dkgyarmgav idlaalkgaa pvka

```

Figura 21
(SEQ ID No. 25)

```

1 atgaccgggg gtcgtgacgg ggggtgcggg ggcggcccca ccaagcaccg tgccctgctc
61 ggggggatog tcacctgat agtggcgatc tccggggcca tatacgccgg agcgtccggg
121 gacgacggca gcagggacca cgcgtgcag gccggaggcc gtctccacg agggagcgc
181 gcccccggt ccaccgggtg cttgggtggg gcctgggcca cgcaccggc cggggccgag
241 cggggcaccg agacgacgg cctggcgggc cgtccgtgc gcaacgtgt gcacacctcg
301 gtcggcgcca ccggcgcgcg gatcacctc tcgaacctgt acgggcagt cgcgtgacc
361 gtcacacacg cctcgatcgc cctggcgccc gggcccgaca ccgcccgcg gatcgccgac
421 accatgcgcc ggtcacctt cggcgccgag gcccggggta tcatccggc gggcgccgag
481 gtgatgagcg acaccggccg cctcgccatc cctacgggg cgaacgtct ggtcaccacg
541 tactcccca tcccgtcgg gccgggtgac taacctcgc agggcccgca qaccaactac
601 ctggcgacg gcgacggcac ggcggcgctc acccgcgctg cgtacacac ccccaagccc
661 tactggcgct acctgacggc cctcgacgtg ctgagccacg aggcggcagg caccgtcgtg
721 gcgttcggcg actccatcac gacggcgccc cgtcgccaga gcgacggcaa ccaacgctgg
781 acgacgtcc tcgcccacg cctgcacgag gcggcgggcg acggcgggga cagccccgc
841 tacagcgctg tcaacgaggg catcacggc aaccggctcc tgaccagcag gccggggcg
901 cggcgccgca acccgagcgg actgacggc ttccagcggg acgtgctgga acgacacca
961 gtaaggcgcg tcgtcgtcgt cctcgccgctc aacgacgtcc tgaacagccc ggaactcgcc
1021 gacggcgagc ccatcctgac cggcctgcgc aacctcgtg accggcgcca cggccgggga
1081 ctgggggtcg tggcgccac gatcacgcg ttccggcggt accggcgcta caccgagggc
1141 cgcgagacga tggggcagga ggtcaccgag gagatccgt ccggccgggt cttcgacacg
1201 gtgctgact tcgacaagg cctgcggcgc ccgtacgacc cgcgcgggat gcgtccgac
1261 tacgacagcg gcgaccact gcacccggc gacaagggt acgcgcgat gggcgcggtc
1321 atcgacctgg ccgcgtgaa gggcgcgcg ccgggtcaagg cgtag

```

Figura 22
(SEQ ID No. 26)

```

1 mtemsarxva rriaagaayq qcciglagaa avglvvaevq larrrvvgvt ptrvpnaagl
61 ygggtlptagd pplrlmldg staaggvhr aggtpgalla sglaavaerp vrlgsavagg
121 acsddldrvq alvlaepdrv pdicvimga ndvthrmpt rsvrlhssav rrlrtagaev
181 vvgtpdlgt iervrplrw larrasrqla aaqtigaveq ggtrvalgdl lgpefaqnpr
241 elfgpdnyhp saegyataam avlpsvcaal glwpadeehp dalrrregflp varaaaaaas
301 eagtevaam ptgprgpwal lkrrrrrrvs eaepspsgv

```

Figura 23
(SEQ ID No. 27)

```

1 atgacgagca tgcgagggc gagggtggcg cggcggtatcg cggcgggcgc ggcgtacggc
61 ggcggcgcca tcggcctggc gggagcgggc gcgggtcggtc tggtgggtggc caggggtcag
121 ctggccagac gcagggtggg ggtgggcacg ccgaccggg tgccgaacgc gcagggaactg
181 tacggcgcca cctgcccac ggcggcgac ccgcgcgtgc ggctgatgat gctggcgac
241 tccacggcgc cggggcaggg cgtgcacgg gccggcgaga cgcggggcgc gctgctggcg
301 tccgggctcg cggcggtggc ggcggcgcc gtgcggctgg ggtcggtcgc ccagcgggg
361 gogtgcctgg acgacctgga ccggcgagtg gcgtcggtgc tcgcggagcc ggaacgggtg
421 cccgacatct cgtgatcat ggtcggncc aangaagtca cccacggat gccggcgacc
481 cgtcggtgc ggcacctgct ctcggcggtg cggcggtcgc gcaaggcgg tgccgaggtg
541 gtggtcggca cctgtccgga cctgggcaag atcgagcggg tgccgagcc gctgcgtgg
601 ctggccccgc gggcctcacg gcagctcgcg gcggcacaga ccatcggcgc cgtcgagcag
661 ggcggcgcca cgggtgctct gggcgacctg ctgggtcggg agttcgcgca gaaccggcg
721 gagctcttgc gcccgacaa ctaccacccc tccgcgagg ggtacgccac ggcgcgatg
781 gggtaactgc cctcggtgtg cgcgcgcctc ggctgtggc cggcgacgca ggagcaccog
841 gacgcgctgc gccgcgaggg ctctcgtccg gtggcgcgcg cggcggggga ggcggcggtc
901 gaggcggtga cggaggtcgc cgcgcgatg cctacggggc ctggggggcc ctggcgctg
961 ctgaagcgcc ggagacggcg tcgggtgtcg gaggcggaac cgtccagccc gtcggcggtt
1021 tga

```

Figura 24

(SEQ ID No. 28)

```

1 mgrgtgtrr ygrrrarvai aaltaavlgv gvagcdsvgg dspapsgsps krttptapawd
61 ttpasvaavg dsitrgfdac avlsdcpevs watgssakvd slavrllgka daaehswnya
121 vtgarmadlt aqvtraagre pelvavmaga ndacrsttsa mtpvadfraa feeamatlrk
181 klpkagvyvs sipdlkrlws qgrtnplgkq vwkglcpcsm lgdadslds atlrntvrd
241 rvadynevlr evcakdrroc sddgavhefr fgtgqlshwd wfhpavdgga riaeiayrav
301 taknp

```

Figura 25

(SEQ ID No. 29)

```

1 atgggtcgag ggacggacca ggggacggcg tacggcgctc gccggggcgcg tgtcgcgctc
61 gccgccctga ccgcgcgcgt cctggggcggt ggcgtggcgcg gctgcgactc cgtggggcgcg
121 gactcaccog ctccctccgg cagcccgctc aagcggacga ggacggcgcc cgcctgggac
181 accagcccg cgtccgctgc cgcggtggcg gactccatca cgcgcggtt ogaagcctgt
241 gcggtgctgt cggactgccc ggaggtgtcg tggggcgacc gcagcagcgc gaaggtcgac
301 tgcctggcg tacggctgct ggggaaggcg gacgcggcgc agcacagctg gaactacgcg
361 gtcacggggg ccgggatggc ggacctgacc gctcagggtg cgcggggcgcg gcagcgcgag
421 ccggagctgg tggcggtgat ggcggggcg aacgaagcgt gccggtccac gacctcgcg
481 atgacgcgg tggcggtact ccggggcgag ttcgaggagg ccatggccac cctgcgcaag
541 aagctcccca aggcgcaggt gtacgtgtcg agcatcccg acctcaagcg gctctggtec
601 caggggcgca ccaaccgcgt gggcaagcag gtgtggaagc toggcctgtg ccgctcgatg
661 ctggggcgag cggactccct ggactcgcg gcgacctgc gcgcaacac ggtgcgcgac
721 cgggtggcg actacaaaga ggtgctgcgg gaggtctgcg cgaaggacgc gcggtgcgcg
781 agcgagcag gcgcggtgca cgagttccgg ttgggcacgc accagttgag ccaactgggac
841 tgggtccacc cgaggtgtga cggccaggcc cggctggcg agatcgcta ccgcgcggtc
901 accgcgaaga atccctga

```

Figura 26

(SEQ ID No. 30)

```

1 mrlrraata sallltpala lfgaaavsa priqatdyva lgdsysegvg ageydaasgs
61 ckrtakypa lwaashtgtr fnftacgar tgdvlakqlt pvnsqtdlvs itiggnadagf
121 admttcnlq gesaclaria karayiqgtl paqidqvyda idsrappaqv vvlgyprfyk
181 lggscavgl ekrainaia addinavtak raadhgfafg dvnttfaghe lcsgapwlhs
241 vtlpvenayh ptangqskgy lpvlnsat

```

Figura 27

(SEQ ID No. 31)

```

1  ttcatcacia  cgatgtcaca  acacoggcca  tcogggtcat  cctgatcgt  gggaatgggt
61  gacaagcctt  cccgtgacga  aagggtcctg  ctacatcaga  aatgacagaa  atcctgctca
121  gggaggttcc  atgagactgt  cccgacggcg  ggccacggcg  tccgcgctcc  tcctcaccoc
181  ggcgctcgcg  ctcttcggcg  cgagcgccgc  cgtgtccgcg  ccgcgaatcc  aggccaccga
241  ctacgtggcc  ctccggcgact  cctactcttc  gggggtcggc  gcgggcagct  acgacagcag
301  cagtggctcc  tgtaagcgca  gcaccaagtc  ctaccgggce  ctgtgggccc  cctcgccacac
361  cggtaecggg  ttcaacttca  ccgcctgttc  gggcgcccg  acaggagacg  tgctggccaa
421  gcagctgacc  ccggtcaact  ccggcaccca  cctggtcagc  attaccatcg  gcggcaacga
481  ccggggcttc  gccacacca  tgaccacctg  caacctccag  ggcgagagcg  cgtgcctggc
541  ggggatcgcc  aaggcgcgcg  cctacatcca  gcagacgctg  cccgcccagc  tggaccaggt
601  ctacgacgcc  atcgacagcc  gggcccccgc  agcccaggtc  gtctcctgg  gctaccgcg
661  cttctacaag  ctggcgccga  gctgcccgt  cgtctctctg  gagaagtccc  gcgcggccat
721  caacgcgcgc  gccgacgaca  tcaacggcgt  caccgccaag  cgcgcgcgcg  accacggcct
781  cgccttcggg  gacgtcaaca  cgaccttcgc  cgggcacgag  ctgtgctccg  gcgccccctg
841  gctgcacagc  gtcacccctc  ccgtggagaa  ctctaccac  cccacggcca  acggacagtc
901  caagggctac  ctgcccgtcc  tgaactccgc  cactgatct  cgcggctact  ccgcccctga
961  cgaagtcccg  ccccgggcg  gggccttcgc  gtaggcgcc  gtacggcgcg  cgcgcgtcgc
1021  gccggtggcc  ccgcgtaacg  tgccgcggcc  ccggacgcg  gtoggttc

```

Figura 28

(SEQ ID No. 32)

```

1  MKKWFVCLLG  LVALTVQAAD  SRPAFSRIVM  FGDSLSDTGK  NYSKMRGYLP
51  SSPPYEGRF  SNGPVWLEQL  TKOFFGLTIA  NEAEGGATAV  AYNKIWNPK
101  YQVINLNDYE  VTOPLQKDSF  KPDDLVLWV  GANDYLAYGW  NTEQDAKRVR
151  DAISDAANRM  VINGAKQILL  FNLFDLGQNP  SARSQKVVEA  VSHVSAYHNQ
201  LLLNLARQLA  PTGMVKLFBI  DKQFAEMLRD  PQNFGLSDVE  NPCYDGGYVW
251  KPFATRSVST  DRQLSAFSPQ  SRLAIAGNPL  LAQAVASFMA  RRSASPLNCE
301  GKMFWDQVHP  TTVVHAALSE  RAATFIANQY  EFLAH*

```

Figura 29

(SEQ ID No. 33)

```

1  ATGAAAAAAT GGTTCGTGTG TTTATTGGGA TTGGTCGCGC TGACAGTTCA
   TACTTTTTTA CCAAACACAC AAATAACCCCT AACCAGCGCG ACTGTCAAGT

51  GGCAGCCGAC AGTCGCCCGG TCTTTTCCCG GATCGTGTAT TTCGGCGACA
   CCGTCGGCTG TCAGCGGGGC GGAAAGGGC CTAGCACTAC AAGCCGCTGT

101 GCTCTCTCGA TACCGGCATA ATGTACAGCA AGATGCGCGG TTACCTCCCC
   CGGAGAGGCT ATGGCCGTTT TACATGTCTT TCTACGCGCC AATGGAGGGG

151 TCCAGCCCGC CCTACTATGA GGGCCGTTTC TCCACGGAC CCGTCTGGCT
   AGGTCGGGCG GGATGATACT CCGCGCAAAG AGGTTGCCCT GGCAGACCGA

201 GGAGCAGCTG ACCAAACAGT TCCCGGGTCT GACCATCGCC AACGAGCGCG
   CCTCGTCGAC TGGTTTGTCA AGGCCCCAGA CTGGTAGCGG TTGCTTCGCC

251 AAGGCGGTGC CACTGCCCGT GCTTACAACA AGATCTCTCT GAATCCCAAG
   TTCCGCCACG GTGACGGCAC CGAATGTGTG TCTAGAGGAC CTTAGGGTTC

301 TATCAGGTCA TCAACAACCT GGACTACGAG GTCACCCAGT TCTTGACAGAA
   ATAGTCCAGT AGTTGTGTGA CCTGATGCTC CAGTGGGTCA AGAACGTCCT

351 AGACAGCTTC AAGCCGGACG ATCTGGTGAT CCTCTGGGTC GGTGCCAATG
   TCTGTGAAG TTCGGCCTGC TAGACCACTA GGAGACCCAG CCACGGTTAC

401 ACTATCTGGC CTATGGCTGG AACACGGAGC AGGATGCCAA GCGGGTTCGC
   TGATAGACCG GATACCGACC TTGTGCCTCG TCCTACGGTT CGCCCAAGCG

451 GATGCCATCA GCGATGCGGC CAACCGCATG GTACTGAACG GTGCCAAGCA
   CTACGGTAGT CGCTACGCGG GTTGGCGTAC CATGACTTGC CACGGTTCGT

501 GATACTGCTG TTCAACCTGC DGGATCTGGG CCAGAACCCG TCAGCTCGCA
   CTATGACGAC AAGTTGGACG GCTAGACCC GGTCTTGGGC AGTCGAGCGT

551 GTCAGAGAGT GGTGAGGGCG GTCAGCCATG TCTCCGCTTA TCACAACCAG
   CAGTCTTCCA CCAGCTCCGC CAGTCGGTAC AGAGGCGGAT AGTGTGCGTC

601 CTGCTGCTGA ACCTGGCACG CCAGCTGGCC CCCACCGGCA TGGTAAAGCT
   GACGACGACT TGGACCGTGC GGTGACCGG GGGTGGCGGT ACCATTTCGA

651 GTTCGAGATC GACAAGCAAT TTGCCGAGAT GCTGCGTGAT CCGCAGAACT
   CAAGCTCTAG CTGTTGTTA AACGGCTCTA CGACGCACTA GGCCTCTTGA

701 TCGGCCTGAG CGACGTGAG AACCCCTGCT ACGACGGCGG CTATGTGTGG
   AGCCGGACTC GCTGCAGCTC TTGGGGACGA TGCTGCCGCC GATACACACC

751 AAGCCGTTTG CCACCGCGAG CGTCAGCACC GACCGCCAGC TCTCCGCCTT
   TTCGGCAAAC GGTGGGCGTC GCAGTCGTGG CTGGCGGTCT AGAGGCGGAA

801 CAGTCCGCAG GAACGCCTCG CCATCGCCCG CAACCCGCTG CTGGCACAGG
   GTCAGCGTTC CTTGCCGAGC GGTAGCGGCC GTTGGGCGAC GACCGTGTCC

851 CCGTTGCCAG TCTATGGCC CGCCGACGCG CCAGCCCCCT CAACTGTGAG
   GGCAACGCTC AGGATACCGG CGGCGCTCGC GGTGCGGGGA GTTGACACTC

901 GGCAAGATGT TCTGGGATCA GGTACACCCG ACCACTGTCT TGCACGCAGC
   CGTTTCTACA AGACCCTAGT CCATGTGGGC TGGTGACAGC ACGTGCCTCG

951 CCTGAGCGAG CGCGCCGCCA CCTTCATCGC GAACCACTAC GAGTTCTCTG
   GGACTCGCTC CGCGCGCGGT GGAAGTAGCG CTTGGTCATG CTCAGGAGAC

1001 CCCAC TGA
      GGGTG ACT

```

Figura 30

(SEQ ID No. 34)

```
1  MKKWFVCLLG LIALTVQAAD TRPAFSRIVM FGDSLSDTGK MYSKMRGYLP
51  SSPFFYYEGRF SNGPVWLEQL TKQFFGLTIA NEAEGGATAV AYNKISWNP
101 YQVINNLGYE VTQPLQKDSF KPDDLVLWV GANDYLAYGW NTEQDAKVR
151 DAISDAANRM VINGAKQILL PNLFDLGQNP SARSKVVEA VSHVSAYHNK
201 LLLNLARQLA PTGMVKLFRI DKQFAEMLRD PQNFGLSDVE NPCYDGGYVW
251 KPFATRSVST DRQLSAFSPQ ERLAIAGNPL LAQAVASPMR RRSASPLNCE
301 GKMPWDQVHP TTVVHAALSE RAATFIETQY RFLAHG*
```

Figura 31

(SEQ ID No. 35)

```

1  ATGAAAAAAT GGTITGTTTG TTTATTGGGG TTGATCGCGC TGACAGTTCA
   TACTTTTTTA CCAAACAAAC AAATAACCCC AACTAGCGCG ACTGTCAAGT

51  GGCAGCCGAC ACTCGCCCCG CTTTCTCCCG GATCGTGATG TTCGGCGACA
   CCGTCGGCTG TGAGCGGGGC GGAAGAGGGC CTAGCACTAC AAGCCGCTGT

101 GCCTCTCCGA TACCGGCAAA ATGTACAGCA AGATGCGCGG TTACCTCCCC
   CGGAGAGGCT ATGSCCGTTT TACATGTCGT TCTACGCGCC AATGGAGGGG

151 TCCAGCCCGC CCTACTATGA GGGCCGTTTC TCCAAOCGAC CCGTCTGGCT
   AGGTCGGGCG GGATGATACT CCCGCAAAAG AGGTTGCCTG GGCAGACCGA

201 GGAGCAGCTG ACCAAGCAGT TCCCGGGTCT GACCATCGCC AACGAAGCGG
   CCTCGTCGAC TGGTTCGTCA AGGGCCCGA CTGGTAGCGG TTGCTTCGCC

251 AAGGCGGTGC CACTGCCGTG GCTTACAACA AGATCTCCTG GAATCCCAAG
   TTCGCCACG GTGACGGCAC CGAATGTTGT TCTAGAGGAC CTTAGGGTTC

301 TATCAGGTCA TCAACAACCT GGACTACGAG GTCACCCAGT TCTTGCAAG
   ATAGTCCAGT AGTTGTTGGA CTTGATGCTC CAGTGGGTCA AGAAGCTCTT

351 AGACAGCTTC AAGCCGGACG ATCTGGTGAT CCTCTGGGTC GGTGCCAATG
   TCTGTGAAG TTCGGCCTGC TAGACCACTA GGAGACCCAG CCACGGTTAC

401 ACTATCTGGC ATATGGCTGG AATACGGAGC AGGATGCCAA GCGAGTTCCG
   TGATAGACCG TATACCGACC TTATGCCTCG TCCTACGGTT CGCTCAAGCG

451 GATGOCATCA GCGATGCGGC CAACCGCATG GTACTGAACG GTGCCAAGCA
   CTACGGTAGT CGCTACGCCG GTTGGCGTAC CATGACTTGC CACGGTTCGT

501 GATACTGCTG TTCAACCTGC CGGATCTGGG CCAGAACCCG TCAGCCCGCA
   CTATGACGAC AAGTTGGACG GCCTAGACCC GGTCTPGGG AGTCGGGCGT

551 GTCAGAAGGT GGTGAGGGCG GTCAGCCATG TCTCCGCTA TCACAACAAG
   CAGTCTTCCA CCAGCTCCGC CAGTCGGTAC AGAGGCGGAT AGTGTGTGTC

601 CTGCTGCTGA ACCTGGCACG CCAGCTGGCC CCCACCGGCA TGGTAAAGCT
   GACGACGACT TGGACCGTGC GGTGACCGG GGGTGGCCGT ACCATTTCGA

651 GTTCGAGATC GACAAGCAAT TTGCCGAGAT GCTGCGTGAT CCGCAGAACT
   CAAGCTCTAG CTGTTGTTA AACGGCTCTA CGACGCACTA GCGTCTTGA

701 TCGGCCTGAG CGACGTGAG AACCCCTGCT ACGACGGCGG CTATGTGTGG
   AGCCGGACTC GCTGCAGCTC TTGGGGACGA TGCTGCCGCC GATACACACC

751 AAGCCGTTTG CCACCGCAG CGTCAGCACC GACCGCCAGC TCTCCGCTT
   TTCGGCAAAC GGTGGGCGTC GCAGTCGTGG CTGGCGGTCG AGAGGCGGAA

801 CAGTCCGCAG GAACGCCTCG CCATCGCCGG CAACCGCTG CTGGCACAGG
   GTCAGGCGTC CTGCGGAGC GGTAGCGGCC GTTGGGCGAC GACCGTGTCC

851 CCGTGGCCAG TCCTATGGCC CGCCGACGCG CCAGCCCTT CAACTGTGAG
   GGCAACGGTC AGGATACCGG GCGGCGTCCG GGTGCGGGGA GTTGACACTC

901 GGCAAGATGT TCTGGGATCA GGTACACCCG ACCACTGTG TGACCGCAGC
   CCGTTCIACA AGACCTAGT CCATGTGGGC TGGTGACAGC ACGTGCCTCG

951 CCTGAGCGAG CGCGCGCCA CCTTCATCGA GACCCAGTAC GAGTTCCTCG
   GGACTGCTC GCGCGGCGGT GGAAGTAGCT CTGGGTCATG CTCAGGAGC

1001 CCCACGGATG A
      GGGTGCCTAC T

```

Figura 32

```

      1      10      20      30      40      50
      |-----|
satA      ADTRPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLPSSPPYYEGRFSN--G
R.sol     QSGNPNVAKVQRMVVFGDLSLSDIGT-----YTPVAQAVGGGKFTTNP
Consensus ...adnraafqRiVnFGDSLSDiGk.....YlPsaqaygeGrFsn..G

      51      60      70      80      90     100
      |-----|
satA      PVWLEQLTKQFPGLTIANEAEAGGATAYAYNKISNPKYQVINNLQYEYVQ
R.sol     PIHAETVAAQL-GVTLTPAVMGYATSVQNCPKAGCFDYAQGGSRVTPNG
Consensus P!NaEq1aaQ1.GlTianaaeGgATaVannkiagnfdYaqqnrdt#pnq

     101     110     120     130     140     150
     |-----|
satA      FLQKDSFKPDDLVLWVGANDYLAYG--WTEQDAKRYRDAISDAANRMV
R.sol     IGHNGGAGALTYPVQQQLANFYAASNNTFNGMNDVVFVLAGSNDIFFHTT
Consensus igqndgagaddlp!qqqgANdYaAsn..fNg##DakrVraainDaanrt

     151     160     170     180     190     200
     |-----|
satA      LNGAKQILLFNLPLDGNPSARSQKYVEAYSHVSAYHNKL-LLNLARQLA
R.sol     AARTSGSGYTPAIATAQVQQAATDLVGYVKDHIAGKATQYVFNLPDSSL
Consensus aaaakqiglfnaialaQnqqBaas#lVgeakdh!aaganql.11NLarqla

     201     210     220     230     240     250
     |-----|
satA      PTGMVKLFEIDKQFAEHLRDPQNFGLSDVENPCYDGGYVMKPFATRSYST
R.sol     TPDGVASGTTGQALLHALVGTFTTLQSGLAGTSARIIDFNAQLTAATQN
Consensus ppdgValgeidqalaealRdpqNfgLqdgeagcsargidfnaqaTaa!qn

     251     260     270     280     290     300
     |-----|
satA      DRQLSAFSPQERLAIAG--NPLLAQAVASPM---ARRSASPLNCEGKNFW
R.sol     GASFGFANTSARACDATKINALVPSAGGSSLFCSANTLVASGADQSYLFA
Consensus daqlgaanpqaRaadAg..NaLlaqAgaSp$...Arrlaapgad#gk$Fa

     301     310     320     330
     |-----|
satA      DQVHPTTVYHAALSERAAFTIETQYEFLAH
R.sol     DGVHPTTAGHRLIASNVLARLLA--DNVAH
Consensus DqVHPTTAgHaaiaraaariae..#nlAH

```

Figura 33

```

Pfam      *->ivafGDSltddggg.....ayygdsgggwgagladrltsla..rlrargrgvdv
Srim1 38  YVALGDSYSSGVG.....agSYDSSSGSCKRSTKSYFALMAAS..----HTGTTF 81
Scoe1 5   YVAVGDSPTBG--.....--VGDPGPDGAFVGNADRLAVLL..ADRRPEGDFTY 47
Scoe2 10  LVAVGDSPTBG--.....--MSDLLPDGSYRGWADLLATRM...--AARSPGFRY 50
Scoe3 239 VVAVGDSITDG--.....ARSQSDANHRWTDVLAARLHEAA..GDGRDTPRYSV 283
Scoe4 75  LMLGDDSTAAG--.....--QGVHRAGQTPGALLASG..LAAVAERFVRL 113
Scoe5 66  VAAVGDSITRGPD.....acAVLSDCPEVSWATGSSAKVDSLAVLLGKADAAEHS 116
Ahyd1 28  IVMFGDSLSDTGKmyskmrgylpspppyYBGRFSPNGPVWLEQLTNEFPGLTIANEABGGPTAVA 91
Asal1 28  IVMFGDSLSDTGKmyskmrgylpspppyYBGRFSPNGPVWLEQLTKQP-----PGLTI 79
Ahyd2 40  IVMFGDSLSDTGKmyskmrgylpspppyYBGRFSPNGPVWLEQLTKQFPGLTIANEABGGATAVA 103

Pfam      fargisGrtsdGrlvvDarlvatllFlagflGlnlpPYLegdflrGANFAsagAtilgtslipfni
Srim1 82  NPTACSGAR----- 90
Scoe1 48  TNLAVRGRL----- 56
Scoe2 51  ANLAVRGKL----- 59
Scoe3 284  VNKGISGNR----- 292
Scoe4 114  GSVAQPGAC----- 122
Scoe5 117  WNYAVTGAR----- 125
Ahyd1 92  YNKISWNP----- 100
Asal1 80  ANEABGGAT----- 88
Ahyd2 104 YNKISWNP----- 112

Pfam      QvqFkdfkaskvlelrga.....lgllqellrlvpvldakspdlvtimiGENDl..itvakfgpks
Srim1 91  -----TGDVLAKQLTPVNSGTDLVSITIGNDAGfadtMTTCNLQG 131
Scoe1 57  -----LDQIVARQVPRVVG LAPDLVSFAAGGNDI.....I----- 86
Scoe2 60  -----IGQIVDEQVDVAAAMGADVITLVGGLNDT..... 88
Scoe3 293  -----LLTSRPGRPA.....DNPSGLSRFQRDVLERTNVKAVVVVLGVNDV..... 333
Scoe4 123  -----SDDLDRQVALVLAEPDRVPDICTVIMVGANDV..... 153
Scoe5 126  -----MADLTAQVTRAAQREPELVAVMAGANDA.....CR 155
Ahyd1 101  -----YQVI.....NNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY.....LA 137
Asal1 89  -----AVAYNKISWNPkyqvyNNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY.....LA 137
Ahyd2 113  -----YQVI.....NNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY.....LA 149

```

```

Pfam      .....tkedrnsvpefrdnlrklkrLrsangariililitivllnlpl.....plGCl
Srim1 132 esaclarIAKARAYIQQTLPALQDQVYDAIDSAPAA----QVVVLGYP----- 176
Scoe1 87 .....---RFGTDPDEVAERFELAVAALT-AAAGTVLVTGPDTRGVP----- 125
Scoe2 89 .....---LRPKCDMARVRDLLTQAVERLAPHCBLVLMRSP----- 122
Scoe3 334 .....LNSPELADRDAILTGLRTLVDRAHAGLRVVGATITPFGGYGG----- 376
Scoe4 154 .....---THRMFATRSVRHLSSAVRRLR-TAGAEVVVGTCPDLTIE----- 192
Scoe5 156 .....STTSAMTFVADFRAQFEEMATLR-KKLEKQVYVSSIFDLKRLwsqgrtnplgkQVVKL 214
Ahyd1 138 .....YGMNTEQDAKRVRDAISDAANRMV-LNGAK----EILLFNLPL----- 174
Asa11 138 .....YGMNTEQDAKRVRDAISDAANRMV-LNGAK----QILLFNLPL----- 174
Ahyd2 150 .....YGMNTEQDAKRVRDAISDAANRMV-LNGAK----QILLFNLPL----- 186

```

```

Pfam      pq.klalalassknvdatgclerlneavadynealrelaei.ek.l.q.aglrkdglpdlkeanvpy
Srim1 177 --.RFYKLGSCCAVGLSEKSRAAINAAADDINAVTAKRA--.--.--ADHGFAP 219
Scoe1 126 --.-----VLKHLRGKIATYNGHVRAIA--.--.--DRYGCVP 152
Scoe2 123 --.-----GRQGPVLERFRFPMBALFAVIDDLA--.--.--GRHGAVV 154
Scoe3 377 --.YTEARETMQRQVNEZIRSGRVFDTVVDFDKALRDPY--.--.-- 412
Scoe4 193 --.-----RVRQPLRWLARRaSrQLAAQTIGAVEQGGRTVSL 227
Scoe5 215 GLcPSMLGSDADSLDSATLRRTTVDRVADYNEVLREVC--.--.--AKDRRCRSDDGAVHEFRFGT 273
Ahyd1 175 --.-----DLGQNPSARSQKVVEASHVSAYHNQLLLNLA--.--.--.QLAPTGMVKLFEIDKQF 224
Asa11 175 --.-----DLGQNPSARSQKVVEASHVSAYHNQLLLNLA--.--.--.QLAPTGMVKLFEIDKQF 224
Ahyd2 187 --.-----DLGQNPSARSQKVVEASHVSAYHNQLLLNLA--.--.--.QLAPTGMVKLFEIDKQF 236

```

```

Pfam      VDIyaifqdlldgignpsayv.y...GFeet.kaCCGyGgr.yNyn.rv.CGnag.l.ck.vtakaC
Srim1 220 GDVNT-----TFAGHELCSGAPwL.HS.VT---- 242
Scoe1 153 LDLNLSLRSVQDRA----- 166
Scoe2 155 VDLYGAQSLADPRM----- 168
Scoe3 413 ----- 413
Scoe4 228 GDLLGPEFAQNPREL----- 242

```

```

Scoe5 274 DQL----- 276
Ahyd1 225 AEMLRDPQNFGLSDQRNACYgGgyvwKPFASrSASTDSQLSaFNPQeRLaIAGNPILaQAvASPMMA 291
Asa11 225 AEMLRDPQNFGLSDVENPCYdGgyvwKPFATrSVSTDRQLSaFSPQeRLaIAGNPILaQAvASPMAR 291
Ahyd2 237 AEMLRDPQNFGLSDVENPCYdGgyvwKPFATrSVSTDRQLSaFSPQeRLaIAGNPILaQAvASPMAR 303

```

```

Pfam      .dasayll.atlfdGgf.HpsekGykavAeal<-*
Srim1 243 -----LPVENSyHTANGQSKGYLPV 263
Scoe1 167 -----WDADRL.HLSPEGHTRVALRA 186
Scoe2 169 -----WDVDRL.HLTABGHRVABAV 188
Scoe3 413 --DPRMRsDYDSGDHL.HPGDKGYARMGAVI 441
Scoe4 243 -----PGPDNY.HPSAEGYATAAMAV 262
Scoe5 277 -----SHWDWF.HPSVDGQARLAEIA 296
Ahyd1 292 rSASTLNcGKMFWDQV.HPTTVVHAALSER 322
Asa11 292 rSASPLNcGKMFWDQV.HPTTVVHAALSER 322
Ahyd2 304 rSASPLNcGKMFWDQV.HPTTVVHAALSER 334

```

Figura 34

Pfam	*->ivafGDSltddggg.....ayygdsdgggwgagladrltsla..rlrargrgv	
Srim1	38	YVALGDSYSSGVG.....agSYDSSSGSCKRSTKSYPALWAAS.....-HTGTRF 81
Scoe1	5	YVAVGDSFTEG-----VGDGPGDGAFFVGWADRLAVLL..ADRRPEGDFTY 47
Scoe2	10	LVAVGDSFTEG-----MSDLLPDGSTRGNADLLATRM...-AARSPGFRY 50
Ahyd1	28	IVMPGDSLSDTGKmyskmrgylpspppyYEGRFSNGFVWLEQLTNEFPGLTIANEAEGGPTAVA 91
Asal1	28	IVMPGDSLSDTGKmyskmrgylpspppyYEGRFSNGFVWLEQLTKQF-----PGLTI 79
Ahyd2	40	IVMPGDSLSDTGKmyskmrgylpspppyYEGRFSNGFVWLEQLTKQFPGLTIANEAEGGATAVA 103
▼		
Pfam	fnrgisGrtsdGrIvvDarIvat11Flaqf1GlnlpPYLsgdflrGANFAsagAtIigtslipflni	
Srim1	82	NFTACSGAR----- 90
Scoe1	48	TNLAVRGRL----- 56
Scoe2	51	ANLAVRGKL----- 59
Ahyd1	92	YNKISWNPK----- 100
Asal1	80	ANEAEGGAT----- 88
Ahyd2	104	YNKISWNPK----- 112
▼		
Pfam	QvqFkdfkskvlelrqa.....lgllqellrlvpvldakspdlvtimigtNDl...itvakfgpks	
Srim1	91	-----TGQVLAKQLTPVNSGTDLVSTITIGGNDagfaDTMTTCNLQG 131
Scoe1	57	-----LDQIVAEQVPRVVLAPDLVSPANGNDI.....-I--- 86
Scoe2	60	-----IGQIVDEQVDAAAMGADVITLVGGINDT..... 88
Ahyd1	101	-----YQVI.....NNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLVWVGANDY.....LA 137
Asal1	89	-----AVAYNKISWNpkyqvynNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLVWVGANDY.....LA 137
Ahyd2	113	-----YQVI.....NNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLVWVGANDY.....LA 149
▼		
Pfam	tksdnrvsvpefrdnrlkikrLrsangariilitlvtltnlplp1GCl	
Srim1	132	esaelariAKARAYIQTLPAQLDQVYDAIDSRAPAA-----QVVVLGYF----- 176
Scoe1	87	-----RPGTDPDEVAERPELAVAALT-AAAGTVLVTGFDTRGVP----- 125
Scoe2	89	-----LRPKCDMARVRDLITQAVRRIAAPHCEQLVIMRSP----- 122
Ahyd1	138	YGNWTEQDAKRVRDAISDAANRMV-LNGAK-----QILLFNLP----- 174
Asal1	138	YGNWTEQDAKRVRDAISDAANRMV-LNGAK-----QILLFNLP----- 174
Ahyd2	150	YGNWTEQDAKRVRDAISDAANRMV-LNGAK-----QILLFNLP----- 186
▼		
Pfam	pqklalalassknvdatgcclerlneavadynealrelaeieklqaglrkdglpdlkeanvpy	
Srim1	177	--RFYKLGGSCAVGLSEKSRAAINAAADDINAVTAKRA-----ADHGFAF 219
Scoe1	126	-----VLKHLRGKIATYNGHVRATA-----DRYGCPV 152
Scoe2	123	-----GRQGPVLERFPRMEALPAVIDDLA-----GRIGAVV 154
Ahyd1	175	-----DLGQNPSARSQKVVEASHVSAYHNQLLLNLA-----RQLAPTGMVKLFEDIKQF 224
Asal1	175	-----DLGQNPSARSQKVVEASHVSAYHNQLLLNLA-----RQLAPTGMVKLFEDIKQF 224
Ahyd2	187	-----DLGQNPSARSQKVVEASHVSAYHNQLLLNLA-----RQLAPTGMVKLFEDIKQF 236
▼		
Pfam	VDlysifgdlldgiqnpsayv.y...GFeet.kaCCGyGgr.yNyn.rv.CGnag.l.ck.vtakaC	
Srim1	220	GDVNT-----TFAGHELCSGAPWL.HS.VT----- 242
Scoe1	153	LDLWLSLRSVQDRRA----- 166
Scoe2	155	VDLYGAQSLADFRM----- 168
Ahyd1	225	AEMLRDPQNFGLSQDNACyGgyvKPPASrSASTDSQLSaFNPQeRLaIAGNP1LaQAvASPMAR 291
Asal1	225	AEMLRDPQNFGLSQDNACyGgyvKPPATrSVSTDRLSaFSPQeRLaIAGNP1LaQAvASPMAR 291
Ahyd2	237	AEMLRDPQNFGLSQDNACyGgyvKPPATrSVSTDRLSaFSPQeRLaIAGNP1LaQAvASPMAR 303
▼		
Pfam	.dassyll.atl1wDgf.HpsekGykavAealc-*	
Srim1	243	-----LPVENSyHPTANGQSKGYLPV 263
Scoe1	167	-----WDADRL.HLSPEGHTRVALRA 186
Scoe2	169	-----WLVDR.LHLTAEGHRRVAEAV 188
Ahyd1	292	rSASTLNCeGKMFWDQV.HPTTVVHAALSERA 322
Asal1	292	rSASPLNCEGKMFWDQV.HPTTVVHAALSERA 322
Ahyd2	304	rSASPLNCEGKMFWDQV.HPTTVVHAALSERA 334

Figura 35

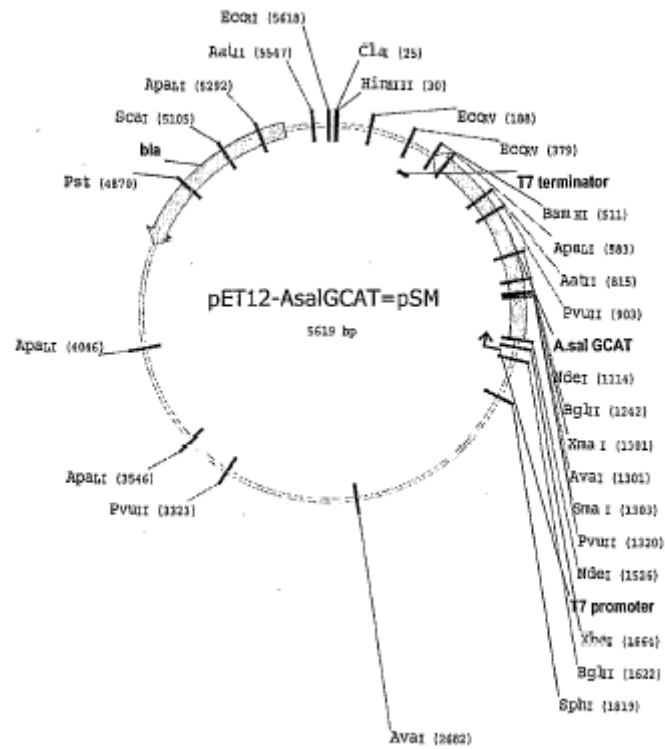


Figura 36



Figura 37



Figura 38

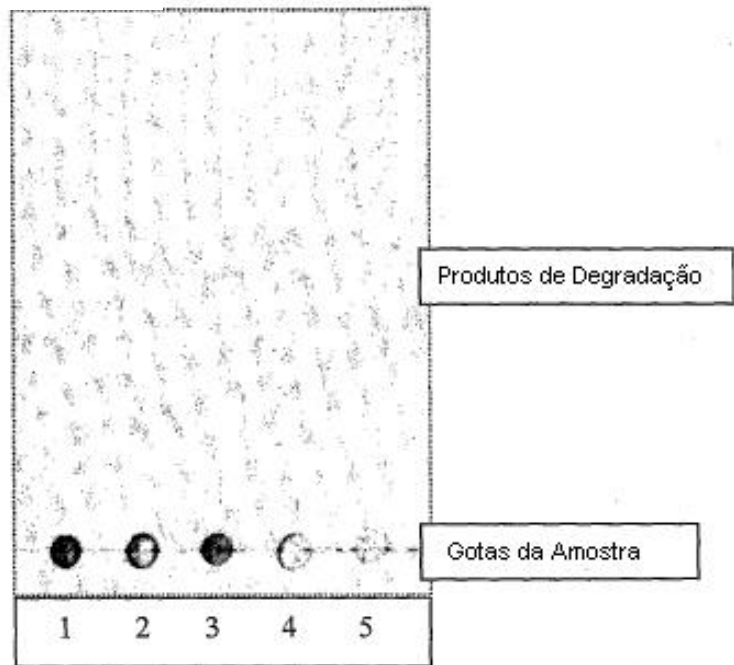
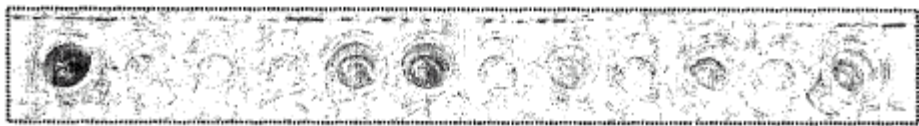


Figura 39

Controles

Pos Neg SE His SE His SE His SE His



Enzima *A. hydrophila*

Enzima *A. salmonicida*

Figura 40

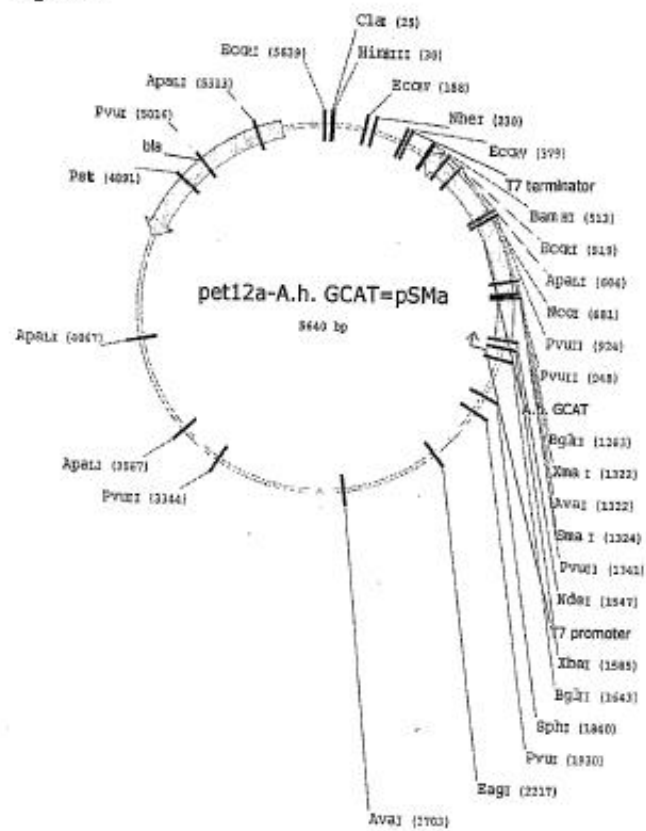


Figura 41.

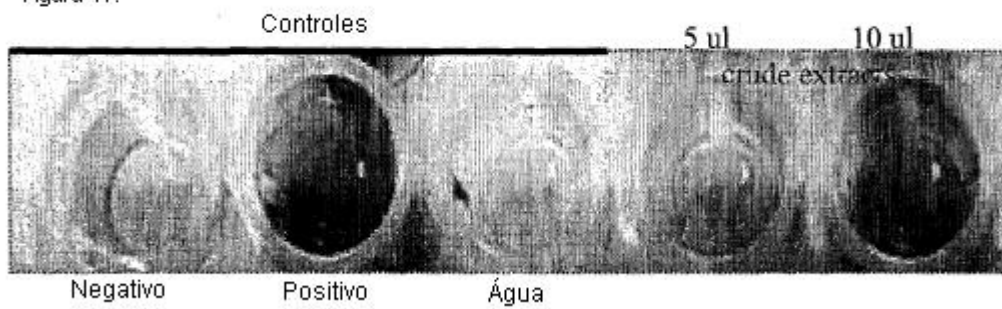


Figura 42.

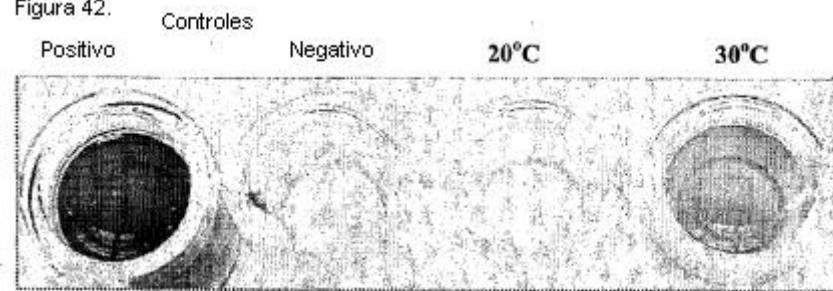


Figura 43.

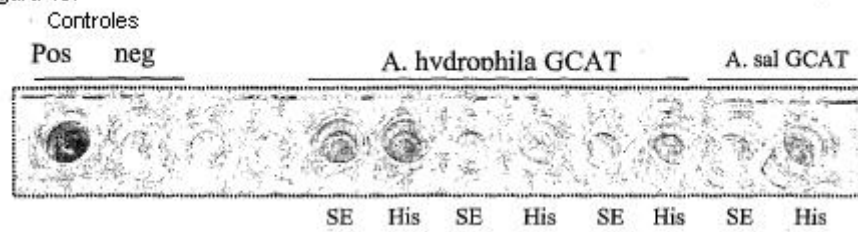


Figura 44.

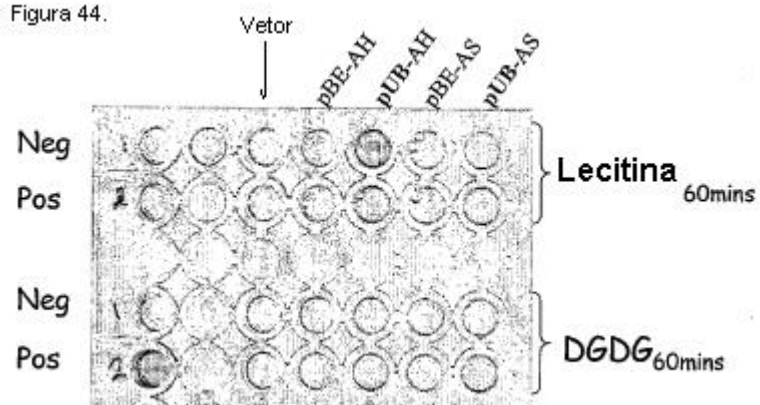


Figura 45

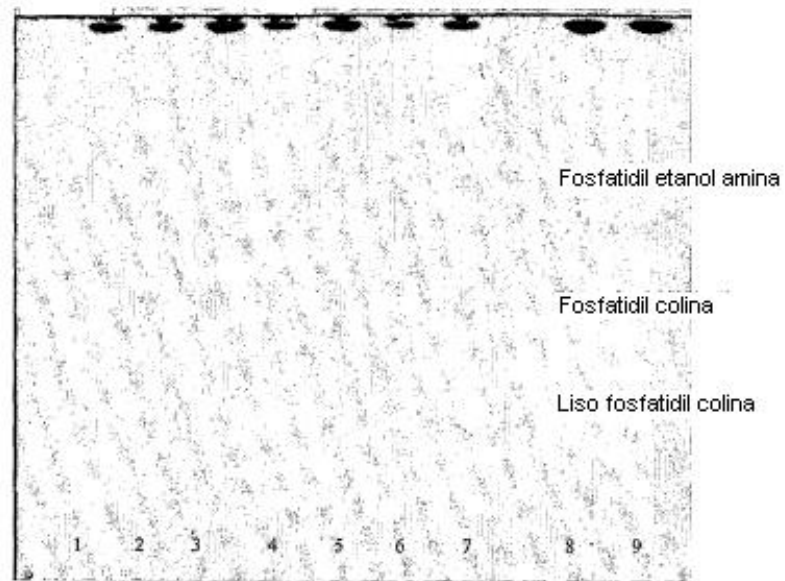


Figura 46

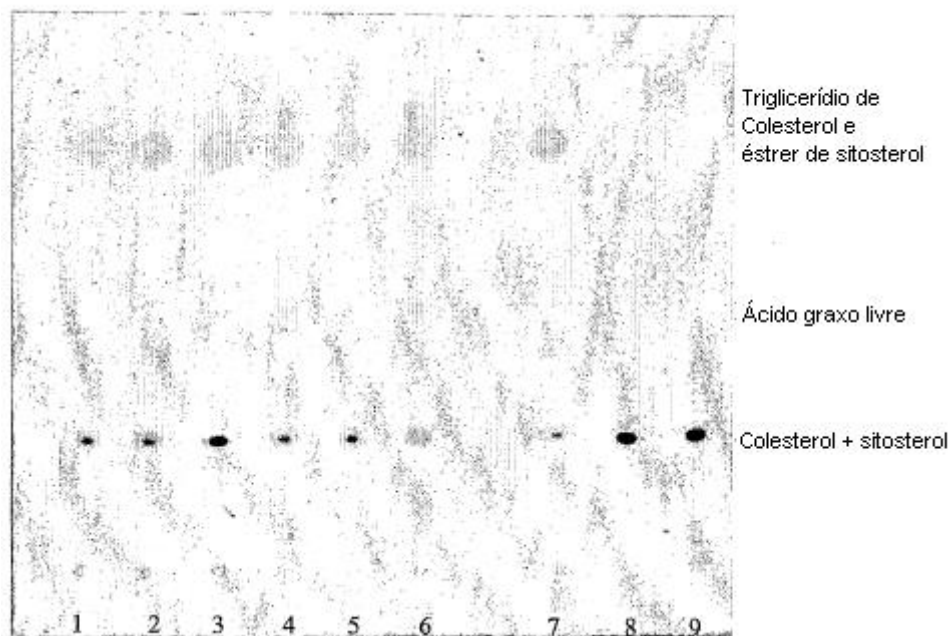


Figura 48.

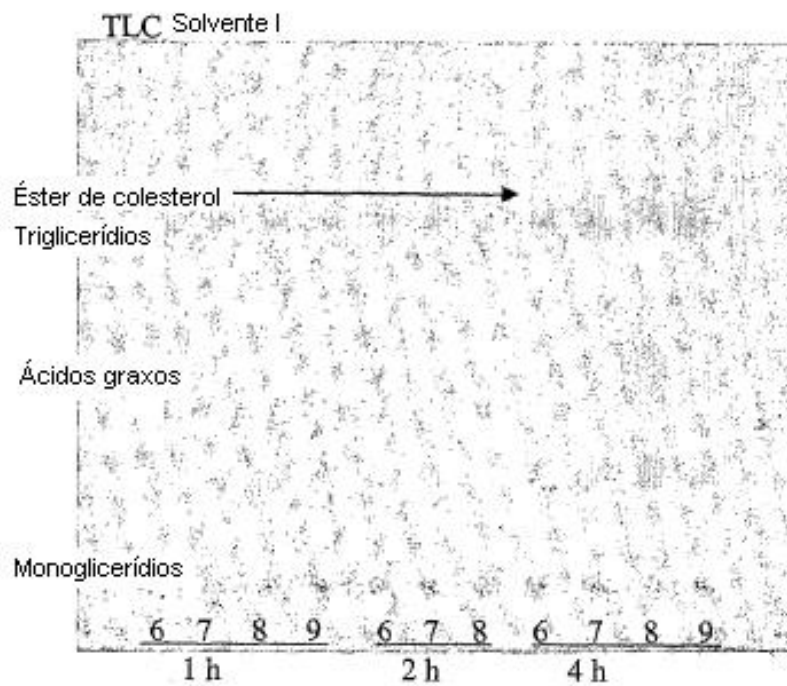


Figura 49.

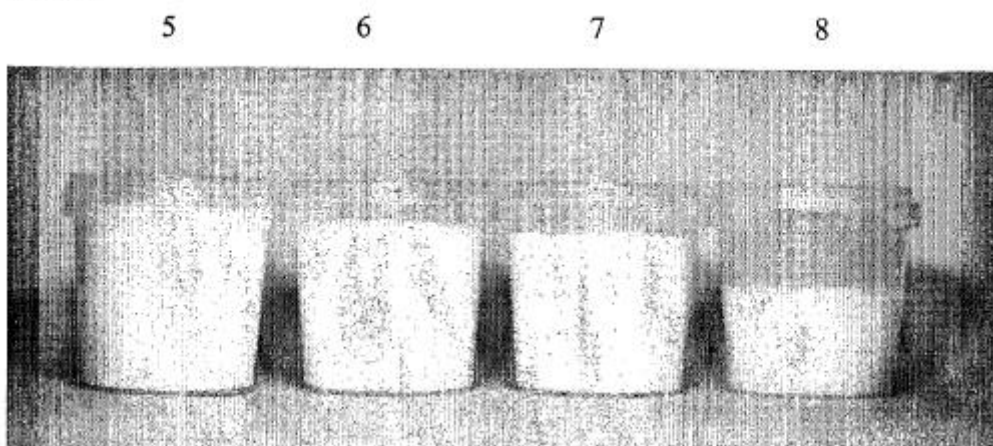


Figura 50.

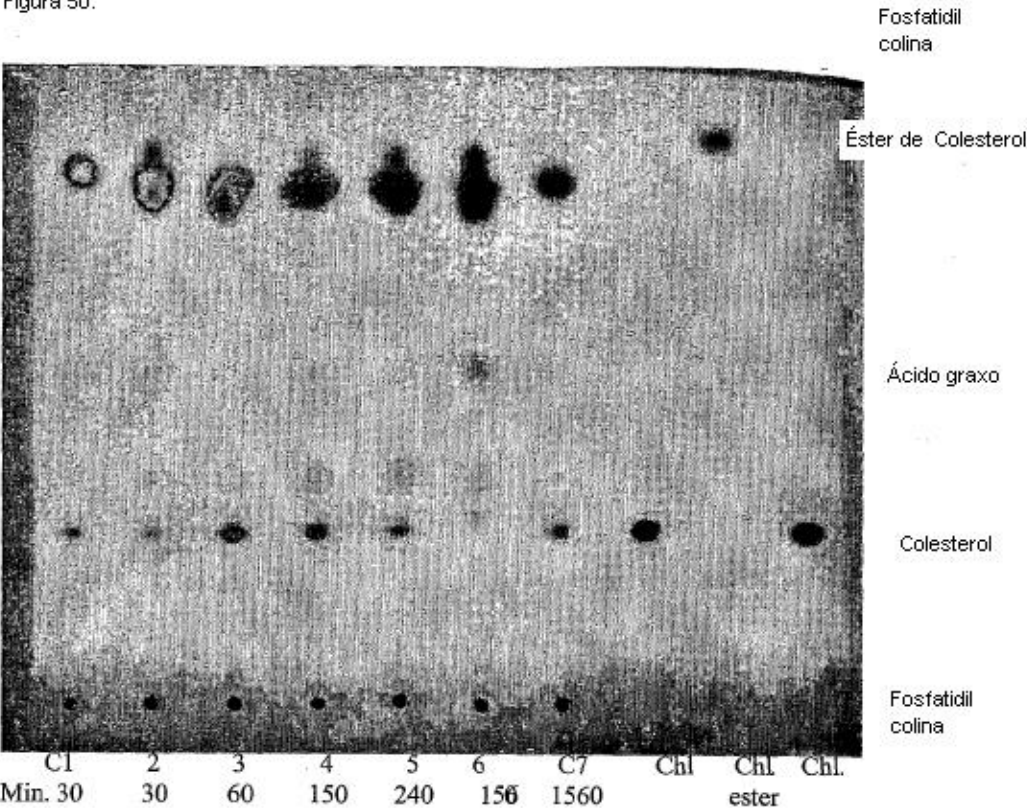


Figura 51.

2254-82-5. TLC dos lipídios da gema de ovo tratada com transferase #135

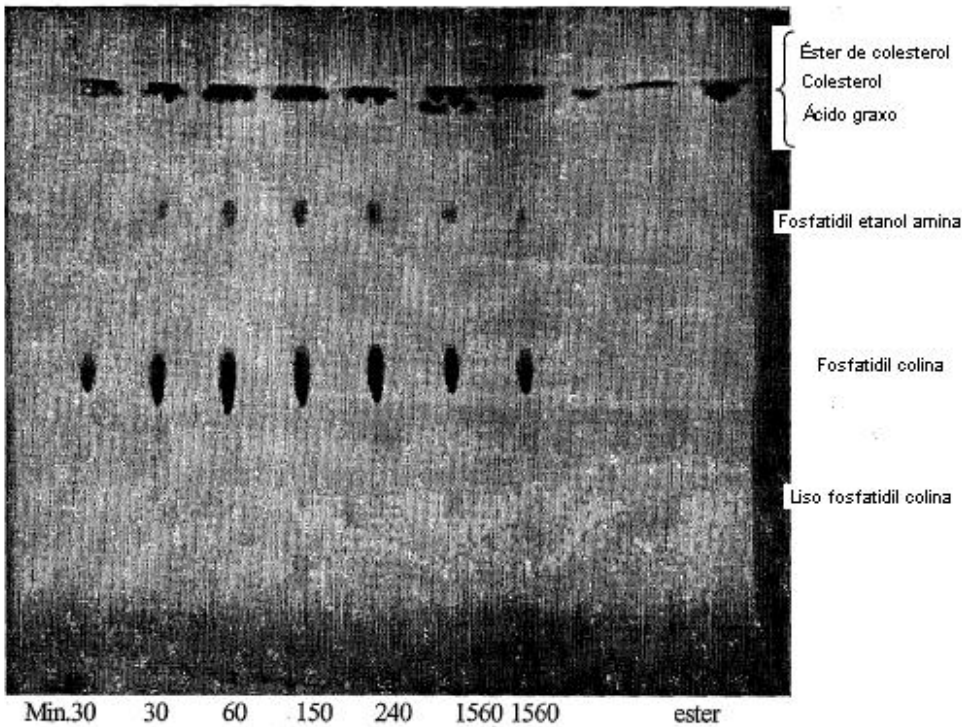


Figura 52.

TLC da gema de ovo tratada por enzima - Solvente IV

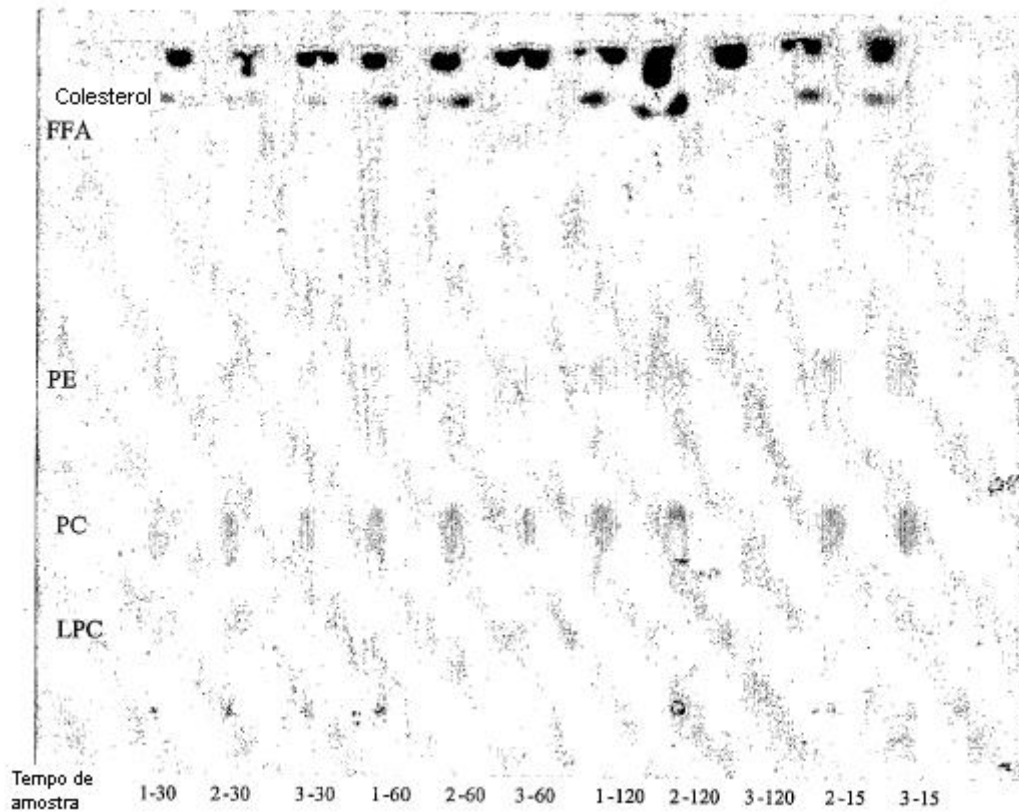


Figura 53.

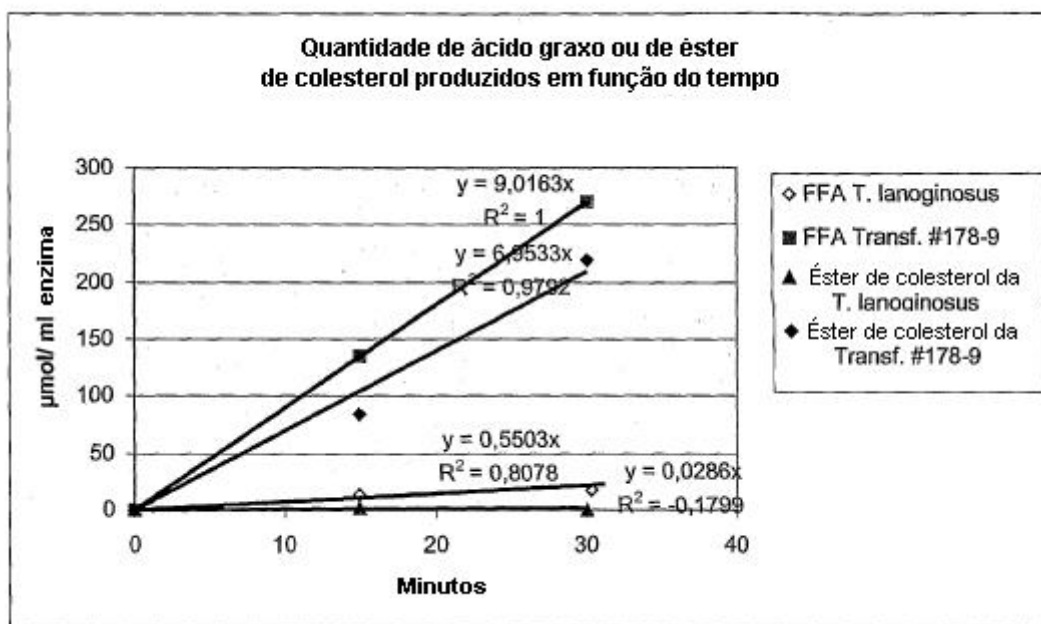


Figura 54.

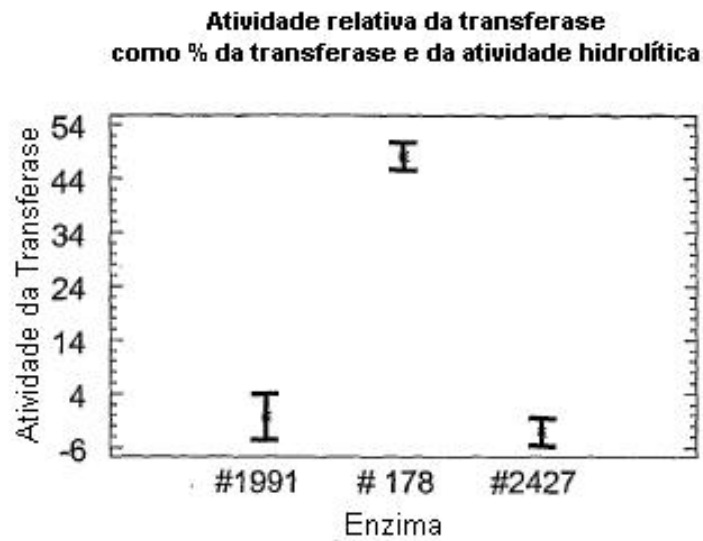


Figura 55.

**Atividade da transferase para #178
como função da % de água do ensaio**

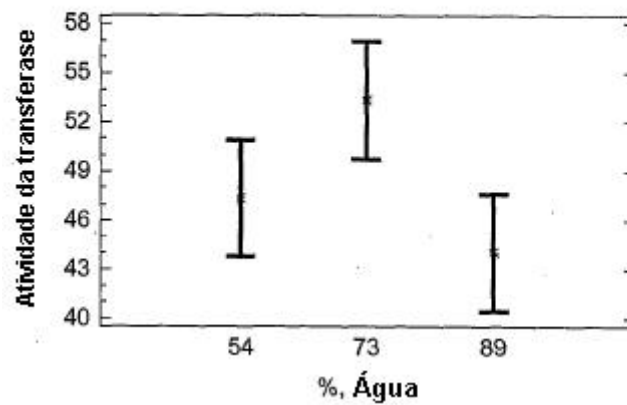


Figura 56.

**Atividade da transferase para #178
em função do tempo de duração do
ensaio.**



Figura 57.

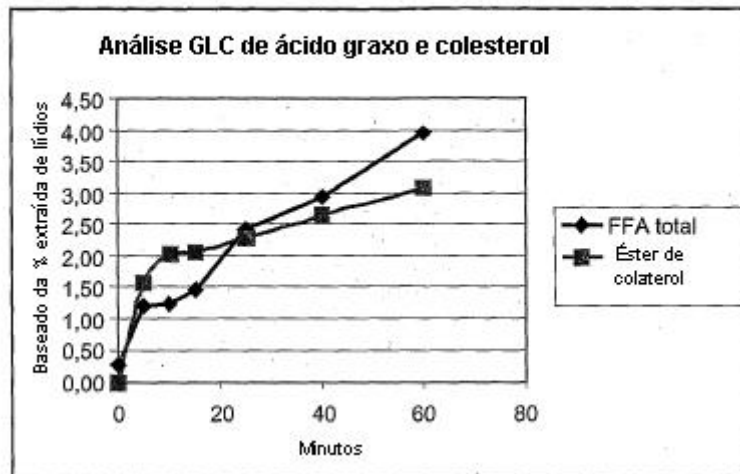


Figura 58.

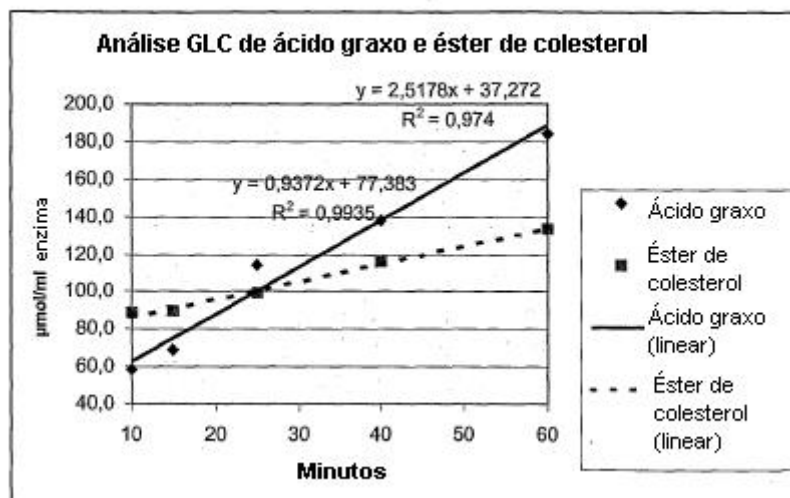


Figura 59.

Colesterol

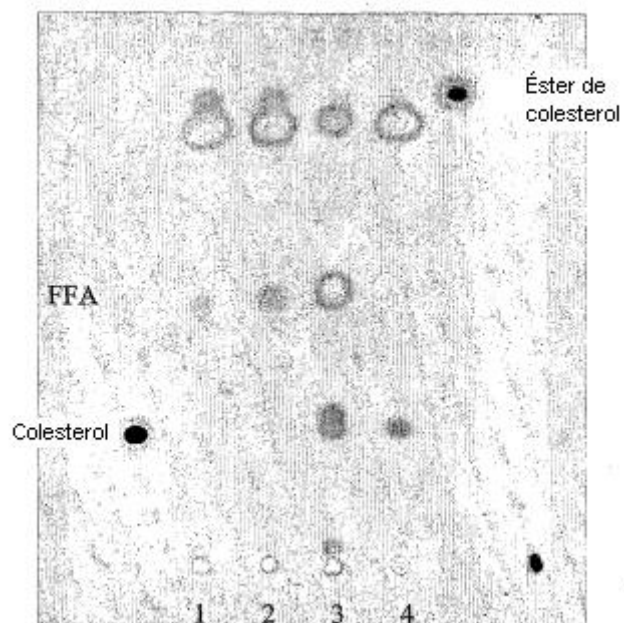


Figura 60.

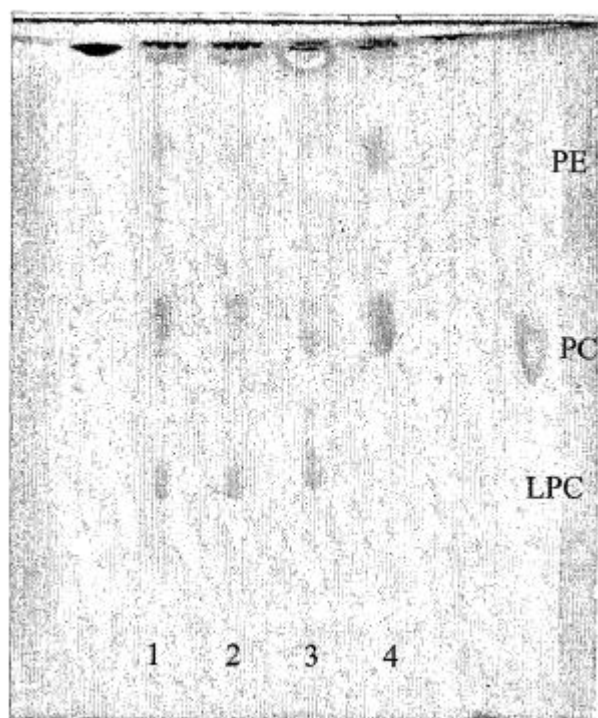


Figura 61.

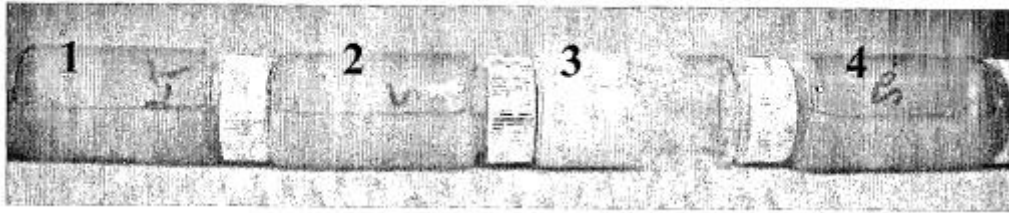


Figura 62.

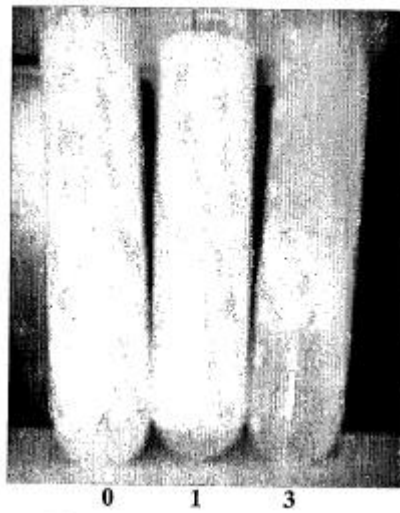


Figura 63.

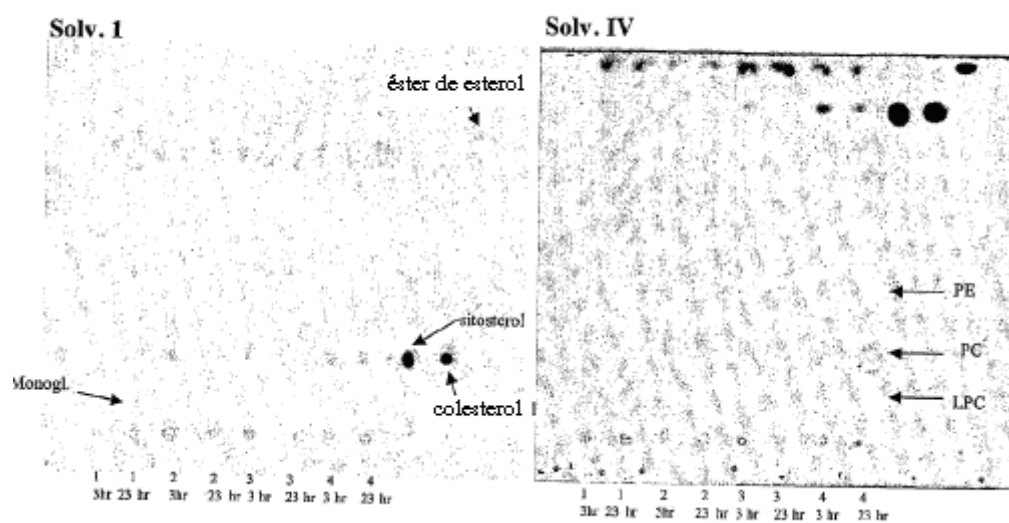


Figura 64.

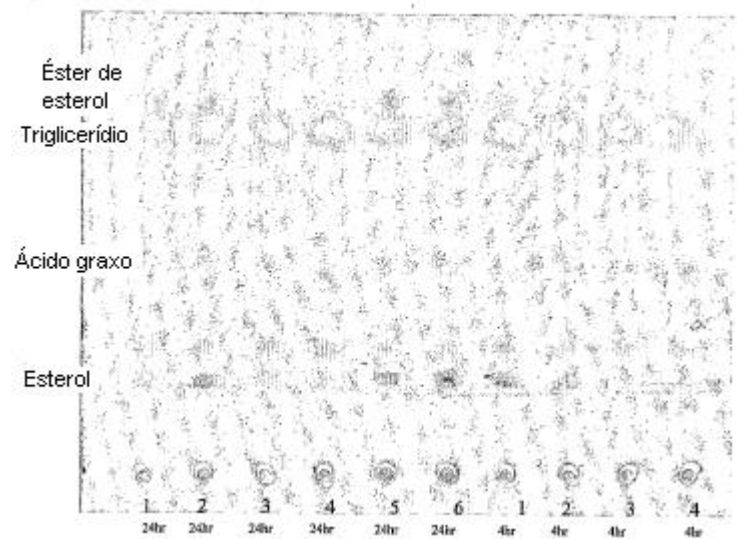


Figura 65.

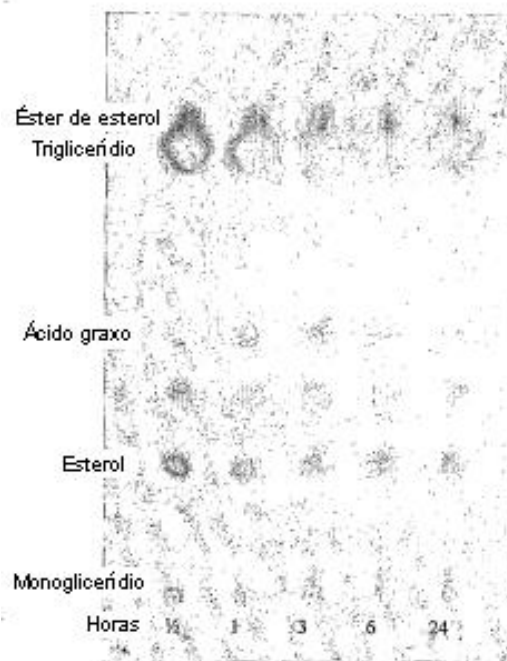


Figura 66.

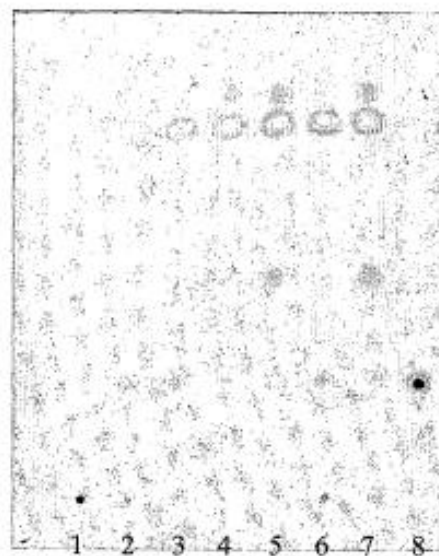


Figura 67.



Figura 68.

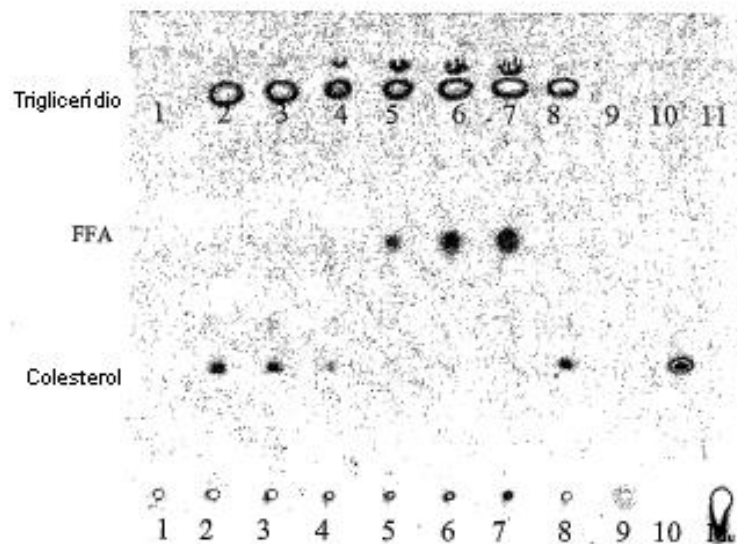


Figura 69.

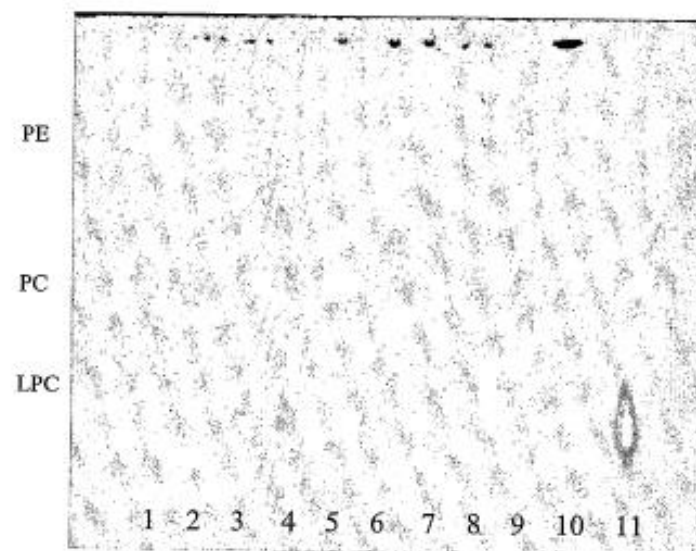


Figura 70.

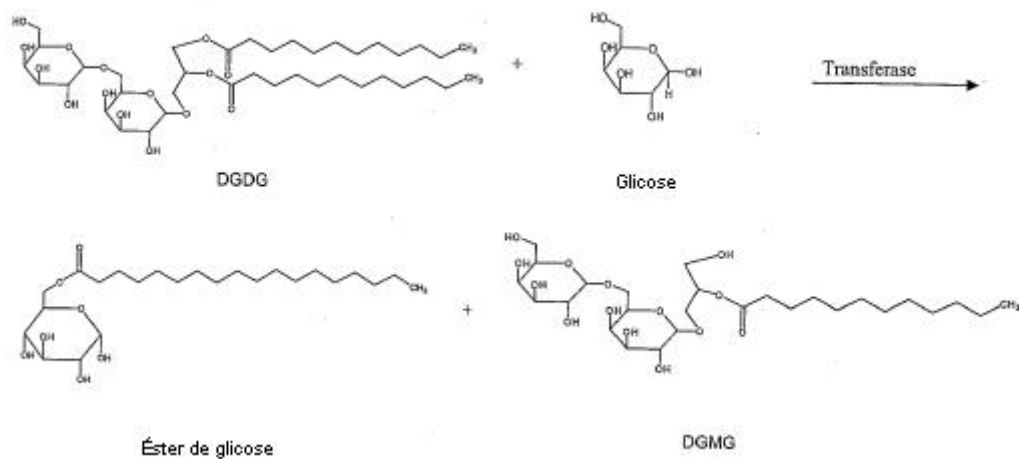


Figura 71

(SEQ ID No. 36)

```

1  MPKFKKNFLV GLSAALMSIS LPSATASAAS ADSRPAPFSRI VMFGDGLSDT
51  GKMYSKMRGY LPSSPPYYBG RFENGPVNLE QLTQKPPGLT IANEARGGAT
101 AVAYNKISWN PKYQVINSLD YEVTQPLQKD SFKPDDLVLIL WVGANDYLAV
151 GWNTQDAKR VRDAISDAAN RMVLGAKQI LLENLFDLQQ NPSARSQKVV
201 EAVSHVSAYH NQLLLNLARQ LAPTGMVKLF EIDKQPAEML RDPQNFULSD
251 VENPCYDGGY VWKPPATRSV STDRQLSAPS PQRLAIAGN PLLAQAVASP
301 MARRASPLIN CEGKMPWDQV HPITVVHAAL SERAATPIAN QYEFLAH**

```

Figura 72.

(SEQ ID No. 54)

```

1  ATGTTTAAAT TTA AAAAGAA TTCTTAGTT GGATTATCGG CAGCTTTAAT
   TACAAATTCA AATTTTCTT AAAGAATCAA CCTAATAGCC GTCGAAATTA

51  GAGTATTAGC TTGTTTTCGG CAACCGCCTC TGCAGCTAGC GCGACAGGCC
   CTCATAATCG AACAAAAGCC GTTGGCGGAG ACGTCGATCG CGGCTGTCGG

101 GTCCCGCCTT TTCCCGGATC GTGATGTTGG GCGACAGCCT CTCGATACC
   CAGGCGCGAA AAGGGCCTAG CACTACAAGC CGCTGTGCGA GAGGCTATGG

151 GGC AAAATGT ACAGCAAGAT GCGCGTTAC CTCCTCTCCA GCGCGCCCTA
   CCGTTTACA TGTCTTCTA CCGCCCAATG GAGGGGAGGT CCGCGGGAT

201 CTATGAGGGC CGTTTCTCCA ACGGACCCGT CTGGCTGGAG CAGCTGACCA
   GATACTCCCG GCAAGAGGT TGCCTGGCA GACCGACCTC GTCGACTGGT

251 AACAGTTCCC GGGTCTGACC ATCGCCAAAG AAGCGGAAGG CGTGCCACT
   TTGTCAAGGG CCGAGACTGG TAGCGGTTC TTCCCTTCC GCCACGGTA

301 GCGTGGCTT ACAACAAGAT CTCCTGGAAT CCGAAGTATC AGGTATCAA
   CCGCACCGAA TGTGTCTA GAGGACCTTA GGGTTCATAG TCCAGTAGTT

351 CAACCTGGAC TACGAGGTCA CCGATTCTT GCAGAAAGAC AGCTCAAGC
   GTTGACCTG ATGCTCCAGT GGGTCAAGAA CGTCTTCTG TCGAAGTTCG

401 CGGACGATCT GGTGATCCTC TGGGTGGTG CCAATGACTA TCTGGCCTAT
   GCTGCTAGA CCACTAGGAG ACCGACCCAC GGTACTGAT AGACCGGATA

451 GGTGGGAACA CGGAGCAGGA TCCCAAGCGG GTTCGCGATG CCATCAGCGA
   CCGACCTTGT GCTCGTCTT ACGGTTCGCC CAGCGCTAC GGTAGTCTGT

501 TCGGGCCAAC CGCATGGTAC TGAACGGTGC CAAGCAGATA CTGCTGTTC
   ACGCCGGTTG GCGTACCATG ACTTGCCAGG GTTGTCTAT GACGACAAGT

551 ACCTGCCGGA TCTGGGCCAG AACCGTCCAG CTCGCAGTCA GAAGTGGTC
   TGGACGGCT AGACCCGGTC TTGGGAGTTC GAGGTCAGT CTCCACCAAG

601 GAGGCGGTCA GGCATGTCTC GCGCTATCAC AACCACTGC TGTGAACTT
   CTCGCCAGT CGGTACAGAG GCGATAGTG TTGGTCGAGG ACGACTTGA

651 GGCACGCCAG CTGGCCCCCA CCGCATGCT AAAGCTGTT CAGATCGACA
   CCGTGGGTC GACCGGGGT GCGGTACCA TTTCGACAAG CTCTAGCTGT

701 AGCAATTGTC CGAGATGCTG CTGATCCGC AGAACTTCG CCGAGCGAC
   TCGTTAAAG GCTCTACGAC GCACTAGGCG TCTGAAGCC GACTCGCTG

751 GTCGAGAACC CCGCTACGA CCGCGGCTAT GTGTGGAAGC CGTTTGCCAC
   CAGCTCTTG GACGATGCT GCGCGGATA CACACCTTC GCAACGGTG

801 CCGCAGCGTC AGCACCGACC GCCAGCTCT CCGCTTCAGT CCGCAGGAAC
   GCGTTCGAG TGTGGCTGG CCGTCGAGG GCGGAGTCA GCGTCTCTG

851 GCGTCGCTAT CCGCGGCAAC CCGTGTCTGG CACAGGCGT TGCAGTCTT
   CCGAGCGGTA GCGCGCTTG GCGACGACC GTGTCCGCA ACGTCAAGG

901 ATGCCCCGCC GCAAGCGCCAG CCGCTCAAC TGTGAGGGA AGATGTTCTG
   TACCGGGCG GCTCGGGTC GGGGAGTTG ACACTCCGT TCTACAAGAC

951 GGATCAGGTA CACCGACCA CTGTCTGCA CCGAGCCCTG AGCGAGCGCG
   CCGATCCAT GTGGGCTGGT GACAGCACGT GCGTCGGAC TCGTCCGC

1001 CCGCACCTT CATCGGAA CAGTACGAGT TCTCGCCA CTGATGA
   GCGGTGAA GTAGCGCTG GTCATCTCA AGGAGCGGT GACTACT

```

Figura 73.

