

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

(21) PI 0721123-6 A2



* B R P I 0 7 2 1 1 2 3 A 2 *

(22) Data de Depósito: 03/12/2007
(43) Data da Publicação: 08/07/2014
(RPI 2270)

(51) Int.Cl.:
A23J 3/34
A23L 1/305
A23C 9/12
A23C 21/02

(54) Título: HIDROLISATOS DE PROTEÍNA DO LEITE **(57) Resumo:**
COM POTENCIAL IMUNOGÊNICO REDUZIDO

(30) Prioridade Unionista: 20/12/2006 US 60/875,967

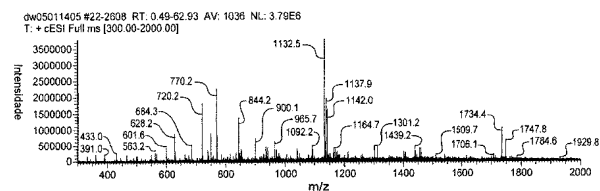
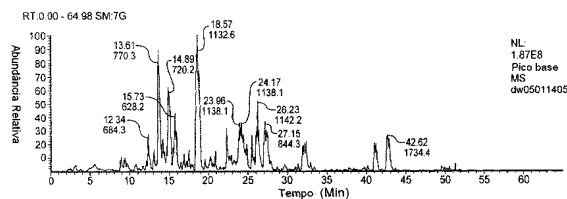
(73) Titular(es): Danisco A/S

(72) Inventor(es): David Wong, Manoj Kumar

(74) Procurador(es): Soerensen Garcia Advogados
Associados

(86) Pedido Internacional: PCT US2007024723 de
03/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/088472 de
24/07/2008



RELATÓRIO DESCRITIVO

Pedido de Patente de Invenção para: "**HIDROLISATOS DE PROTEÍNA DO LEITE COM POTENCIAL IMUNOGÊNICO REDUZIDO**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção se refere às composições contendo proteínas hidrolisadas do leite e/ou proteínas do soro, e método para produzi-las. São também divulgados os hidrolisatos proteolíticos de tais proteínas possuindo potencial imunogênico reduzido para uso em aplicações em que há risco de
10 resposta imunológica indesejável às proteínas.

ANTECEDENTES

O leite é um produto usado amplamente não somente como uma bebida nutritiva em sua forma fluida, mas também como uma base para outros numerosos produtos tais como sorvete, iogurte,
15 manteiga, creme e queijo. Além disso, o leite e seus componentes são usados amplamente como ingredientes nutricionais e funcionais em diversos produtos alimentícios.

O soro é um subproduto da produção de queijo. O soro se tornou um ingrediente ou aditivo alimentício útil para várias
20 finalidades. Um típico processo de produção de queijo pode produzir somente cerca de 4,54 kg de queijo, mas 40,82 kg de soro para cada 45,34 kg de leite processado. O soro é rico em lactose, um açúcar naturalmente encontrado no leite, e também contém uma quantidade de proteínas que não coagulam ou
25 precipitam durante o processo de produção de queijo, mas sim permanecem solúveis. Proteínas do soro são conhecidas por

serem altamente nutritivas e podem, dessa forma, ser valiosas, mas estão presentes em uma solução aquosa diluída de sais, lactose, proteínas, e alguns lipídios.

Por causa da sua natureza diluída, em alguns locais o soro
5 ainda é frequentemente tratado como um produto de descarte ou rejeito, apesar do custo de descartá-lo. Onde é economicamente praticável, o soro é frequentemente desidratado por aspersão (*spray-dried*), ou ainda processado para separar as proteínas e/ou a lactose da água, e um do outro.

10 O soro, ou diversos dos seus componentes, podem ser adicionados a uma grande variedade de alimentos processados para prover excelentes propriedades nutricionais e funcionais para o processador e o consumidor.

Proteínas do soro podem compreender cerca de 20% da
15 proteína total do leite. A composição do soro produzido após a coalhagem (*curding*) na produção de queijo inclui proteínas, junto com a lactose, gordura e cinzas (2-5%). Lactoalbumina e lactoglobulina são duas proteínas do leite predominantes no soro. Foi verificado que cada uma dessas proteínas, bem como
20 outras proteínas encontradas no leite, possui potencial imunogênico, por exemplo, como alérgenos. Pelo fato dessas proteínas serem potenciais imunógenos, ou mesmo alérgenos, certos consumidores podem evitar o uso de produtos alimentícios e/ou cosméticos contendo leite, soro, ou
25 componentes dos mesmos, por exemplo, as proteínas do soro lactoalbumina e lactoglobulina. Em algumas circunstâncias,

profissionais sanitários podem orientar certos consumidores a evitar produtos contendo proteínas do soro e leite. Dessa forma, há uma necessidade permanente da redução do potencial imunogênico de proteínas do leite e proteínas do soro.

5 RESUMO

Em muitos dos seus vários aspectos, composições e métodos são providos para o uso de composições contendo proteínas do soro e/ou proteínas do leite hidrolisadas que são hidrolisadas com uma ou mais enzimas proteolíticas de modo a reduzir o
10 risco de resposta imunológica, particularmente resposta imunológica adversa, às proteínas, em uma pessoa predisposta a tal resposta.

Em um aspecto, são fornecidos hidrolisatos compreendendo pelo menos uma proteína do leite hidrolisada com pelo menos
15 uma enzima proteolítica que cliva preferencialmente um resíduo de ácido glutâmico ou ácido aspártico. Os hidrolisatos apresentam imunogenicidade reduzida em um indivíduo predisposto a possuir uma reação imune à proteína. Em determinadas modalidades, a enzima proteolítica é uma
20 endopeptidase. Em uma modalidade, a endopeptidase cliva a porção carboxi-terminal de um resíduo de ácido glutâmico ou um resíduo de ácido aspártico. Em uma modalidade, a endopeptidase é de um *Streptomyces*, *Staphylococcus* ou um *Bacillus*.

Em uma outra modalidade deste aspecto, a proteína da qual
25 o hidrolisato é produzido é uma proteína do soro, ou compreende pelo menos uma entre uma lactoalbumina ou uma

lactoglobulina, tal como uma alfa lactoalbumina ou uma beta lactoglobulina.

O hidrolisato é preferivelmente enriquecido em peptídios terminantes em resíduos de ácido glutâmico ou ácido aspártico, em comparação com a proteína não-hidrolisada. Em uma modalidade, a endopeptidase é enriquecida em um ou mais dos peptídios AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), ou KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4). Em outras modalidades, é enriquecida em um ou mais dos peptídios ELEE (SEQ ID NO: 5), VATEE (SEQ ID NO: 6), PFTE (SEQ ID NO: 7), NSAEPE (SEQ ID NO: 8), VFGKE (SEQ ID NO: 9), ASQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4), IQPTPE (SEQ ID NO: 10), LKPTPE (SEQ ID NO: 11), LKPTPEGD (SEQ ID NO: 12), LKPTPEGDL (SEQ ID NO: 13), TKIPAVFKID (SEQ ID NO: 14), ou TKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 15), e/ou uma ou mais de DQAME (SEQ ID NO: 16), GIHAQQKE (SEQ ID NO: 17), VLNE (SEQ ID NO: 18), VFGKE (SEQ ID NO: 19), RLHSMKE (SEQ ID NO: 20), DIQME (SEQ ID NO: 21), KHPIKHQGLPQE (SEQ ID NO: 22), RPKHPIKHQGLPQE (SEQ ID NO: 23), PMIGVNQE (SEQ ID NO: 24), GIHAQQKEPMEGVNQE (SEQ ID NO: 25), RYLGYLE (SEQ ID NO: 26), LAYFYPE (SEQ ID NO: 27), FVAPFPE (SEQ ID NO: 28), KTTMPLW (SEQ ID NO: 29), LFRQFYQLD (SEQ ID NO: 30), FFVAPFPE (SEQ ID NO: 31), NLLRFFVAPFPE (SEQ ID NO: 32), ou ENLLRFFVAPFPE (SEQ ID NO: 33).

São também fornecidos aqui os hidrolisatos contendo proteína do soro enriquecidos em um ou mais dos peptídios: ELEE (SEQ ID NO: 5), VATEE (SEQ ID NO: 6), PFTE (SEQ ID NO: 7), NSAEPE (SEQ ID NO: 8), VFGKE (SEQ ID NO: 9), ASQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4), IQPTPE (SEQ ID NO: 10), LKPTPE (SEQ ID NO: 11), LKPTPEGD (SEQ ID NO: 12), LKPTPEGDLE (SEQ ID NO: 13), TKIPAVFKID (SEQ ID NO: 14), ou TKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 15). Os hidrolisatos de proteína do soro possuem imunogenicidade reduzida em um indivíduo predisposto a apresentar uma reação imune a uma ou mais proteínas do soro.

Em uma modalidade, o hidrolisato contendo proteína do soro é preferencialmente enriquecido em um ou mais dos peptídios ASQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), ou KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4). O hidrolisato deste aspecto é produzido através do uso de uma endopeptidase que preferencialmente cliva a porção carboxi-terminal de um resíduo de ácido glutâmico ou um resíduo de ácido aspártico. A endopeptidase em uma modalidade não requer um íon metálico para sua atividade.

São também fornecidos aqui ingredientes alimentícios compreendendo um hidrolisato de proteína do soro enriquecido em um ou mais dos peptídios ASQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), ou KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4). Os ingredientes alimentícios

fornecidos possuem imunogenicidade reduzida em um indivíduo predisposto a apresentar uma reação imune a uma ou mais proteínas do soro.

São também fornecidos aqui produtos alimentícios
5 manufaturados compreendendo um hidrolisato de proteína do soro enriquecido em um ou mais dos peptídios ASQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), ou KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4). Os produtos alimentícios manufaturados possuem imunogenicidade reduzida em um indivíduo
10 predisposto a apresentar uma reação imune a uma ou mais proteínas do soro.

Exemplos de tais produtos alimentícios manufaturados fornecidos de acordo com o descrito aqui incluem comida industrializada para bebês, bebidas isotônicas, produtos
15 contendo queijo, suplementos de proteínas, suplementos nutricionais ou produtos que substituem refeições.

Produtos não-alimentícios que compreendem quaisquer dos hidrolisatos aqui descritos também são fornecidos. Em diversas modalidades, o produto não-alimentício é um cosmético, uma
20 loção, ou um produto de limpeza para uso em pele humana. Em uma modalidade, o produto não-alimentício compreende um hidrolisato de proteína do soro enriquecido em um ou mais dos peptídios ASQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), ou KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4),
25 e possui imunogenicidade reduzida em um indivíduo predisposto a apresentar uma reação imune a uma ou mais proteínas do soro.

São também fornecidas composições compreendendo pelo menos dois hidrolisatos conforme descrito aqui, em que cada hidrolisato é produzido com pelo menos uma enzima diferente possuindo uma especificidade diferente, ou cada hidrolisato é
5 produzido com a mesma enzima de uma proteína diferente ou mistura protéica.

O resumo precedente, bem como a descrição detalhada e exemplos seguintes tem por objetivo ilustrar diversas modalidades.

10 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As figuras anexas servem para ilustrar ou explicar adicionalmente vários aspectos das composições ou métodos descritos de maneira mais completa aqui e exemplificados abaixo.

15 Figura 1: análise SDS-PAGE mostrando o curso do tempo da proteólise de proteínas do soro durante 20 horas de tratamento com S-Glu ou L-Glu. Linhas (da esquerda para a direita) 1, 2, 3: Tratamento com S-Glu por 2, 4 e 20 horas, respectivamente; Linha 4: Controle de soro; Linhas 5, 6, 7: Tratamento com L-
20 Endo por 20, 4 e 2 horas, respectivamente; Linha 8: Controle de soro; Linhas 9, 10: Marcadores de peso molecular (proteínas padrão).

Figura 2: Análise por espectrômetro de massa representativa de proteína do soro digerida por endopeptidase.
25 A amostra foi coletada a 20 horas da digestão da amostra com L-Glu. O painel A mostra a detecção de várias espécies de peso

molecular na amostra. O painel B mostra a abundância relativa dos produtos de degradação predominantes.

Figura 3: Análise por espectrômetro de massa representativa de proteína do soro digerida por endopeptidase.

5 A amostra foi coletada a 20 horas da digestão da amostra com S-Glu. O painel A mostra a detecção de várias espécies de peso molecular na amostra. O painel B mostra a abundância relativa dos produtos de degradação predominantes.

Figura 4: Análise SDS-PAGE de leite desnatado-I, hidrólise
10 por Endo Glu-peptidase: Linhas (da esquerda para a direita):
1, 2, 3: Digestão com S-Endo em $t = 2, 4$ e 20 horas,
respectivamente; Linha 5: Controle de leite desnatado I;
Linhas 7, 8, 9: Digestão com L-Endo em $t = 2, 4$ e 20 horas;
Linha 10: marcador de peso molecular.

15 Figura 5: Análise SDS-PAGE de leite desnatado-II,
hidrólise por Endo Glu-peptidase: Linhas (da esquerda para a
direita): 1, 2, 3: Digestão com S-Endo em $t = 2, 4$ e 20 horas,
respectivamente; Linha 5: Controle de leite desnatado II;
Linhas 7, 8, 9: Digestão com L-Endo em $t = 2, 4$ e 20 horas;
20 Linha 10: marcador de peso molecular.

Figura 6: Análise SDS-PAGE de hidrólise de caseína por
Endo Glu: Linhas (da esquerda para a direita): 1, marcador de
peso molecular; Linhas 2, 3, 4: Digestão com S-Endo a 2, 4 e
20 horas respectivamente; Linha 5: marcador; Linhas 6, 7, 8:
25 Digestão com L-Endo a 2, 4 e 20 horas respectivamente; Linha
10: caseína C-5890 Sigma.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES ILUSTRATIVAS

Acrônimos e Abreviações:

cP: centiPoise: unidades de viscosidade dinâmica;

DFP: Diisopropilfluorofosfato;

5 EDTA: Ácido tetracético etilenodiamina.

Endo-Glu: Endopeptidase que cliva um sítio próximo a um resíduo GLU em um polipeptídeo, clivando preferivelmente a porção carboxi-terminal do resíduo GLU; também algumas vezes referido aqui como EndoGluC, onde a clivagem é definitivamente para a porção carboxi-terminal de um resíduo GLU.

GMP(s): Boas práticas de fabricação (do inglês *good manufacturing practice(s)*;

HPLC: Cromatografia líquida de alto desempenho;

hr(s): hora(s);

15 IU: Unidades internacionais;

LC/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa;

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem;

20 L-Endo: Uma endopeptidase Glu-C de *Bacillus lichenformis*; também algumas vezes referida aqui como "L-Glu" ou "L-MPR".

MS: Espectrometria de massa, algumas vezes usada genericamente para compreender as análises acopladas LC/MS e LC-MS/MS;

25 MW: Peso molecular;

PMSF: fenilmetilsulfonilfluoreto;

S-Endo: Uma endopeptidase Glu-C de *Bacillus subtilis*; também algumas vezes referida aqui como "S-Glu" ou "S-MPR".

SDS PAGE: Gel de eletroforese de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio;

5 Succ-AAPEpNA: Succinil-Ala-Ala-Pro-Glu-p-nitroanilida;

t: tempo;

TFA: Ácido trifluoroacético

TP: proteína total - por exemplo: proteína total solúvel em solução sobrenadante;

10 w/w: peso por peso (ou peso para peso), geralmente descreve uma base de determinação de uma porcentagem; usada, por exemplo, para expressar concentrações de compostos adicionados;

w/v: peso por volume (ou peso para volume), uma base
15 alternativo para determinar uma porcentagem; usada, por exemplo, para expressar concentrações de compostos adicionados.

Definições

Como usado aqui, o termo "hidrolisato de proteína" se
20 refere ao produto resultante do tratamento da proteína com uma enzima proteolítica. A extensão da clivagem proteolítica da proteína pode variar de mínima (por exemplo, clivagem da ligação de um único peptídeo com uma única proteína) a extensa (por exemplo, clivagem de todas as ligações peptídicas
25 presentes na amostra que apresentem os requerimentos de especificidade da enzima proteolítica sendo usada) dependendo,

por exemplo, das condições do tratamento, tais como extensão do tratamento, temperatura, concentração da proteína, e pureza, concentração, e atividade da enzima proteolítica.

Conforme usado aqui, "proteína do leite" compreende
5 qualquer proteína de ocorrência natural na secreção normal da glândula mamária de um mamífero fêmea após o parto, ou produtos derivados destes, tais como frações dos mesmos, ou componentes feitos destes e dos mesmos. O leite pode ser de qualquer espécie de mamífero incluindo, mas não limitado a
10 vaca, cabra, ovelha, búfala, iaque, camelo, lhama, alpaca, e humana. São preferidas proteínas do leite destes mamíferos cujo leite é usado comercialmente ou amplamente em várias culturas e países. Deve-se notar que "proteína do leite" conforme usado aqui compreende tanto o singular quanto o
15 plural da palavra "proteína", dessa forma, o termo "proteína do leite" pode se referir a uma única proteína, ou qualquer mistura de uma ou mais proteínas, exceto quando indicado de outra forma.

"Proteína do soro" compreende qualquer proteína encontrada
20 em qualquer quantidade no "soro", o subproduto líquido da produção de queijo que é separado da coalhada. O soro resultante da produção de muitos queijos é particularmente pobre em proteínas micelares do leite, tais como caseína, mas relativamente enriquecido em proteínas solúveis tais como
25 alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina. Assim como "proteína do leite" descrito acima, o termo "proteína do soro" usado

aqui compreende tanto o singular quanto o plural da palavra "proteína", dessa forma, o termo "proteína do leite" pode se referir também a uma única proteína, ou qualquer mistura de uma ou mais proteínas, exceto quando indicado de outra forma.

5 Será compreendido pelo versado na técnica que proteínas do soro são de fato, uma subclasse das proteínas do leite, e assim o termo "proteína do leite" pode incluir uma ou mais proteínas do soro, exceto quando aqui indicado de outra forma. Compostos do soro podem incluir, por exemplo, soro de leite,
10 creme, e queijo. O soro derivado de qualquer tipo de queijo pode ser usado. A proteína do soro pode ser derivada de quaisquer métodos tais como filtração, diálise, evaporação, e osmose reversa de soro de queijo, ou por qualquer outro processo que resulte nas proteínas tipicamente descritas como
15 "proteínas do soro".

Como usado aqui, um indivíduo sensível é um indivíduo predisposto a apresentar uma resposta ou reação imune à proteína em uma forma não hidrolisada. Tal resposta ou reação imune, como um resultado direto ou indireto do consumo de, ou
20 exposição a, por exemplo, uma ou mais proteínas do leite e/ou proteínas do soro, é uma medida da imunogenicidade daquelas proteínas. Tais proteínas demonstrarão pequena à nenhuma imunogenicidade em um indivíduo que não é predisposto a apresentar tal resposta imune à proteína, tal indivíduo é
25 algumas vezes referido aqui como "insensível" ou "não sensível" a uma ou mais proteínas do leite e do soro.

Preferivelmente, tal indivíduo não apresentará uma reação imune (resposta imunológica) significativa nem à exposição, nem ao consumo da proteína.

Como usado aqui, "imunogenicidade reduzida" se refere a
5 qualquer redução, diminuição, ou melhora de uma resposta imunológica mensurável. A medida de tal resposta pode ser avaliada *in vitro* ou *in vivo*. Por exemplo, a resposta pode ser medida diretamente ou indiretamente em uma amostra biológica compreendendo tecido, células, ou fluido, ou semelhantes, ou
10 qualquer combinação dos mesmos de um indivíduo, ou pode ser avaliada no indivíduo, tanto direta quanto indiretamente. Enquanto que em várias modalidades fornecidas aqui, qualquer diminuição (ou redução) matemática em tal resposta, se medida *in vitro* ou *in vivo*, irá bastar, é preferível que a diminuição
15 seja uma mais substancial. De maneira óbvia, o versado na técnica reconhecerá que dados biológicos tais como uma medida de uma resposta imunológica, são sujeitos a variações potencialmente grandes em um indivíduo, e de indivíduo para indivíduo. Por exemplo, onde a resposta for em um indivíduo
20 "sensível", a resposta imune é preferivelmente reduzida substancialmente (por exemplo, em pelo menos cerca de 50 %, 60 % ou 70%, ou até cerca de 80 % ou mais). Mais preferivelmente, somente diferenças pequenas ou mínimas são vistas em tal indivíduo sensível com os hidrolisatos de proteína descritos
25 aqui, quando comparado com uma medida da resposta imunológica de um indivíduo que não é sensível a uma ou mais proteínas não

tratadas do leite ou do soro. Isso é particularmente preferível onde a resposta imunológica é considerada adversa, por exemplo, uma resposta alérgica. Em tais casos, a diminuição na resposta imunológica do indivíduo sensível (ou
5 medida da mesma) pode ser de pelo menos cerca de 85 % a cerca de 90 %, mais preferivelmente de cerca de 90 % a cerca de 95 %, ou até mais. Em alguns casos, uma resposta do indivíduo sensível ao hidrolisatos de proteína descritos aqui não é significativamente diferente, estatisticamente, da resposta de
10 um indivíduo que não é sensível. Ainda em outros casos, a redução na resposta imunológica pode ser muitas vezes superior que aquela vista com a proteína não-hidrolisada em um indivíduo "sensível". Por exemplo, pode haver uma redução de da resposta de cerca de 10 vezes a cerca de 100 vezes ou até
15 1.000 vezes. Mais preferivelmente há reduções de cerca de 1.000 vezes a 10.000 vezes ou até 100.000 vezes ou reduções maiores em uma medida de uma resposta imunológica de um indivíduo que consome ou é exposto a compostos de hidrolisato de proteína como descrito aqui, quando comparadas àquela
20 resposta do indivíduo às proteínas não modificadas.

Hidrolisatos de proteína

Em um primeiro de seus diversos aspectos, hidrolisatos de proteína são fornecidos compreendendo pelo menos uma proteína do leite hidrolisada com pelo menos uma enzima proteolítica
25 que cliva preferencialmente em um resíduo de ácido glutâmico ou ácido aspártico. Em uma modalidade, o hidrolisato reduziu a

imunogenicidade em um indivíduo predisposto a apresentar uma reação imune à proteína em uma forma não hidrolisada.

Em certas modalidades, o hidrolisato contendo pelo menos uma proteína do leite é hidrolisado com uma endopeptidase. A
5 especificidade da endopeptidase é preferivelmente limitada. Como um versado na técnica compreenderá, para uso em produtos alimentícios, a proteólise extensiva, não-específica de proteínas pode conduzir a propriedades indesejáveis, tais como sabores estranhos e/ou perda de funcionalidade. A
10 endopeptidase para uso aqui cliva preferencialmente dessa forma em somente uma extensão limitada, por exemplo, por apresentar especificidade para um ou mais aminoácidos particulares, ou tipos particulares de aminoácidos em qualquer ou ambos as porções carboxi-terminal e amino-terminal do sítio
15 de clivagem.

Em determinadas modalidades presentemente preferidas, a endopeptidase apresenta uma especificidade para a porção carboxi-terminal de resíduos de aminoácidos hidrofílicos, particularmente resíduos de ácido glutâmico ou ácido
20 aspártico. Em uma modalidade, a endopeptidase cliva especificamente na porção carboxi-terminal de resíduos de ácido glutâmico e/ou resíduos de ácido aspártico. Em uma outra modalidade, a endopeptidase exclusivamente ou quase exclusivamente na porção carboxi-terminal dos resíduos de
25 ácido glutâmico.

Em certas modalidades, a endopeptidase é da família serina protease. É inibida, pelo menos parcialmente, se não completamente, por fenilmetilsulfonilfluoreto ou diisopropilfluorofosfato. Em certas modalidades, a endopeptidase é de um *Streptomyces*, *Staphylococcus*, ou um *Bacillus* spp. Alternativamente, a endopeptidase pode ser de qualquer fonte que seja adequada para uso em produção de alimentos e rações. Em uma modalidade, a endopeptidase é de *Bacillus subtilis* ou de *Bacillus lichenformis*. Em certas modalidades, a endopeptidase é uma proteína de 23,6 kDa de *B. lichenformis*, a sequência de aminoácidos da qual é fornecida na base de dados do Laboratório Europeu de Biologia Molecular (EMBL) sob o número de acesso EMBL P80057. Alternativamente, a endopeptidase é uma proteína de 23,9 kDa de *B. subtilis*, a sequência de aminoácidos da qual é fornecida na base de dados do EMBL sob o número de acesso EMBL P39790. Ainda em uma outra modalidade, a enzima é qualquer endopeptidase que satisfaça o critério mencionado acima, com a condição que não seja uma endopeptidase revelada na Patente americana N° US5,866,357.

A fonte de leite para a proteína não é limitada a qualquer espécie de mamífero, e assim é contemplado que leite de espécies incluindo, mas não limitado a vaca, cabra, ovelha, búfalo, cavalo, camelo, iaque, lhama, alpaca, e humanos pode ser usado aqui. Em uma modalidade, as proteínas do leite se originam de uma espécie que é diferente da do indivíduo que é exposto a ou que consome a proteína do leite. Em outra

modalidade, um indivíduo é sensível à proteínas de leite de sua própria espécie. Assim, as proteínas do leite podem ser da mesma espécie que o indivíduo. Em tais modalidades, as proteínas modificadas reduzem a imunogenicidade da proteína do
5 leite naquele indivíduo. Em uma modalidade, o indivíduo (algumas vezes referido aqui como uma "pessoa") é humano, e o leite é de uma espécie animal não-humana cujo leite é frequentemente consumido por humanos, por exemplo, vaca, cabra, ovelha, ou búfalo.

10 Em certas modalidades, pelo menos uma proteína do leite é uma proteína solúvel, não micelar. Dessa forma, a proteína do leite preferivelmente não é uma caseína em tais modalidades. Em uma modalidade, a proteína do leite é uma proteína solúvel, por exemplo, uma ou mais das proteínas tipicamente encontradas
15 no soro resultantes da produção de qualquer queijo produzido da coalhada.

Em uma modalidade particular, a proteína inclui pelo menos uma lactoalbumina ou uma lactoglobulina. Como versado na técnica apreciará, há uma variedade de tais proteínas que vêm
20 sendo identificadas no leite de vários mamíferos. Entre as proteínas do soro predominantes estão a alfa-lactoalbumina e a beta-lactoglobulina, ambas as quais são adequadas para uso neste. Deve-se compreender que uma proteína do soro não será tipicamente isolada de outras proteínas do soro previamente ao
25 uso neste. O uso de tais proteínas do leite isoladas ou mesmo

purificadas é, contudo também contemplado na presente invenção.

Por causa da imunogenicidade potencial de tais proteínas do leite, conforme discutido acima, é desejável que a endopeptidase clive peptídeos que podem servir como determinantes imunológicos (por exemplo, determinantes antigênicos) que podem estimular, provocar, induzir, ou exacerbar uma resposta imune em um indivíduo. Tais respostas imunes incluem, mas não estão limitadas àquelas primariamente sob controle dos linfócitos T e àquelas mais frequentemente associadas aos linfócitos B do sistema imune. Elas também incluem tais respostas, em que os antibióticos produzidos são de qualquer tipo. O versado na técnica apreciará que entre diversas respostas mensuráveis, anticorpos Ig-E são frequentemente produzidos em resposta a tais proteínas em um indivíduo responsivo.

Para os objetivos da presente invenção uma "redução" da imunogenicidade significa pelo menos uma diminuição matemática na medida da resposta imune, tanto *in vivo* ou *in vitro*. Uma diminuição estatisticamente significativa é preferida, onde tais análises são possíveis e apropriadas. O versado na técnica em análise estatística apreciará que a determinação de uma diferença estatística pode ser realizada usando, por exemplo, o teste t de Student, ou qualquer outra análise apropriada à natureza e projeção da metodologia aplicada aos dados.

Dessa forma, para ajudar a minimizar a imunogenicidade potencial das proteínas do leite, tais como as proteínas do soro, alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina, a endopeptidase cliva preferivelmente um ou mais determinantes imunológicos presentes na proteína, por exemplo, a região entre os aminoácidos 55-98 da beta-lactoglobulina. Tal clivagem resulta no hidrolisato se tornando enriquecido em relação à proteína não hidrolisada em um ou mais de determinados peptídeos. Em uma modalidade, o hidrolisato é enriquecido em ou mais dos peptídeos: AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), e KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4).

Em certas modalidades, o hidrolisato é geralmente enriquecido em peptídeos que terminam em um resíduo de ácido glutâmico ou ácido aspártico, quando comparado à proteína não-hidrolisada. Quando a proteína do leite inclui uma proteína do soro, em uma modalidade o hidrolisato é enriquecido em um ou mais dos peptídeos: ELEE (SEQ ID NO: 5), VATEE (SEQ ID NO: 6), PFTE (SEQ ID NO: 7), NSAEPE (SEQ ID NO: 8), VFGKE (SEQ ID NO: 9), ASQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4), IQPTPE (SEQ ID NO: 10), LKPTPE (SEQ ID NO: 11), LKPTPEGD (SEQ ID NO: 12), LKPTPEGDL (SEQ ID NO: 13), TKIPAVFKID (SEQ ID NO: 14), e TKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 15).

Alternativamente, em uma modalidade em que a proteína do leite inclua uma caseína, o hidrolisato pode ser enriquecido

em um ou mais dos peptídeos: DQAME (SEQ ID NO: 16), GIHAQQKE (SEQ ID NO: 17), VLNE (SEQ ID NO: 18), VFGKE (SEQ ID NO: 19), RLHSMKE (SEQ ID NO: 20), DIQME (SEQ ID NO: 21), KHPIKHQGLPQE (SEQ ID NO: 22), RPKHPIKHQGLPQE (SEQ ID NO: 23), PMIGVNQE (SEQ ID NO: 24), GIHAQQKEPMIEGVNQE (SEQ ID NO: 25), RYLGYLE (SEQ ID NO: 26), LAYFYPE (SEQ ID NO: 27), FVAPFPE (SEQ ID NO: 28), KTTMPLW (SEQ ID NO: 29), LFRQFYQLD (SEQ ID NO: 30), FFVAPFPE (SEQ ID NO: 31), NLLRFFVAPFPE (SEQ ID NO: 32), e ENLLRFFVAPFPE (SEQ ID NO: 33).

10 O versado na técnica observará que na presente invenção não há nada que impeça o uso tanto da caseína e proteínas do soro como uma fonte para o hidrolisato, nos casos que o hidrolisato pode ser enriquecido por quaisquer ou todos os peptídeos precedentes (SEQ ID NO: 1-32), ou quaisquer
15 combinações dos mesmos.

Hidrolisatos contendo proteínas do soro

São também providos aqui hidrolisatos contendo proteínas do soro. Os hidrolisatos de proteínas do soro são enriquecidos em um ou mais dos peptídeos: ELEE (SEQ ID NO: 5), VATEE (SEQ ID NO: 6), PFTE (SEQ ID NO: 7), NSAEPE (SEQ ID NO: 8), VFGKE (SEQ ID NO: 9), ASQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4), IQPTPE (SEQ ID NO: 10), LKPTPE (SEQ ID NO: 11), LKPTPEGD (SEQ ID NO: 12), LKPTPEGDLE (SEQ ID NO: 13),
20 TKIPAVFKID (SEQ ID NO: 14), e TKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 15),
25 e possuem imunogenicidade reduzida em um indivíduo predisposto

a apresentar uma reação imune a uma ou mais das proteínas do soro. Conforme discutido acima, a reação imune pode compreender quaisquer reações de um indivíduo a uma proteína estranha. A medida de tal reação pode compreender quaisquer

5 das técnicas, *in vitro*, *in vivo*, clínicas ou outras, conhecidas do versado na técnica. Como mencionado acima, uma "redução" significa pelo menos uma diminuição matemática. Uma diminuição estatisticamente significativa é preferida, onde tal análise é possível e apropriada. Em uma modalidade, o

10 indivíduo é um humano com alergias às proteínas do soro de leite de vaca. O hidrolisato fornece pelo menos uma diminuição de 50 % na medida da imunogenicidade quando comparada à proteína do soro não-hidrolisada. Em outras modalidades, há cerca de 70 %, 80 %, ou 90 % ou mais de redução na medida da

15 imunogenicidade. Ainda em outras modalidades, há redução da imunogenicidade de cerca de 10 vezes a 100 vezes, uma redução de 100 vezes a 1.000 vezes, uma redução de 1.000 a 10.000 vezes, ou mais ainda. Em uma modalidade, a composição de proteína hidrolisada resulta em imunogenicidade reduzida no

20 indivíduo sensível de modo que quase não haja diferenças detectáveis entre a resposta imunológica à proteína hidrolisada em um indivíduo sensível e a resposta em um que não seja sensível. Preferivelmente, não há diferenças estatísticas nas respostas imunológicas em um indivíduo

25 sensível e um não-sensível durante a exposição a, ou consumo de hidrolisato contendo proteína do soro.

Em certas modalidades, o hidrolisato contendo proteína do soro é enriquecido, em relação a uma amostra de proteína do soro comparável, porém não-tratada, em um ou mais dos peptídeos: AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2),
5 KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), e KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4).

O hidrolisato contendo proteína do soro pode ser produzido através do uso de uma ou mais endopeptidases que clivam preferencialmente na porção carboxi-terminal dos resíduos de ácido glutâmico e/ou ácido aspártico. Em uma modalidade
10 particular, o hidrolisato contendo proteína do soro é produzido através do uso de uma endopeptidase que não use ou exija um íon metálico para sua atividade, e dessa forma não é uma metaloproteinase estrita. O versado na técnica apreciará que o uso de quelantes de metais, tal como EDTA, podem
15 auxiliar na determinação da ausência da necessidade de um metal para qualquer enzima, por exemplo, uma protease ou uma peptidase.

Uso de hidrolisatos de proteína:

Em outro aspecto, são providos aditivos alimentícios, suplementos, e ingredientes compreendendo um hidrolisato
20 contendo proteína do soro ou um hidrolisato de proteína do leite, conforme descrito acima.

Hidrolisatos, preferivelmente hidrolisatos do soro, enriquecidos em um ou mais dos peptídeos: AQSAPLRVYVE (SEQ ID
25 NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), e

KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4) em relação à proteína não-hidrolisada são preferidos para tais usos.

Os aditivos possuem imunogenicidade reduzida em um indivíduo predisposto a apresentar uma reação imune a uma ou
5 mais proteínas do leite ou do soro.

São também providos aqui, produtos alimentícios manufaturados compreendendo hidrolisato de proteína do leite ou do soro conforme descrito neste. Preferivelmente os hidrolisatos são enriquecidos em um ou mais dos peptídeos:
10 AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), e KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4), e possuem imunogenicidade reduzida em um indivíduo predisposto a apresentar uma reação imune a uma ou mais proteínas do leite ou do soro.

15 Em certas modalidades, o produto alimentício manufaturado é uma comida industrializada para bebês, bebida isotônica, produto contendo queijo, suplemento de proteína, suplemento nutricional ou produto que substitui refeições. Em modalidades preferidas, o hidrolisato é um hidrolisato de proteína do soro
20 e o indivíduo apresenta uma reação alérgica a lactoglobulina e/ou lactoalbumina não-hidrolisada.

Será evidente para o versado na técnica que os compostos providos na presente invenção podem também ser usados em conexão com produção de queijo. O uso dos compostos é
25 particularmente adequado para a produção de vários queijos sólidos e em pasta. Os compostos fornecidos aqui podem ser

usados para reduzir a imunogenicidade de tais produtos. O queijo pode ser feito inteiramente com leite que é hidrolisado, como provido aqui, ou previamente a coalhagem, composições de um hidrolisato de proteína do leite ou soro
5 podem ser adicionadas ao leite sendo usado para a produção de queijo. Tais usos irão fornecer produtos de queijo com qualidades superiores em termos de conteúdo nutricional e propriedades funcionais.

De maneira similar, as composições de hidrolisatos de
10 leite e soro fornecidas na presente invenção são úteis para a fabricação de outros produtos laticínios incluindo, mas não limitados a produção de iogurte, queijo cottage, ou creme de leite. O versado na técnica também apreciará que os hidrolisatos são adaptáveis para desidratação por aspersão,
15 concentração, ou outras etapas adicionais de processamento. Hidrolisatos desidratados por aspersão são particularmente adequados para uso em aplicações em que o sólido de soro pode frequentemente ser usado. Também podem ser usados como uma substituição de sólidos lácteos onde é desejável a obtenção de
20 imunogenicidade reduzida.

Em certas modalidades, as composições de hidrolisatos de leite e soro fornecidas aqui são usadas em outros produtos alimentícios que frequentemente contêm um ou mais produtos ou subprodutos lácteos que não são declarados no rótulo, ou que
25 podem não ter um rótulo, tais como, fornecidos ao consumidor. Em alguns casos, mesmo que os ingredientes sejam listados em

um rótulo, os consumidores que não são perfeitamente instruídos em nutrição não compreendem que certos ingredientes listados são de fato ingredientes que contém proteínas do leite ou soro. Tais produtos oferecem um risco real a

5 indivíduos sensíveis, por exemplo, aqueles que podem sofrer reações alérgicas graves, e podem de fato ameaçar a vida destes indivíduos. As composições providas pela presente invenção são prontamente adaptadas para tais usos e podem ser usadas, por exemplo, em bebidas, tais como café, chá ou

10 modificações e derivados dos mesmos, bebidas isotônicas, e similares, bem como pudins, recheios e aperitivos. Muitos outros produtos possuem quantidades pequenas de ingredientes de leite e soro adicionados para prover funcionalidades benéficas conhecidas para processamento ou aceitação do

15 consumidor. Os hidrolisatos descritos aqui podem ser prontamente substituídos pelos ingredientes dos quais eles são derivados. Eles preferivelmente retêm as propriedades funcionais, tais como textura, aroma, gosto, dispersabilidade, solubilidade e similares, dos ingredientes dos quais eles

20 foram derivados. Eles também fornecem sabor melhorado (por exemplo, amargor reduzido) e propriedades preferidas de formação de espuma em relação às alternativas tais como proteínas do soro que são hidrolisadas de forma mais completa com menos enzimas específicas. Em algumas modalidades, as

25 proteínas hidrolisadas apresentam gelificação, retenção de

água e capacidade de ligação com a água melhoradas comparadas às proteínas não-hidrolisadas.

Em outra modalidade as proteínas hidrolisadas do leite e do soro descritas aqui são usadas na fabricação de um produto de aplicação tópica, tal como uma loção, creme, pomada, linimento, solução para limpar a pele ou semelhantes. Consequentemente, tais produtos compreendem as composições de proteínas hidrolisadas descritas nesta são aqui contempladas. Tais produtos são úteis, por exemplo, para finalidades terapêuticas, por exemplo, para prover alívio para pele seca, coceira, desconforto e semelhantes. Estes produtos compreendem preferivelmente, em adição ao componente de proteína hidrolisada um lipídio, cera, óleo, emulsão de água em óleo, emulsão de óleo em água, ou semelhantes como uma base. Tipicamente, eles podem ainda compreender um ou mais compostos de fragrância, bem como outros ingredientes surfactantes ou emulsificantes. São também providos aqui produtos cosméticos e outros acessórios para aparência ou acessórios de beleza compreendendo os hidrolisatos de proteínas do leite e do soro descritos. Em uma modalidade, o produto cosmético é aplicado à face, bochechas, lábios, ou olhos de uma pessoa. Em outra modalidade o produto é usado em qualquer lugar do corpo para ajudar a melhorar a aparência cosmética da pele ou, por exemplo, para diminuir a aparência de sinais de rugas, sardas, cicatrizes, manchas e semelhantes.

Métodos de produção:

Os compostos de leite e soro hidrolisados descritos acima podem ser produzidos pela adição de uma ou mais enzimas proteolíticas a um líquido ou semi-sólido contendo proteína do leite ou proteína do soro.

5 O tratamento enzimático pode ser conduzido pela introdução ou dispersão da protease, ou uma combinação de proteases apropriadas, tais como uma ou mais endoproteases ou endopeptidases em uma composição de leite ou soro, ou em uma composição contendo proteínas do leite e/ou soro como descrito
10 aqui para colocar a enzima em contato com o substrato da proteína. A introdução da enzima na composição da proteína é acompanhada permitindo que ocorra a reação enzimática pela retenção da mistura sob condições então adequadas, por exemplo, para um tempo de retenção apropriado, a uma
15 temperatura apropriada e pH, e na presença de quaisquer cofatores requeridos. O tratamento das composições de proteína do leite ou soro com a(s) enzima(s) descrita(s) acima, pode ser realizado sob condições escolhidas para se adequarem às enzimas selecionadas de acordo com os princípios bem
20 conhecidos na técnica. O versado na técnica compreenderá que quando o produto final desejado for para consumo humano, as condições podem requerer que aquelas práticas de boa fabricação e higiene apropriadas (GMPs) sejam seguidas durante a retenção e tratamento do material contendo proteínas a ser
25 usado. De maneira similar, os produtos cujo objetivo é para uso que não seja consumo, tais como loções ou produtos

cosméticos topicamente aplicados podem possuir exigências regulatórias associadas à sua fabricação.

Apesar do que foi dito acima, o tratamento enzimático pode ser conduzido em qualquer pH adequado, tal como pH de cerca de 2 a 10, pH de 4 a 9 ou pH de 5 a 7. Pode ser preferido usar um pH de cerca de 7 a 8 para algumas das enzimas discutidas aqui. O versado na técnica compreenderá que cada enzima terá um desempenho particular em relação a uma faixa de pH, e que pode nem sempre ser necessário ou mesmo desejável usar uma enzima em um pH onde sua atividade seja a mais alta. De maneira similar, o versado na técnica pode prontamente selecionar uma temperatura adequada, ou temperatura para a etapa de tratamento enzimático. Os fatores que afetam a seleção da temperatura incluem, mas não estão limitados à termoestabilidade da enzima ou enzimas a serem usadas, termoestabilidade das proteínas a serem hidrolisadas e as composições compreendendo as referidas proteínas, bem como mudanças na atividade relativa da enzima com a temperatura.

Opcionalmente, após um tempo adequado para o tratamento enzimático, por exemplo, após certa quantidade de proteólises ter ocorrido, por exemplo, uma quantidade desejada predeterminada de proteólises baseadas em considerações tais como propriedades funcionais e imunogênicas, a enzima pode ser ter sua atividade reduzida ou removida. A enzima pode ser parcialmente ou completamente inativada através de processos conhecidos na técnica para remoção e inativação de enzimas

usadas em processamento de alimentos ou rações. Em uma modalidade, a enzima é termicamente inativada quando a proteólise é suficientemente extensiva para prover as propriedades imunogênicas reduzidas descritas aqui. Em outra
5 modalidade, a extensão da proteólise é monitorada com uma mensuração rápida da mesma, por exemplo, % total de proteína solúvel, viscosidade. A enzima é inativada quando a medida rápida atinge a leitura desejada pré-determinada. Preferivelmente, a atividade da enzima é termicamente
10 inativada, mais preferivelmente a inativação térmica é combinada com uma etapa de processamento tal como um processo requerido de aquecimento, pasteurização ou homogeneização.

Dosagens adequadas de enzimas irão geralmente estar na faixa de cerca de 0,01-1 % (p/p). Em várias modalidades, as
15 proteínas do leite e do soro estarão presentes a, por exemplo, cerca de 1-60 %, 5-50 %, 20-40 %, 10-45 %, ou cerca de 10-15 % de teor de proteína do soro do leite. Dessa forma, a dosagem da enzima deve incluir quantidades tais como, por exemplo, 0,1-10 %, particularmente 0,2 % (p/p), correspondendo a 2.000
20 UI por 100 g de proteína do leite ou soro.

Uma UI (unidade internacional) é definida como a quantidade de enzima que produz um micromol de produto de hidrólise de proteína por minuto sob condições padrão. "Condições padrão" para a finalidade de determinação da UI são
25 o uso de 10-15 % de sólidos de proteína do soro em água, ou leite desnatado, pH 7, temperatura de 40 °C. Em uma

modalidade, a dosagem da enzima é baseada no teor p/p da proteína da composição sendo tratada, como ilustrado nos exemplos.

Alternativamente, a dosagem da enzima pode ser determinada de outras maneiras, tais como pelo uso de outros ensaios descritos aqui. Todos os tais ensaios podem prover indicadores da extensão (ou grau) da hidrólise da proteína e incluem determinações de % de hidrólise, medidas de viscosidade, eletroforese em gel e espectrometria de massa. Em outras palavras, uma quantidade de enzima requerida para produzir o resultado desejado ou pré-determinado em uma dada quantidade de tempo de incubação também pode ser calculada empiricamente, ou baseada em outros dados. Em uma modalidade, uma quantidade de enzima pode ser selecionada para prover uma queda específica na viscosidade; em outra uma quantidade de enzima para produzir certos fragmentos de digestão como determinado por eletroforese em gel ou análise de espectrometria de massa (MS).

Em uma modalidade, a dosagem da enzima pode ser retrocalculada pelo grau de hidrólise de uma amostra de proteína. O "grau de hidrólise" é uma medida do número de ligações peptídicas clivadas por uma enzima proteolítica. Nesse caso, o grau máximo de hidrólise resultaria da clivagem de substancialmente todos os resíduos de glutamato e possivelmente aspartato nas moléculas de proteínas do soro. O grau de hidrólise pode ser determinado por métodos bem

conhecidos na arte, por exemplo, usando um ensaio de TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfônico) como descrito em Adler-Nissen, J. Agric. Food Chem. 27: 1256 (1979).

Outros métodos de determinação da dose da enzima ou
5 ensaios de atividade de enzima, tais como através de substratos detectáveis, tais como substratos colorimétricos ou artificiais. Tem sido usado Suc-AAPEpNA (succinil-Ala-Ala-Pro-Glu-p-nitroanilida). A conversão para concentração de protease EndoGluC ativa pode ser feita pela obtenção de uma medida
10 precisa da razão de atividade específica e conversão das Unidades de atividade por volume de unidade para a quantidade de enzima usando uma curva padrão ou fator de conversão pré-determinado. Por exemplo, para certos experimentos usados aqui, o fator de conversão para L-MPR foi de 0,348 U/mg de
15 enzima, e para S-MPR foi 0,549 U/mg. O versado na técnica compreenderá como determinar a dosagem ou atividade requerida de acordo com o descrito acima.

O tratamento enzimático pode ser conduzido em operações em batelada, por exemplo, em um tanque com agitação. O tratamento
20 pode também ser contínuo, tal como em uma série de reatores tipo tanque agitados. O tratamento pode compreender também o uso de enzimas imobilizadas e várias enzimas modificadas desde que uma especificidade apropriada da hidrólise seja retida pela atividade da enzima imobilizada ou modificada.

25 **Exemplos**

Exemplo 1

Digestão de proteínas do leite com endopeptidase de especificidade limitada:

Enzimas: *Bacillus licheniformis* "Endo-Glu" paptidase ("L-Glu"): A enzima ("L-MPR" ou "Endo-GluC") de *B. licheniformis* foi expressa em *B. subtilis* e purificada de fermentações de 2-14 L, agrupadas e concentradas. A concentração de enzima purificada (>90 % de pureza) foi de 25,1 mg/mL. Esta proteína de 23,6 kDA possui similaridade de sequência com a protease V8 de *Strptomyces griséus* e outras proteases Glu/Asp específicas (por exemplo, com especificidade para Glu-Xaa, ASP-Xaa no sítio de clivagem). É uma endopeptidase de serina que é parcialmente inibida por EDTA, contudo não é uma metaloprotease. Ela exibe um pH ótimo de cerca de 7,5-8. Maior força iônica reduz a atividade. A sequência é conhecida e pode ser encontrada em bases de dados públicas. Por exemplo, é provida na UniProtKB/Swiss-Prot Primary Accession Number P80057, disponível da base da dados do Laboratório Europeu de Biologia Molecular disponível na rede. Veja "Purification, characterization, cloning, and expression of a glutamic acid-specific protease from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580" *J. Biol. Chem.* 267: 23782-23788 (1992).

Peptidase "Endo-Glu" ("S-Glu") de *Bacillus subtilis*: A enzima ("S-MPR" ou Endo-GluC" de *B. subtilis* foi expressa em *B. subtilis* e purificada de fermentações de 2-14 L, agrupadas e concentradas. A concentração de enzima purificada (>85 % de pureza) foi de 3,5 mg/mL. Uma serina protease de 23,9 kDA, uma

proteína possui similaridade de sequência com aquela de Endo-Glu peptidase "L-Glu" de *B. licheniformis*. A S-Glu protease é relativamente estável em uma larga faixa de pH. Não é tão específica quanto a enzima L-Glu de *B. licheniformis*. A

5 sequência é conhecida e pode ser encontrada em bases de dados públicas. Por exemplo, é provida na UniProtKB/Swiss-Prot Primary Accession Number P39790, disponível da base de dados do Laboratório Europeu de Biologia Molecular disponível na rede. Veja "Gene encoding a glu-specific extracellular

10 endopeptidase in *Bacillus subtilis*." *J. Bacteriol.* 172: 1024-1029 (1990)., e "Purification and characterization of a glutamic acid-specific endopeptidase from *Bacillus subtilis* ATCC 6051: application to the recovery of bioactive peptides from fusion proteins by sequence-specific digestion." *Appl. Microbiol. Biotech.* 48: 27-33 (1997).

15

Métodos

Para avaliar o curso do tempo da digestão proteolítica, 12 % de proteína de soro (13,3 gramas de soro em pó (Lacprodan DI-9224 (Arla Foods)) em 100 ml de água) foi dissolvida em

20 água de grau reagente. Cada quinze (15) gramas desta solução foi colocado em cada um dos quatro tubos de 50 mL e incubados em uma incubadora *shaker* até alcançar 40 °C (por exemplo, por 15 minutos). A enzima purificada como descrita acima foi adicionada em cada um dos três tubos de 50 mL. Foram usados

25 500 µL de S-MPR a uma concentração de 1,5 mg/mL, ou de L-MPR endoprotease a uma concentração de 4,2 mg/mL. A atividade foi

medida usando Succ-AAPEpNA como substrato. As enzimas apresentaram homogeneidade maior que 98 % por SDS-PAGE. O quarto tudo foi um tudo controle que não recebeu adição de enzima. Os tubos foram incubados a 40 °C, 175 rpm em um
5 agitador orbital para o tempo indicado. Os tubos foram removidos no final do seu período de incubação (2, 4, e 20 horas, respectivamente) e centrifugados a 3600 rpm (cerca de 2800 G) por dez minutos para separar o precipitado do líquido sobrenadante.

10 O líquido sobrenadante foi testado para medidas de proteína total (TP) solúvel remanescente no sobrenadante (g/L), % de sólido seco e viscosidade. Os sobrenadantes foram também analisados eletroforéticamente usando SDS-PAGE, para monitorar a hidrólise. Foram realizadas análises de
15 espectrometria de massa (MS) para confirmar a presença de produtos individuais de clivagem proteolítica.

Análise de espectrometria de massa:

Preparação da amostra: Amostras de proteína hidrolisada foram preparadas conforme descrito. Amostras de
20 aproximadamente cerca de 20 µL de cada proteína digerida foram analisadas por cromatografia líquida de alto desempenho acoplada ao sistema de espectrometria de massa LCQ Ion Trap (LC/MS).

Análise LC-MS/MS: Todos os dados de MS e MS/MS foram
25 obtidos usando o sistema *Surveyor HPLC* acoplado ao *LCQ Advantage Ion Trap MS* (ThermoFinnigan, San Jose, CA). Uma

coluna de fase reversa C18 Vydac (2,1 x 150 mm) foi usada para todas as amostras proteolíticas digeridas usando o gradiente de CLAE (do inglês, HPLC) de 0 % a 70 % de Solvente B por 65 minutos com taxa de fluxo de 200 µL/min. Solvente A: 0,1 % TFA em água e Solvente B: 0,08% TFA em acetonitrila. O processamento dos dados foi realizado usando os programas *TurboSEQUENT* e *Xcalibur* (ThermoFinnigan).

Os resultados da análise MS foram então usados com o programa *Mascot*, o qual permite utilizar fragmentos de peptídeos digeridos como dados únicos a partir dos quais a proteína original e sua sequência primária podem ser identificadas usando bases de dados públicas tais como a mantida pelo *National Center for the Biotechnology Information*. Mais informações sobre o *Mascot*, e seu precursor, *Mowse*, podem ser encontradas na internet, por exemplo, no sítio (www.matrixscience.com.br) mantido pela Matrix Science Inc., (Boston, MA).

Resultados:

A endopeptidase S-Glu a uma concentração final de enzima proteína de 0,188 % a uma concentração de proteína de substrato do soro de 12 % resultou em uma redução de 5,5 % em proteína total em duas horas. Nas próximas 4 a 20 horas, a TP reduziu ainda, a uma redução máxima de 20 %.

A coalhada precipitada apresentou um volume de retenção de água (isto é, a medida de retenção de água da coalhada) de cerca do mesmo peso de água a coalhar.

A viscosidade do sobrenadante melhorou de 3,05 cP a 5,99 cP após 20 horas de incubação com a enzima S-Glu.

Resultados similares foram observados com a enzima L-Glu na mesma concentração final mencionada acima. Em 2 horas, foi observada uma redução de 6,9 % de TP, melhorando para 10 % na marcação de tempo de 4 horas. A redução atingiu 14 % no final das 20 horas de incubação.

A coalhada precipitada apresentou um volume de retenção de água de cerca de 70 % de peso do peso da proteína.

10 A viscosidade do sobrenadante permaneceu praticamente a mesma durante o período de incubação de 20 horas com endopeptidase L-Glu.

Os resultados do período de tempo como revelados por SDS-PAGE são mostrados na Figura 1 para ambos os tratamentos com 15 as enzimas S-Glu e L-Glu. Os resultados da análise de espectrometria de massa dos produtos de 20 horas de digestão da amostra de soro são mostrados na Figura 2 para L-Glu, e Figura 3 para S-Glu.

As amostras de hidrolisatos de endopeptidases de proteínas 20 do soro foram enriquecidas em peptídeos específicos. A identidade e quantidades relativas dos quais foram verificadas com LC-MS/MS detalhado acima. As Tabelas 1 (a) e (b) e 2 (a) e (b) abaixo mostram os dados obtidos da análise Mascot dos dados dos peptídeos para as amostras de soro digeridas com L- 25 Glu e S-Glu, respectivamente, em 20 horas de digestão.

Tabela 1 (a), (b): Análise *Mascot* dos dados de MS para amostra de proteína do soro digerida com L-Glu por 20 horas.

(a): Beta lactoglobulina

```
>gi|125910|sp|P02754|LACB_BOVIN BETA-LACTOGLOBULIN PRECURSOR (BETA-LG)|gi|1070647|pir||LCB0 beta-lactoglobulin precursor - bovine|gi|669061 (248305) beta-lactoglobulin variant B precursor [Bos taurus] (MASS=19883)
MRCLLLALAL TCCAQALIVT QTHKGLDIQK VAGTWYSLAM AASDISLLDA QSAPLRVYVE ELKPTPEGDL EILLQKWENC ECAQKKIIAE KTKIPRVFKI
DALNENKVLV LDTDYKKYLL FCHENSAREPE QSLACQCLVR TPEVDDALE KFDKALKALP MHIRLSFNPT QLEEQCHI
>monoisotopic mass = 19852
```

position	sequence (NCBI BLAST link)
125- 130	<u>NSAREPK</u>
???	<u>IQPTPE</u>
62- 71	<u>ELKPTPEGDL</u>
72- 78	<u>EILLQKWE</u>
91- 101	<u>KTKIPAVFKID</u>
91- 105	<u>KTKIPAVFKIDALNE</u>

Protein Coverage: 38/178 = 21.3% by amino acid count, 4285/19852 = 21.6% by mass

5 (b) Kappa Caseína

```
>gi|2119400|pir||I45875 kappa-casein precursor - bovine|gi|162811 (M36641) kappa-casein precursor [Bos taurus] (MASS=21225)
HMKSPFLVVT ILALTLPFLC AQHQNQEQPI RCEKDERFFS DKIAKYIPIQ YVLSRYPYSY LNYYQKQKPA LINNQFLPPY YYAKPAAVRS PAQILQWQVL
SNTVPAKSCQ AQPTTHARHP HPHLSFMRIQ PKKNQDKTEI PTINTIASGE PTSTPTIHAV ESTVATLEAS PREVTESPPPI NTVQVTSTAV
>monoisotopic mass = 21193
```

position	sequence (NCBI BLAST link)
127- 139	<u>MAIDPPKKNQDKTE</u>
162- 168	<u>STVATLE</u>
180- 190	<u>INTVQVTSTAV</u>
140- 158	<u>PTINTIASGEPTSTPTIE</u>

Protein Coverage: 50/190 = 26.3% by amino acid count, 5218/21193 = 24.6% by mass

Tabela 2 (a), (b): Análise *Mascot* dos dados de MS para amostra de proteína do soro digerida com S-Glu por 20 horas.

(a): Beta Caseína

```
>gi|2136722|pir||I46963 beta-casein A3 - bovine|gi|459292|bbs|140624 (367277) beta-casein A3 (cattle, mammary gland, Peptide, 224 aa) [Bos taurus] (MASS=25098)
MKVLIACLV ALALARELEN LNVPGRIVES LSSERSITR INKMKERFQS INQQTDEEL QDKINFRQI QSLVTPFPQIP IPNSLPQNIPL PLTQTPVVVP PFLQPEVHGV SKVKEMQPK
QKHNPPPKYP VEPFTESQSL TLTDVENLML PLPLQSWNH OPHQPLPPTV HFPQSVLSL SQSKVLPPVP KAVPTPQDRI PIQAFLLYQK FVLGPVRCPP PIIIV
>monoisotopic mass = 25064
```

position	sequence (NCBI BLAST link)
116- 120	<u>AMAPK</u>
37- 46	<u>SITRIKMKIE</u>
137- 146	<u>SQSLTLTDEE</u>
58- 72	<u>DELQPKIHPPAQIQS</u>
58- 71	<u>DELQPKIHPPAQIQ</u>
21- 29	<u>LNVPGRIVA</u>
147- 156	<u>ELHLLPLRLQ</u>

Protein Coverage: 59/224 = 26.3% by amino acid count, 6581/25064 = 26.3% by mass

(b): Beta Lactoglobulina

>gi125910|sp|P02754|LACB_BOVIN BETA-LACTOGLOBULIN PRECURSOR (BETA-LG)Dgi11070647|pir|1LGB0 beta-lactoglobulin precursor - bovineDgi1669061 (248305) beta-lactoglobulin variant B precursor [Bos taurus] (MASS=19883)
 MKCLLLALAL TCGAQLIVT QTHKGLDIOK VACTWYSLAM AASDISLDR QSRPLRVYVE ELKPTPECDL ELLQKVENG ECAQKHIAE KTKIPAVFKI DALNENKVLV LDYDYKTYLL
 YCHENSREPE QSLACQCLVR TPXVDDEALE KFDKALKALP MHRLSPNPT QLEIQCHI
 >monoisotopic mass = 19852

position	sequence (NCBI BLAST link)
125- 130	NSAEPK
777	IQPIPK
50- 60	AGSAPLEVYVE
72- 78	ILLQKVE
91- 105	KTKIPAVFKIDALNK
92- 105	KTKIPAVFKIDALNK

Protein Coverage: 39/178 = 21.9% by amino acid count, 4419/19852 = 22.3% by mass

Exemplo 2Digestão de proteínas do leite usando a endopeptidases, S-5 Glu e L-Glu.

Métodos: Dez (10) gramas de leite desnatado (duas fontes, Berkeley Farms e Sunnyside) foram colocadas em cada um dos oito tubos de 15 mL. Os tubos foram aquecidos a 40 °C por 15 minutos em uma incubadora *shaker*. A enzima (S-Glu ou L-Glu) foi adicionada (500 µL de uma solução estoque de 3,8 mg/mL) em cada um dos três tubos para cada enzima. Um tubo serviu como controle para cada fonte de leite desnatado e não recebeu qualquer adição de enzima. A incubação continuou para o tempo indicado sob as condições anteriores. Um tubo para cada tratamento com enzima foi removido a 2, 4, 20 horas. Os tubos foram então centrifugados para separar o precipitado e o sobrenadante. Os sobrenadantes foram testados para medidas de proteína total (TP) solúvel remanescente no sobrenadante (g/L), % de sólido seco e viscosidade. Foi usada análise SDS-PAGE para monitorar a clivagem da endopeptidase. Foi feita análise por espectrometria de massa conforme detalhado acima para confirmar a identidade dos produtos de clivagem gerados.

A análise *Mascot* usando os peptídeos gerados foi também realizada usando os dados coletados de espectrometria de massa.

Resultados: Duas amostras de leite desnatado tratado com S-Glu a uma concentração final de 0,19 mg/g de leite desnatado produziram uma coalhada grossa em duas horas de tratamento. Cerca de 43 % - 57 % de proteína total do leite desnatado foi precipitado em duas horas de tratamento enzimático. A precipitação foi quase completa, já que não foi observada nenhuma redução adicional significativa de proteína total no sobrenadante a 4 ou 20 horas para ambas as duas fontes de leite desnatado.

Em contraste com a S-Glu, as amostras tratadas com L-Glu mostraram precipitação melhorada da proteína do leite desnatado ao longo do tempo. Para a amostra I de leite desnatado, o tratamento com L-Glu endopeptidase provocou uma redução de 32 % na concentração de proteína a t= 2h, 42 % a 4h, e 62 % a 20 horas. Na amostra II de leite desnatado tratado com L-Glu a concentração TP foi reduzida em 11,5 % a t= 2h, 41 % a 4h e 51,7 % a 20 horas.

Como pode ser visto dos resultados SDS-PAGE (Figuras 3 e 4, leite desnatado I e II, respectivamente) ambas as endopeptidases L-Glu e S-Glu foram capazes de provocar a precipitação da caseína em 2 horas a partir do leite desnatado e apresentaram hidrólise significativa de caseína, bem como lactoglobulina e lactoalbumina.

As amostras de leite desnatado hidrolisado por endopeptidase foram enriquecidas em peptídeos específicos. A identidade e quantidades relativas dos quais foram verificadas usando LC-MS/MS detalhado acima. As Tabelas 3 (a), (b) e (c) abaixo mostram os dados obtidos da análise *Mascot* dos dados dos peptídeos para a amostra I de leite desnatado digerida com L-Glu após 20 horas de digestão.

Tabela 3 (a), (b) e (c): Análise *Mascot* dos dados de MS para amostra I de leite desnatado digerida com L-Glu por 20 horas.

(a): Alfa caseína

```
>gi|115646|sp|P02662|CASI_BOVIN ALPHA-S1 CASEIN PRECURSOR (MASS=24529)
MKLLILTCIV AVALARPRHP IRHQCLPQEV LNNLLRFFV APPEVVEGKE KVNLSKDIG SESTEDQAME DIKQMEAKSI SSSEIIVPNS VEQKCIQKED VPSERYLGVL EQLRLKCKK
VPQLEIVPNS AERLHSMKE GIHAQQKEPH IGVNQLRYF YPELFRQFYQ LDAYPSGAWY YVPLGTQYTD APSFSDIPNP ICSENSEKTT MPLW
>monoisotopic mass = 24495
```

```
position  sequence (NCBI BLAST link)
-----
66- 70  DQAHK
94- 99  KHIQKE
93- 99  QSHIQKE
141- 148 GIHAQQKE
30- 33  VLEK
46- 50  VFGKE
134- 140 RLHSMKE
71- 76  DIKQKE
121- 125 VPQLK
149- 156 PHIGVNQK
141- 156 GIHAQQKEPHIGVNQK
40- 45  VAPFPE
116- 125 LKKYKVPQLK
105- 111 EYLCYLE
88- 91  ENSV
157- 163 LAYFYPE
39- 45  IVAPFPE
208- 214 KTIMPLW
164- 172 LFRQFYQLD
38- 45  FFVAPFPE
34- 39  NLLRFF
34- 45  NLLRFFVAPFPE
33- 45  NLLRFFVAPFPE
```

Protein Coverage: 106/214 = 49.5% by amino acid count, 12767/24495 = 52.1% by mass

(b) Beta caseína

```
>gi|2136722|pir||I46963 beta-casein A3 - bovineOgi|459292|bb|140624 (867277) beta-casein A3 [cattle, mammary gland, Peptide, 224 aa] (Bos
taurus) (MASS=25098)
MKVLILACLIV ALALARRLEN LNVDPCHIVIS LSSSEISITR INMKCKEKQS EEQQQTEDIL QDKTHPFAQT QSLVYFFPCP IPNSLPQNIIP PLTQTPVVUV PFLQPEVMGV SKVKEAMAPK
QKKNPFPPKYP VEPFTKSQL TLTDVENLHL PLPLQSWTH QPHQPLPPTV HFFPQSVLSL SQSKVLVPVQ KAVPYPPQDM PIQAPLLYQK PVLGPVRCPF PIIV
>monoisotopic mass = 25064
```

```
position sequence (NCBI BLAST link)
-----
47- 52 KYQRRK
133- 136 PTIR
107- 115 VMGVSKVKK
21- 26 LNVPCN
37- 46 SITRINKKLL
20- 26 LNVPCN
60- 72 LQDKIHPPAQTQS
63- 73 KIHPPAQTQSL
60- 73 LQDKIHPPAQTQSL
124- 132 HPPPKYPPV
123- 132 HPPPKYPPV
126- 136 PPKYPPVRPTK
124- 136 HPPPKYPPVRPTK
123- 136 HPPPKYPPVRPTK
```

Protein Coverage: 60/224 = 26.8% by amino acid count, 6925/25064 = 27.6% by mass

Tabela 3(c): Beta lactoglobulina

```
>gi|125910|sp|P02754|LACB_BOVIN BETA-LACTOGLOBULIN PRECURSOR (BETA-LG)Ogi|1070647|pir||LCB0 beta-lactoglobulin precursor - bovineOgi|669061
(248305) beta-lactoglobulin variant B precursor (Bos taurus) (MASS=19883)
MKCLLLALAL TCGAALIVT QTRKCLDIQK VACTVYSLAM AASDISLLDA QSAPIRVYVE ELKPTPECDL KILLQKWENG ECAQKKIAR NTAIPAVFVKI DALNENKVLV LDTDYTKYLL
YCHENSARPE QSLACQCLVR TPFVDDALH KFDKALKALP MGRLSFNPT QLSIQCHI
>monoisotopic mass = 19852
```

```
position sequence (NCBI BLAST link)
-----
125- 130 NSALPK
72- 78 LLLQKKE
151- 164 KFDKALKALPMMHR
165- 173 LSFNPTQL
91- 105 KTKLPAVFKIDALNE
161- 173 MGRLSFNPTQL
159- 173 LPMHRLSFNPTQL
158- 173 ALPMHRLSFNPTQL
```

Protein Coverage: 51/178 = 28.7% by amino acid count, 5884/19852 = 29.6% by mass

5 De maneira similar, os dados obtidos pela análise Mascot dos dados do peptídeo para a amostra II de leite desnatado digerida por 20 horas são mostrados abaixo nas Tabelas 4(a) para S-Glu, e 4(b) e (c) para L-Glu, respectivamente.

Tabela 4 (a), (b) e (c): Análise Mascot dos dados de MS para
10 amostra II de leite desnatado digerida com endopeptidase por
20 horas.

(a): Digestão com S-Glu. Alfa caseína

```
>gi|115646|sp|P02662|CAS1_BOVIN ALPHA-S1 CASEIN PRECURSOR (MASS=24529)
MKLLILITCLV AVALARPKQD LKHQCLPQEV LNENLLEFV APEPEVFCGE KVNELSKDIE SESTEDQAME DILQMERKSI SSSSEIVPNS VEQAKIOMED VPSERYLCTL EQLLRALKCYK
VPLQIIVPNS AERLNSMKE GIKAQKEFM IGVNQLRYF YPELFRQFYQ LDAYPSGAWY YVPLGTOTD APSFSIDPWP IGSSENSKTT NPLW
>monoisotopic mass = 24495
```

```
position sequence (NCBI BLAST link)
-----
```

```
66- 70 DDAMR
66- 71 DDAMED
65- 71 DDAMED
30- 33 VLR
135- 140 LHSMKE
77- 90 ASISSSSRIVPNS
46- 50 VFGKA
71- 76 DIRQMR
93- 104 QKHIOKEDVPSR
92- 104 QKHIOKEDVPSR
46- 54 VFGKRVNR
18- 29 KHPKSHQCLPQI
141- 156 GIHAQKEPMIGVNR
66- 76 DDAMEDIKQMR
158- 163 AYFYPR
106- 111 YLGYLE
157- 163 LAYFYPR
39- 45 FVAPPR
209- 214 TIRPLW
38- 45 FFVAPPR
35- 45 LLRFVAPPR
34- 45 NLLRFVAPPR
33- 45 NNLLRFVAPPR
```

Protein Coverage: 117/214 = 54.7% by amino acid count, 13570/24495 = 55.4% by mass

Tabela 4(b): Digestão com L-Glu. Beta Caseína

```
>gi|2136722|pir|I14663|beta-casein A3 - bovineOgi|459292|bbs|140624 (567277) beta-casein A3 [cattle, mammary gland, Peptide, 224 aa] [Bos
taurus] (MASS=25098)
MKVLILACLIV ALALARELNE LNVDCRIVES LSSSESITR INKIEKFGS REQQQTDEL QDKINDPFRQT QSLVYPPPCP IPNSLPQNIPL PLTQTPTVVV DPLQPEVHCV SKVKEAMAPK
QKRPMPFKYP VERPFESQSL TLYDVNMLL PLPLQSWH QPHQPLPTV HFPQSVLSL SQSKVLVPVQ KAVFPQQRDH PIQAVLLYQ PVLCFVRCPP PIIV
>monoisotopic mass = 25064
```

```
position sequence (NCBI BLAST link)
-----
```

```
17- 20 ELER
37- 46 SITIRMKKIE
37- 47 SITIRMKKIEK
58- 71 DELODKIHPPAQIQ
139- 146 SLTLTDVR
21- 29 LHYVCEIVR
58- 67 DELODKIHPP
123- 136 EMPPFKYPVPEPR
147- 156 NHLPLPLDQ
```

Protein Coverage: 70/224 = 31.3% by amino acid count, 8101/25064 = 32.3% by mass

5 Tabela 4(c): Digestão com L-Glu.

```
>gi|115654|sp|P02663|CAS2_BOVIN ALPHA-S2 CASEIN PRECURSOROgi|476486|pir|KAB0S2 alpha-s2-casein precursor - bovineOgi|162929 (H16644) alpha-
s2-like casein precursor [Bos taurus] (MASS=26019)
MKVFIPTCLL AVALAKNTM HVSSSESII SQETVQKKN HAINPSKENL CSTYCKEVR NANNEYISIC SSSSESARVA TEVKITVDD KHYQKALNEI HQFYQKPPQY LQYLYQCPV
LNPWDQKRN RVPITPTLNE EQLSTSEENS KCTVDHSTE VETKTKLIE EEKNRLNPLK KISQRYOKFA LPQYLKTUTY HOKAMKPWQ PKTKVIPYVR YL
>monoisotopic mass = 25984
```

```
position sequence (NCBI BLAST link)
-----
```

```
34- 38 TYKQI
79- 83 VATIE
58- 65 VVRNANER
161- 171 VPTKTKLIER
161- 172 VPTKTKLIER
84- 99 VKITVDDKHYQKALNE
130- 141 NAVPIPTPLNDR
```

Protein Coverage: 58/222 = 26.1% by amino acid count, 6711/25984 = 25.8% by mass

Exemplo 3Digestão de caseína com atividade de endopeptidase

Métodos: Dez (10) gramas de caseína em pó (Sigma, # de catálogo C-5890) foram misturados em 50 mL de tampão fosfato 1 M, pH 6,5 e 200 mL de água aquecida. O conteúdo foi aquecido até que a caseína fosse dissolvida no tampão. A solução de caseína foi mantida naquela temperatura por cinco minutos. A solução de caseína foi então resfriada para temperatura ambiente, e ajustada para um volume final de 500 mL. Dez (10) mL desta solução de caseína foram colocados em cada um dos oito tubos de 15 mL e aquecidos até 40 °C por 15 minutos em uma incubadora *shaker*. Cada um dos três recebeu endopeptidase S-Glu ou L-Glu (500 µL de uma solução estoque de 3,8 mg/mL. Um tubo de cada serviu como controle sem adição de enzima. Os tubos de amostra foram removidos a 2, 4, 20 horas, resfriados e centrifugados para separar o precipitado e o sobrenadante. Os sobrenadantes foram testados para medidas de proteína total (TP) solúvel remanescente no sobrenadante (g/L), % de sólido seco e viscosidade. Os sobrenadantes foram também analisados por eletroforese usando SDS-PAGE para monitorar a hidrólise. Foi feita análise por espectrometria de massa (MS) para confirmar a presença de produtos de clivagem proteolítica individuais. Os resultados da análise MS foram então usados com o programa *Mascot*, que permite utilizar fragmentos de peptídeos digeridos como dados únicos a partir dos quais a proteína original e sua sequência primária podem ser identificadas usando bases de dados públicas tais como a mantida pelo *National Center for the Biotechnology*

Information. Mais informações sobre o *Mascot*, e seu precursor, *Mowse*, podem ser encontradas na internet, por exemplo, no sítio (www.matrixscience.com.br) mantido pela Matrix Science Inc., (Boston, MA).

5 **Resultados:** A solução tamponada de caseína (16,85 g/L) tratada com endopeptidase na concentração de 0,19 mg de enzima por grama de solução de caseína, precipitou 58 % da caseína em 2 horas usando S-Glu. Parte da caseína precipitada foi re-dissolvida, no entanto, devido a hidrólise adicional ao longo
10 do tempo. As concentrações de proteína precipitada foram então 53 % e 49 % a 4 e 20 horas respectivamente. O tratamento com L-Glu gerou um aumento na caseína precipitada ao longo do tempo testado. Em 2 horas, 32,5 % da proteína total (TP) foi removida da solução de caseína. Isso aumentou para 34 % em 4
15 horas; em 20 horas, a proteína total removida foi de 54,2 %. A Figura 6 mostra os resultados da análise por SDS-PAGE dos fragmentos digeridos de caseína.

Os resultados da análise *Mascot* dos fragmentos digeridos de caseína são mostrados abaixo, nas Tabelas 5 e 6, para
20 resultados das digestões após 20 horas com as enzimas L-Glu e S-Glu, respectivamente.

Tabela 5: Digestão com L-Glu endopeptidase, 20 horas. Alfa caseína

```
>gi|115646|sp|P02662|CAS1_BOVIN ALPHA-S1 CASEIN PRECURSOR [MASS=24529]
MKLLILYCLV AVALARPKMP IYHQGLPQEV LNEENLLREFV APEPEVFGKE KVNELSKDIG SESTEEDQAME DIKQMEARSI SSSHEIVPNS VEQKHQKED VPSENYLCTL EQLLRLLKYYK
VPQLIIVPNS AERRLNSMKE GINHAQKKEPM IGVNQLAYE YPELFRQFYQ LDAYPSGAWY YVPLCTQYTD APSFSDIPNP ICSENSEKTT MPLW
>monoisotopic mass = 24495

position  sequence (NCBI BLAST link)
-----
66- 70  DQAME
141- 148 GINHAQKE
30- 33  VLNE
46- 50  VEGKE
134- 140 RLHSMKE
71- 76  EIKQME
18- 29  KHPYHQGLPQR
16- 29  RPKHPIKHQGLPQR
149- 156 PHIGVNQR
141- 156 GINHAQKEPHIGVNQR
105- 111 YLCYLE
157- 163 LAYFYPE
39- 45  FVAPFPE
208- 214 TIHPLW
164- 172 LEFQFYQLD
38- 45  FFVAPFPE
34- 45  NLLRFFVAPFPE
33- 45  ENLLRFFVAPFPE

Protein Coverage: 99/214 = 46.3% by amino acid count, 11898/24495 = 48.6% by mass
```

Tabela 6: Digestão com S-Glu endopeptidase, 20 horas. Alfa caseína

```
>gi|115646|sp|P02662|CAS1_BOVIN ALPHA-S1 CASEIN PRECURSOR [MASS=24529]
MKLLILYCLV AVALARPKMP IYHQGLPQEV LNEENLLREFV APEPEVFGKE KVNELSKDIG SESTEEDQAME DIKQMEARSI SSSHEIVPNS VEQKHQKED VPSENYLCTL EQLLRLLKYYK
VPQLIIVPNS AERRLNSMKE GINHAQKKEPM IGVNQLAYE YPELFRQFYQ LDAYPSGAWY YVPLCTQYTD APSFSDIPNP ICSENSEKTT MPLW
>monoisotopic mass = 24495

position  sequence (NCBI BLAST link)
-----
66- 70  DQAME
66- 71  DQAMED
30- 33  VLNE
126- 133 IYVNSARE
46- 50  VEGKE
71- 76  EIKQME
133- 140 KRLHSMKE
46- 54  VEGKERVNE
18- 29  KHPYHQGLPQR
141- 156 GINHAQKEPHIGVNQR
66- 76  DQAMEDIKQME
158- 163 AYFYPE
134- 163 RLHSMKEGINHAQKEPHIGVNQLAYFYPE
106- 111 YLCYLE
106- 112 YLCYLEQ
157- 163 LAYFYPE
39- 45  FVAPFPE
209- 214 TIHPLW
38- 45  FFVAPFPE
35- 45  LLRFFVAPFPE
34- 45  NLLRFFVAPFPE
33- 45  ENLLRFFVAPFPE
28- 56  QIVLNNLLRFFVADPPEVFGKEKVNLS
```

Diversas publicações, incluindo patentes, pedidos publicados, artigos técnicos e artigos acadêmicos são citados ao longo da descrição. Cada uma destas publicações citadas está incorporada aqui por referência, em sua totalidade para todas as finalidades.

REIVINDICAÇÕES

1. Hidrolisato compreendendo pelo menos uma proteína do leite hidrolisada com pelo menos uma enzima proteolítica que cliva preferencialmente um resíduo de ácido glutâmico ou ácido aspártico e que cliva um ou mais determinantes imunológicos presentes na proteína, caracterizado pelo fato de o hidrolisato compreender pelo menos uma beta lactoglobulina hidrolisada na região entre os aminoácidos 55-98, o hidrolisato possuindo imunogenicidade reduzida em um indivíduo predisposto a apresentar uma reação imune à proteína.

2. Hidrolisato de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado pelo fato de pelo menos uma enzima proteolítica ser uma endopeptidase.

3. Hidrolisato de acordo com a Reivindicação 2, caracterizado pelo fato de a endopeptidase clivar preferencialmente a porção carboxi-terminal de um resíduo de ácido glutâmico ou resíduo de ácido aspártico.

4. Hidrolisato de acordo com a Reivindicação 3, caracterizado pelo fato de a endopeptidase ser UniProtKB/Swiss-Prot Primary Accession Number P39790

5. Hidrolisato de acordo com a Reivindicação 3, caracterizado pelo fato de a endopeptidase ser UniProtKB/Swiss-Prot Primary Accession Number P80057.

6. Hidrolisato compreendendo pelo menos uma proteína do leite hidrolisada com pelo menos uma enzima proteolítica que cliva preferencialmente um resíduo de ácido glutâmico ou ácido

aspártico, caracterizado pelo fato de a enzima proteolítica ser a endopeptidase UniProtKB/Swiss-Prot Primary Accession Number P39790, o hidrolisato possuindo imunogenicidade reduzida em um indivíduo predisposto a apresentar uma reação imune à proteína..

7. Hidrolisato de acordo com quaisquer das Reivindicações 4 a 6, caracterizado pelo fato de a endopeptidase ser inibida por fenilmetilsulfonilfluoreto ou diisopropilfluorofosfato.

8. Hidrolisato de acordo com quaisquer das Reivindicações 4 a 6, caracterizado pelo fato de a endopeptidase não requerer um íon metálico para sua atividade.

9. Hidrolisato de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a proteína incluir pelo menos uma lactoalbumina, preferivelmente uma alfa lactoalbumina.

10. Hidrolisato de acordo com a Reivindicação 6, caracterizado pelo fato de a proteína ser pelo menos uma lactoalbumina ou uma lactoglobulina, preferivelmente uma alfa lactoalbumina ou uma beta lactoglobulina.

11. Hidrolisato de acordo com a Reivindicação 1 ou Reivindicação 6, caracterizado pelo fato de o hidrolisato ser enriquecido em um ou mais dos peptídeos AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), ou KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4).

12. Hidrolisato de acordo com a Reivindicação 9, caracterizado pelo fato de ser enriquecido em um ou mais dos peptídeos ELEE (SEQ ID NO: 5), VATEE (SEQ ID NO: 6), PFTE (SEQ

ID NO: 7), NSAEPE (SEQ ID NO: 8), VFGKE (SEQ ID NO: 9),
 ASQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2),
 KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4),
 IQPTPE (SEQ ID NO: 10), LKPTPE (SEQ ID NO: 11), LKPTPEGD (SEQ
 5 ID NO: 12), LKPTPEGDL (SEQ ID NO: 13), TKIPAVFKID (SEQ ID NO:
 14), ou TKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 15).

13. Hidrolisato de acordo com a Reivindicação 1,
caracterizado pelo fato de ser enriquecido em um ou mais dos
 peptídeos DQAME (SEQ ID NO: 16), GIHAQQKE (SEQ ID NO: 17),
 10 VLNE (SEQ ID NO: 18), VFGKE (SEQ ID NO: 19), RLHSMKE (SEQ ID
 NO: 20), DIQME (SEQ ID NO: 21), KHPIKHQGLPQE (SEQ ID NO: 22),
 RPKHPIKHQGLPQE (SEQ ID NO: 23), PMIGVNQE (SEQ ID NO: 24),
 GIHAQQKEPMEGVNQE (SEQ ID NO: 25), RYLGYLE (SEQ ID NO: 26),
 LAYFYPE (SEQ ID NO: 27), FVAPFPE (SEQ ID NO: 28), KTTMPLW (SEQ
 15 ID NO: 29), LFRQFYQLD (SEQ ID NO: 30), FVAPFPE (SEQ ID NO:
 31), NLLRFFVAPFPE (SEQ ID NO: 32), ou ENLLRFFVAPFPE (SEQ ID
 NO: 33).

14. Hidrolisato contendo proteína do soro caracterizado
pelo fato de ser enriquecido em um ou mais dos peptídeos
 20 AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2),
 KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), ou KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4).

15. Ingrediente alimentício caracterizado pelo fato de
 compreender um hidrolisato de proteína do soro enriquecido em
 um ou mais dos peptídeos AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE
 25 (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), ou KTKIPAVFKIDALNE
 (SEQ ID NO: 4), possuindo imunogenicidade reduzida em um

indivíduo predisposto a apresentar uma reação imune a uma ou mais proteínas do soro.

16. Produto alimentício fabricado caracterizado pelo fato de compreender um hidrolisato de proteína do soro enriquecido em um ou mais dos peptídeos AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), ou KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4), possuindo imunogenicidade reduzida em um indivíduo predisposto a apresentar uma reação imune a uma ou mais proteínas do soro.

17. Produto alimentício fabricado de acordo com a Reivindicação 16, caracterizado pelo fato de ser comida industrializada para bebês, bebida isotônica, produto contendo queijo, suplemento de proteína, suplemento nutricional ou produto que substitui refeições.

18. Produto não-alimentício compreendendo o hidrolisato de acordo com a Reivindicação 1 ou Reivindicação 6, caracterizado pelo fato de o produto não-alimentício ser um cosmético, uma loção ou uma solução para limpar a pele para uso em pele humana.

19. Produto não-alimentício compreendendo um hidrolisato que caracterizado pelo fato de compreender pelo menos uma proteína do leite hidrolisada com pelo menos uma enzima proteolítica que cliva preferencialmente um resíduo de ácido glutâmico ou ácido aspártico, o hidrolisato possuindo imunogenicidade reduzida em um indivíduo predisposto a apresentar uma reação imune à proteína.

20. Produto não-alimentício de acordo com a Reivindicação 18 ou Reivindicação 19, caracterizado pelo fato de compreender o hidrolisato de proteína do soro enriquecido em um ou mais dos peptídeos AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), ou KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4), possuindo imunogenicidade reduzida em um indivíduo predisposto a apresentar uma reação imune a uma ou mais proteínas do soro.

21. Composição compreendendo pelo menos dois hidrolisatos de acordo com a Reivindicação 1 ou Reivindicação 6, caracterizada pelo fato de cada hidrolisato ser produzido com pelo menos uma enzima diferente possuindo uma especificidade diferente.

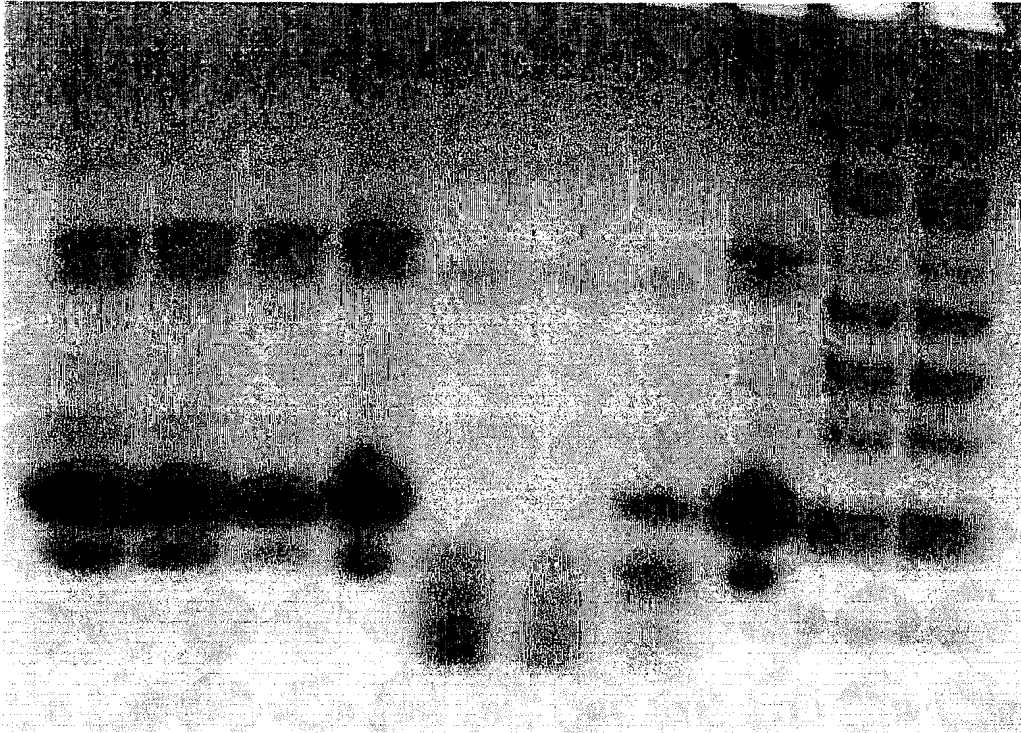


FIG. 1

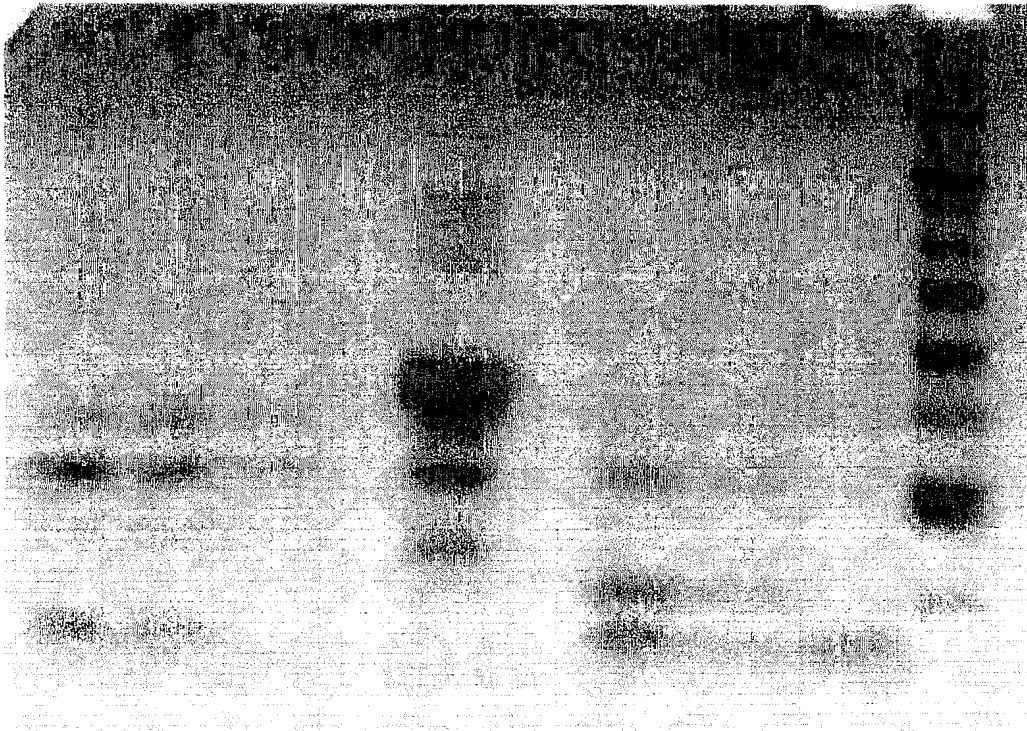


FIG. 4

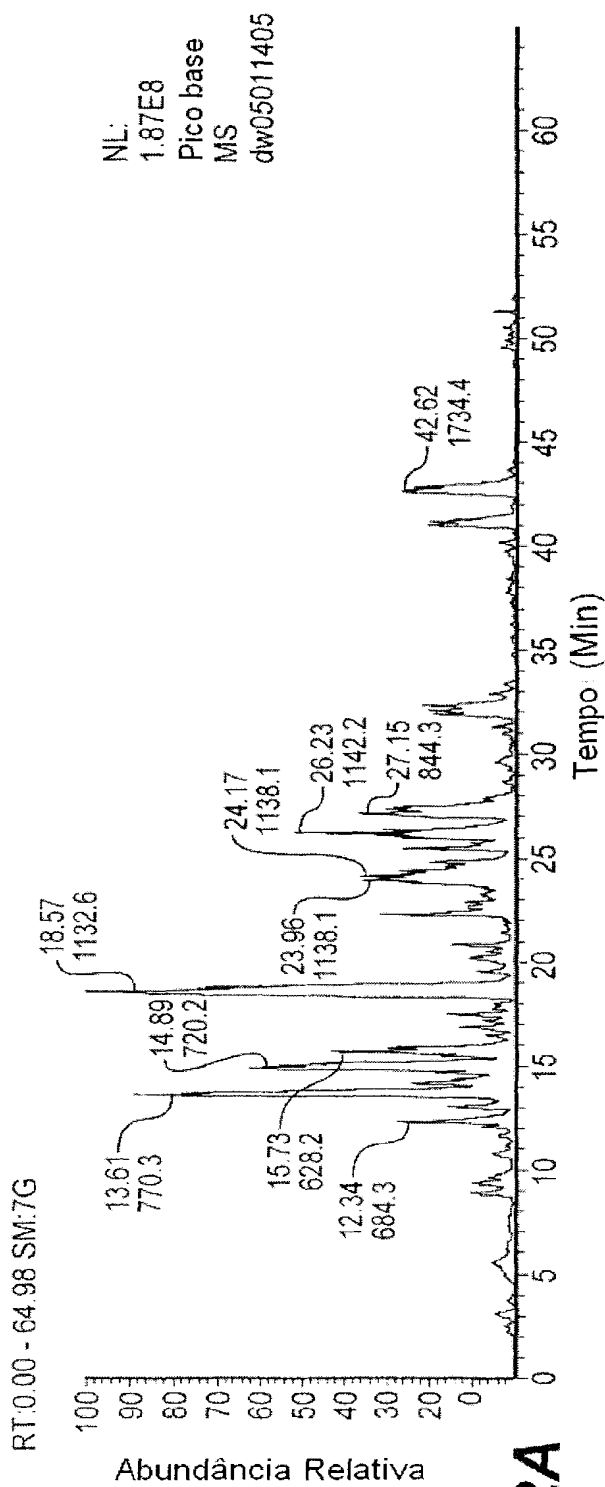


FIG. 2A

dw05011405 #22-2608 RT: 0.49-62.93 AV: 1036 NL: 3.79E6
T: + cESI Full ms [300.00-2000.00]

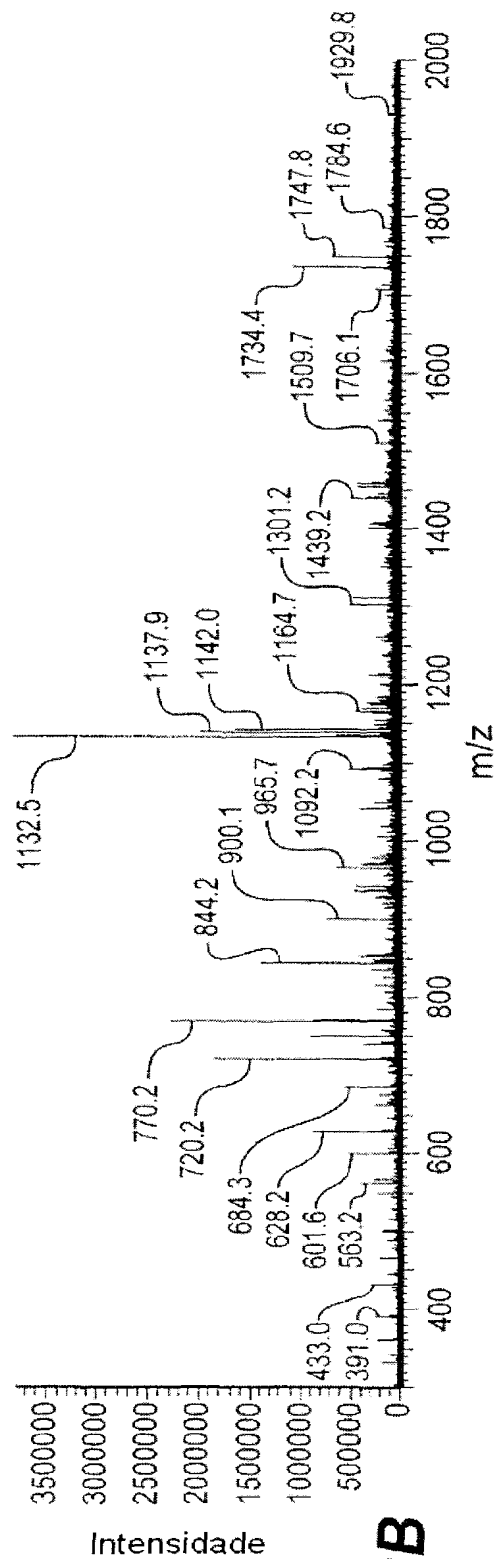
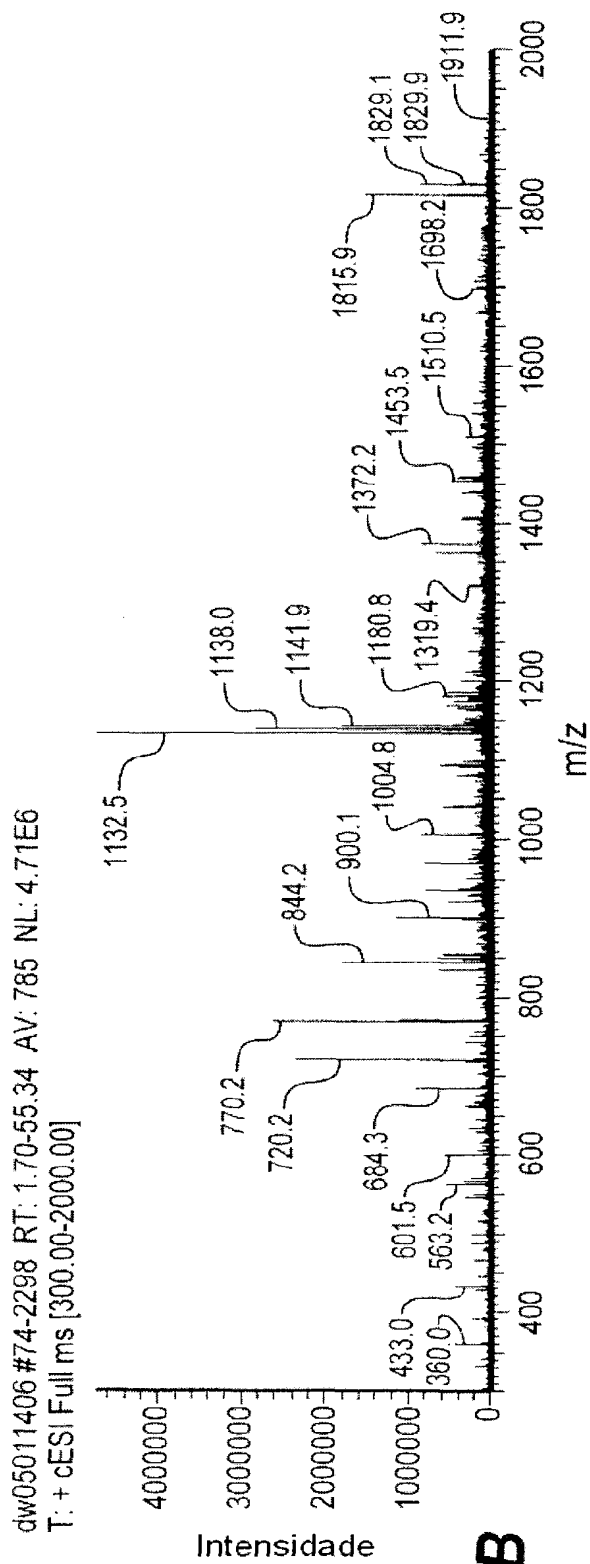
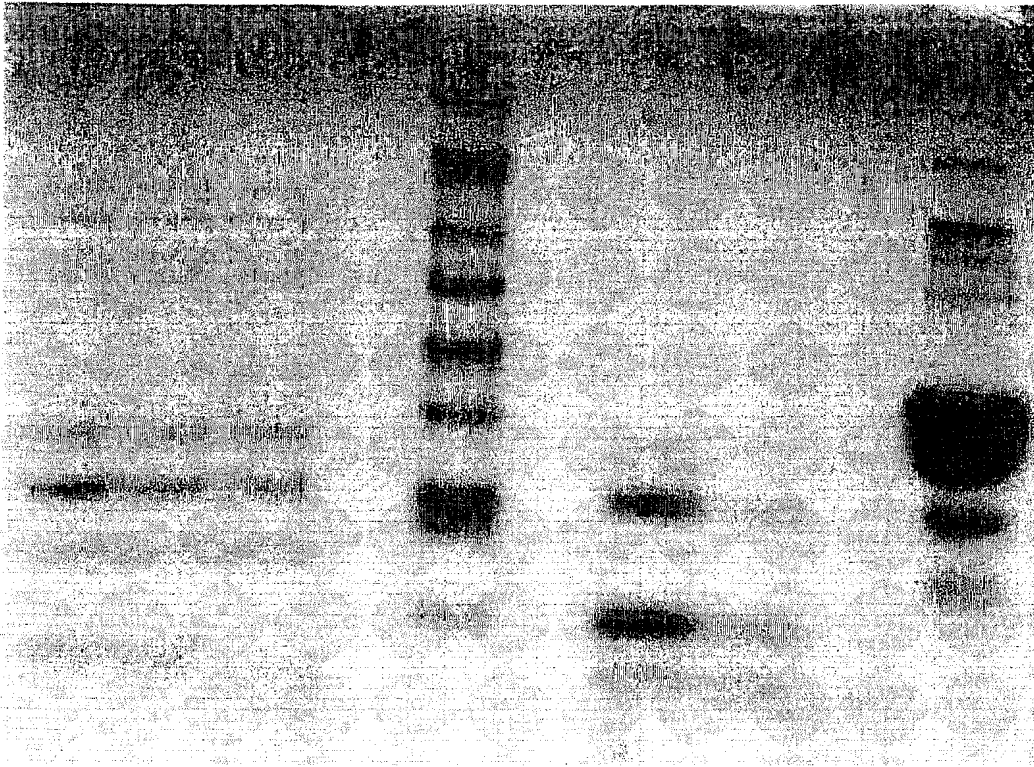
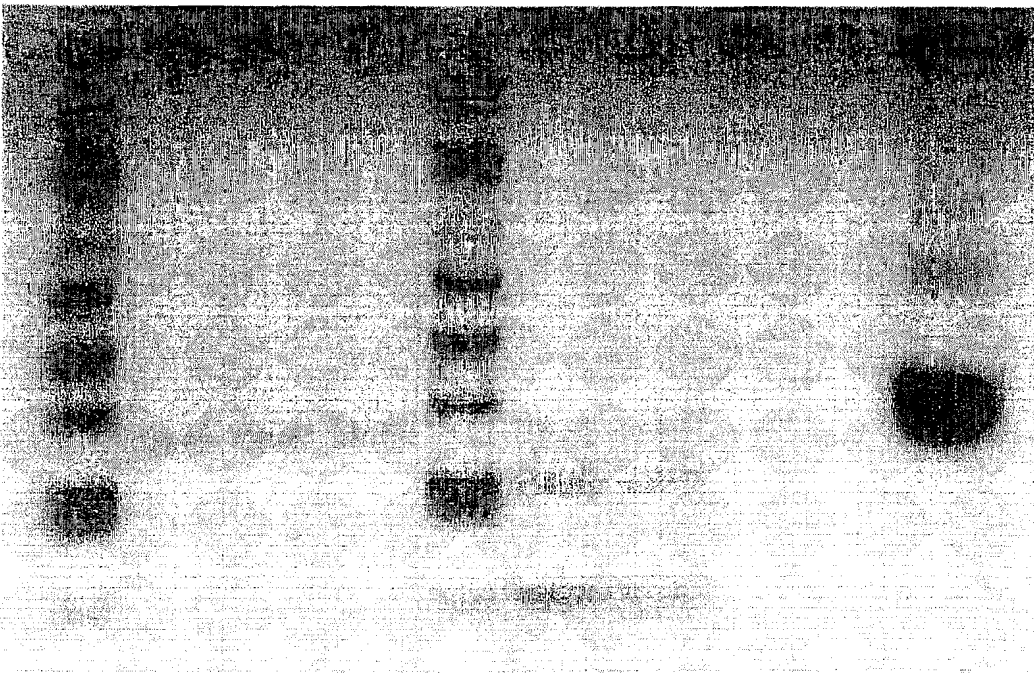


FIG. 2B



**FIG. 5****FIG. 6**

RESUMO

Pedido de Patente de Invenção para: "**HIDROLISATOS DE PROTEÍNA DO LEITE COM POTENCIAL IMUNOGÊNICO REDUZIDO**".

A presente invenção se refere às composições de
5 hidrolisatos compreendendo pelo menos uma proteína do leite ou
soro hidrolisado com pelo menos uma enzima proteolítica. Os
hidrolisatos reduzem a imunogenicidade da proteína do leite ou
do soro em um indivíduo predisposto a apresentar uma reação
imune à proteína. Além disso, a presente invenção se refere
10 também aos métodos para a produção das composições, as quais
compreendem produtos alimentícios e produtos não-alimentícios.