



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

(21) **PI0710035-3 A2**

(22) Data de Depósito: 27/03/2007
(43) Data da Publicação: 02/08/2011
(RPI 2117)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 5/10 2006.01
C12N 15/63 2006.01
C12N 9/38 2006.01

(54) Título: **BETA-GALACTOSIDADE COM ATIVIDADE TRANSGALACTOSILANTE**

(30) Prioridade Unionista: 28/03/2006 GB 0606112.1

(73) Titular(es): Clasado Inc.

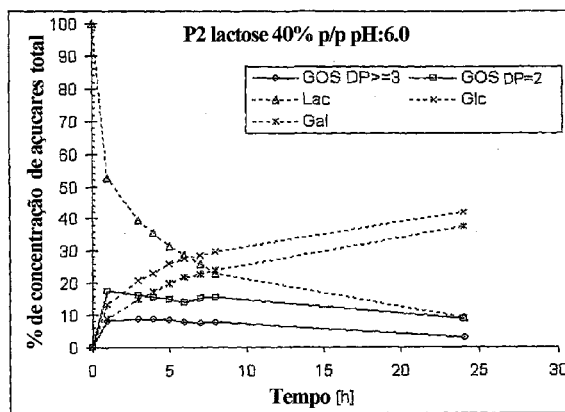
(72) Inventor(es): Athanasios K. Goulas, Georgios Tzortzis, Theodoros Goulas

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

(86) Pedido Internacional: PCT GB2007001081 de 27/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/110619 de 04/10/2007

(57) **Resumo:** BETA-GALACTOSIDASE COM ATIVIDADE TRANSGALACTOSILANTE A presente invenção está relacionada com um nova β -galactosidase com atividade transgalactosilante, isolada do microorganismo *Bifidobacterium bifidum*. A β -galactosidase é capaz de converter a lactose em uma mistura de galactooligossacarídeos que são β ligados e indesejavelmente produz a dissacarídeo galactobiose α -ligada. A mistura pode ser incorporada em numerosos produtos alimentícios e rações animais para a melhora da saúde intestinal, promovendo o crescimento de bifidobactéria no intestino, e reprimindo o crescimento da microflora patogênica.



"BETA-GALACTOSIDASE COM ATIVIDADE TRANSGALACTOSILANTE"

A presente invenção está relacionada com um nova β -galactosidase com atividade transgalactosilante, capaz de converter a lactose em uma mistura de galactooligossacarídeos. Em particular, está relacionada com uma β -galactosidase isolada de uma cepa de *Bifidobacterium bifidum* recentemente descoberta.

A invenção está relacionada particularmente com seqüências de DNA que codificam a nova enzima isolada β -galactosidase, para a enzima codificada por uma tal seqüência de DNA e para uma célula de hospedeiro, compreendendo a seqüência de DNA ou contendo um vetor recombinante incorporando a seqüência de DNA. A invenção também está relacionada com o uso da enzima codificada por uma seqüência de DNA, ou da célula do hospedeiro contendo uma seqüência de DNA ou vetor recombinante, para produzir galactooligossacarídeos.

As bifidobactérias colonizam naturalmente o baixo trato intestinal, um meio ambiente que é pobre em mono e dissacarídeos, já que tais açúcares são preferivelmente consumidos pelos hospedeiros e microorganismos presentes no alto trato intestinal. A fim de sobreviver no baixo trato intestinal, as bifidobactérias produzem vários tipos de exo- e endoglicosidases ligadas à superfície e/ou nas formas extracelulares, através das quais elas podem utilizar diversos carboidratos.

Além da atividade de hidrolase, algumas enzimas produzidas pelas bifidobactérias mostram atividade de transferase. Essa atividade de transglicosilação de glicosidases é extensivamente utilizada para a síntese enzimática de vários oligossacarídeos, para os quais já foi provado que atuam como fatores de promoção de crescimento das bifidobactérias.

É de conhecimento que os membros das bifidobactérias produzem enzimas β -galactosidase, que estão envolvidas no metabolismo bacteriano da lactose. Møller, P.L. et al em Appl & Environ. Microbial., (2001), 62, (5), 2276-2283 descrevem o isolamento e a caracterização dos genes dessas três β -galactosidases de uma cepa da bactéria *Bifidobacterium bifidum*. Eles consideraram que todas essas três β -galactosidases foram capazes também de catalisar a formação de galactooligossacarídeos beta-ligados através de transgalactosilação.

Dumortier et al em Carbohydrate Research, 201, (1990), 115-123 descreveu a formação de oligossacarídeos através de uma reação de transgalactosilação durante a hidrólise da lactose com o microorganismo *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456. A sua análise da estrutura da mistura de oligossacarídeos produzida mostrou que as uniões foram uniões β -(1 $\rightarrow$ 3), β -(1 $\rightarrow$ 6) e β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galactosil. Dumortier sugeriu que os compostos produzidos pelos microorganismos *Bifidobacterium bifidum* estão envolvidos na aderência da bactéria no intestino grosso.

WO 01/90317 descreve uma nova β -galactosidase do microorganismo β -

galactosidase, em particular uma versão truncada da enzima que possui uma alta atividade transgalactosilante.

Foi considerado que uma cepa do microorganismo *Bifidobacterium bifidum* é capaz de produzir uma atividade da enzima galactosidase que converte a lactose em uma nova mistura de galactooligossacarídeos que contém indesejavelmente até 35% de dissacarídeos, incluindo galabiose (Gal (α 1-6) – Gal). Esse dissacarídeo é conhecido (consultar Paton, J C e Paton, A W (1998), Clin. Microbiol. Revs., 11, 450-479; Carlsson, K A (1989), Ann. Reviews Biochem., 58, 309-350) por ser um anti-adesivo capaz de prevenir a adesão de toxinas, por exemplo, toxina de Shiga e patógenos, tais como *E. coli*, para a parede do intestino.

Essa cepa do microorganismo *Bifidobacterium bifidum* foi depositada sob o número de acesso NCIMB 41171 na Coleção Nacional de Bactérias Industriais e Marinhas, Aberdeen, UK em 31 de março de 2003. Ela está descrita também na Patente UK N° 2 412 380.

Agora foi descoberto que essa cepa do microorganismo *Bifidobacterium bifidum* produz várias β -galactosidases, incluindo a nova β -galactosidase. Essa enzima produz um número de oligossacarídeos diferentes que são β -ligados.

De acordo com essa invenção, é fornecida uma seqüência de DNA que codifica uma proteína com uma seqüência de aminoácidos conforme fornecido na SEQ. ID NO: 2 ou hibridiza sob rigorosas condições para a seqüência de DNA que codifica essa proteína. A seqüência de proteína é fornecida na SEQ. ID NO: 1 ou pode compreender um fragmento ou seu degenerativo.

A frase “degenerativo” é construída para significar uma seqüência de DNA que é no mínimo 50% homóloga para SEQ. ID NO: 1, preferivelmente 50 até 98% homóloga, mais preferivelmente de 75 até 95% homóloga.

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

De acordo com um segundo aspecto da invenção, é fornecido uma enzima codificada por uma seqüência de DNA conforme definido acima. Tal enzima pode compreender a seqüência de aminoácidos fornecida em SEQ. ID NO: 2 ou um seu fragmento.

De acordo com um terceiro aspecto da invenção, é fornecido um vetor recombinante, preferivelmente um vetor de expressão, compreendendo uma seqüência de DNA conforme definido acima. Tal vetor pode ser incorporado em uma célula de hospedeiro, tal como uma célula bacteriana, célula de levedura ou célula de fungo. Alternativamente, a seqüência de DNA pode ser incorporada em tal célula de hospedeiro. Uma célula de hospedeiro adequada pode ser selecionada do grupo que compreende *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Lac-*

tobacillus, Bacillus, por exemplo, Bacillus subtilis ou Bacillus circulans, Escherichia e Aspergillus, por exemplo, Aspergillus niger.

Utilizando lactose como um substrato, a enzima codificada pela sequência de DNA, conforme definido acima, produz uma mistura de oligossacarídeos, compreendendo dissacarídeos, tais como Gal (β 1 - 3) Glc, Gal (β 1 - 3) Gal, Gal (β 1 - 6) Gal e Gal (α 1 - 6) Gal, trissacarídeos e tetrassacarídeos, tais como Gal (β 1 - 6) Gal (β 1 - 4) Glc, Gal (β 1 - 3) Gal (β 1 - 4) Glc e Gal (β 1 - 6) Gal (β 1 - 6) Gal (β 1 - 4) Glc.

A enzima ou a célula de hospedeiro, conforme descrito acima, pode ser utilizada para produzir uma mistura de galactooligossacarídeos, que podem formar parte de um produto para melhorar a saúde intestinal. Tal produto pode ser selecionado do grupo que consiste de produtos laticínios (por exemplo, leite líquido, leite em pó, tal como leite em pó integral, leite em pó desnatado, leite em pó semi-desnatado, pós a base de soro, leites para bebês, fórmulas para bebês, sorvetes, iogurte, queijo, produtos laticínios fermentados), bebidas, tais como suco de fruta, alimentos infantis, cereais, pães, biscoitos, doces, bolos, suplementos alimentares, produtos dietéticos, ração animal, ração para aves domésticas ou, de fato, qualquer outro alimento ou bebida. A presença de galactooligossacarídeos em tais produtos possui a vantagem de intensificar o crescimento da Bifidobacterium que promove a saúde, no produto ou na flora intestinal do consumidor após a ingestão do produto ou ambos.

Alternativamente, os oligossacarídeos assim produzidos podem ser utilizados para a preparação de um medicamento, por exemplo, na forma de comprimido ou cápsula, para a prevenção da adesão de patógenos ou toxinas produzidas pelos patógenos à parede do intestino. O medicamento pode ser administrado a um paciente, por exemplo, após o curso de tratamento com antibiótico, que freqüentemente altera ou mesmo destrói a flora intestinal sadia normal.

De acordo com ainda um outro aspecto da invenção, é fornecido um processo para a produção de uma enzima conforme definido acima que compreende a cultura de uma célula de hospedeiro conforme definido acima em um meio de cultura adequado sob condições que permitem a expressão da enzima e a recuperação da enzima resultante ou produtos a base de enzima da cultura.

A invenção está direcionada também para um processo para a produção da mistura de galactooligossacarídeos que compreende o contato da enzima conforme definido acima com um material contendo lactose sob condições que conduzem à formação da mistura de galactooligossacarídeo.

O material adequado contendo lactose pode ser selecionado da lactose, leite integral, leite semi-desnatado, leite desnatado, soro, leite semi-integral e soro impregnado disponível comercialmente. Tais produtos laticínios podem ser obtidos de vacas, búfalos, ovelhas,

lhas e cabras. Leite semi-integral é definido como leite integral do qual foi retirada a nata, que é subsequentemente substituída através da adição de gordura ou óleo vegetal.

DESCRIÇÃO BREVE DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra a seqüência de nucleotídeos (SEQ. ID NO: 1) do microorganismo *Bifidobacterium bifidum* β -galactosidase da invenção; e

A Figura 2 mostra a seqüência de aminoácidos (SEQ. ID NO: 2) correspondendo à seqüência de nucleotídeos da Figura 1.

A Figura 3 é um gráfico que mostra a reação de curso do tempo durante a síntese de galactooligossacarídeo com β -galactosidase e lactose 40% (p/p) em tampão de fosfato 0.1M em pH 6.0 como substrato; e

A Figura 4 mostra um cromatograma de troca aniônica de alto desempenho da mistura de galactooligossacarídeo sintetizado pela β -galactosidase do microorganismo *B. bifidum* NCIMB 41171 utilizando lactose 40% (p/p) em tampão de fosfato 0.1M em pH 6.0 como substrato (Glc = glicose, Gal = galactose, Lac = lactose, α (1 – 6) = galactobiose, DP = grau de polimerização).

O DNA genômico foi isolado da cepa de *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) utilizando o método de Lawson *et al.* (1989) Fems Microbiol Letters, 65, (1-2), 41-45. O DNA foi digerido com enzimas de restrição e fragmentos possuindo uma dimensão máxima de 15 kbp foram ligadas com o vetor pSP72, que foi digerido com as mesmas enzimas de restrição. As células de *E. coli* foram transformadas com um vetor contendo inserções consistindo de PstI, Eco RI, Bam HI, KpnI, SmaI digerido de DNA cromossomal do microorganismo *B. bifidum*. Os clones com atividade β -galactosidase foram selecionados nas placas de Agar Luria Bertani contendo p-nitrofenil, X- β -Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo) e isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG). As misturas de ligação com Pst I DNA cromossomal forneceram aumento para 13 clones β -galactosidase positivos, um dos quais é identificado como pP2.

O seqüenciamento de DNA no fragmento P2 de DNA inserido foi realizado utilizando o método de Sanger de terminação de cadeia dideoxi (Russel P., 2002 iGenetics, Pearson Education, Inc., San Francisco, 187-189), utilizando o kit de seqüenciamento de ciclo V.3.O BigDye Terminator (Applied Biosystems, USA). A seqüência de DNA de P2 é mostrada na Figura 1 (SEQ. ID NO: 1).

A estrutura de leitura aberta (ORF) foi localizada através da utilização do localizador ORF da NCBI (National Center of Biotechnology Information). A seqüência de nucleotídeo da Figura 1 foi traduzida em todas as seis estruturas de leitura possíveis e uma estrutura de leitura aberta de 738 aminoácidos que codificam uma suposta β -galactosidase foi identificada. A tradução é mostrada na Figura 2 (SEQ. ID NO: 2).

A presente invenção será também descrita através de forma de referência para o

seguinte exemplo.

Exemplo 1

Materiais e Métodos

Todos os produtos químicos e preparações de meios de cultura utilizados ao longo desse estudo foram obtidos das empresas Sigma (Dorset, UK), Invitrogen (Paisley, UK), Oxoid (Basingstoke, UK), Qiagen (West Sussex, UK) e Promega (Southampton, UK).

Cepas de Bactérias

A cepa *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) foi mantida em glóbulos criogênicos em tubos Microbank à temperatura de -70°C. Para experimentos posteriores, a cepa foi revivificada em meio Agar Wilkinson Chalgren (WC) (Oxoid, UK) e meio TPY (meio de extrato de levedura tripticase fitona) e cresceu anerobicamente (composição de CO₂ e N₂, 80% e 20%, respectivamente) à temperatura de 37°C durante 48 horas. A morfologia da colônia e a ausência de contaminação foram testadas através de coloração de gram.

Cepas de *E. coli*

A cepa de *Escherichia coli* DH5a utilizada nesse estudo foi comumente incubada sob condições aeróbicas à temperatura de 37°C em meio agar ou caldo Luria Bertani (LB) (Sambrook J. e Russel W. D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) e quando necessário, foi suplementada com antibióticos (100 µg/ml de ampicilina e/ou 15 µg/ml de cloranfenicol) e 40 µl de X-β-Gal 2%, 7 µl de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo), que foram aplicados na superfície de uma placa de agar 90 mm semi-pronta.

A cepa de *E. coli* DH5a (Invitrogen, Paisley, UK) (genótipo: F⁻ ϕ80/*lacZ*ΔM Δ(*lacZYA-argF*)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_K⁻, m_K⁻)*phoA*supE44 *thi-1 gyrA96relA1*λ) é uma cepa α-galactosidase positiva e foi utilizada nos experimentos de expressão e para outras manipulações genéticas.

Extração de DNA Genômico do microorganismo *Bifidobacterium bifidum*

O DNA genômico foi isolado da cepa de *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) utilizando o seguinte método no qual o DNA cromossomal foi preparado da pelota de célula coletada de 100 ml de caldo WC anaeróbio. As células foram submetidas à re-suspensão em 10 ml de tampão TES (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl, pH8) e tratadas com 200 µl de proteinase K (em 20 mg/ml) e 200 µl de RNase (ambos 10 mg/ml) e incubadas por uma hora à temperatura de 65°C. O volume de 12 ml de fenol/clorofórmio foi adicionado e a extração foi repetida até que a fase aquosa pudesse ser facilmente separada da interfase. O DNA genômico foi precipitado com isopropanol e submetido à resuspensão em Tris-HCl 10 mM – EDTA 1 mM (pH8). O DNA genômico foi, então, digerido com fosfatase alcalina. A digestão do DNA genômico do microorganismo *B. bifidum* foi realizada utilizando *EcoRI*, *PstI*, *BamHI*, *SmaI* e *KpnI*. As misturas de ligação foram utilizadas para transformar DH5a de

E. coli e os clones β -galactosidase positivos foram identificados como colônias azuis nas placas contendo X-Gal.

Preparação do Vetor DNA

O vetor utilizado para clonagem e expressão ao longo de todo esse estudo foi o pSP72 (Promega, UK) (Krieg, P.A. e Melton, D. A. (1987). In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods in Enzymology*. 155: 397-415).

Esse vetor foi selecionado devido à falta de atividade de complementação do fragmento α da β -galactosidase, que é codificada em pSP72. Esse vetor não carrega o segmento curto do DNA de *E. coli* contendo a seqüência regulatória e a informação codificadora para os primeiros 146 aminoácidos da β -galactosidase, que em combinação com as cepas de *E. coli* (isto é, DH5a), que expressam a porção carboxi-terminal dessa β -galactosidase, está fornecendo uma β -galactosidase ativa (complementação α).

O vetor foi digerido com as seguintes enzimas de restrição: *Pst*I, *Bam*HI, *Hind*III, *Sma*I, *Kpn*I e *Eco*RI, de acordo com as instruções do fabricante, utilizando um excesso de 10 vezes a enzima sobre o DNA (unidades de enzima: μ gr de DNA equivalente às dez unidades de enzima por uma μ gr de DNA de plasmídeo ou dez unidades de enzima por 0.5 pmol de DNA de plasmídeo). Após a inativação térmica da enzima (20 minutos à temperatura de 65°C), os padrões de restrição foram analisados através de análise de eletroforese horizontal com gel. A presença de um fragmento único no gel indica a completa digestão do vetor e a digestão de restrição do mesmo.

A digestão suficiente do vetor foi testada também através da transformação de moléculas não ligadas em células de *E. coli* DH5a viáveis. O número de colônias formadas em placas de agar LB suplementadas com ampicilina (100 μ g/ml) foi um indicador das moléculas não digeridas e a base esperada durante os experimentos subseqüentes.

Os vetores também foram desfosforilados com uma fosfatase alcalina de intestino de bezerro, CIAP (Promega, Southampton, UK), de acordo com as instruções do fabricante. A eficiência do tratamento foi testada através da ligação (com T4 DNA ligase de Bacteriófago, de acordo com as instruções do fabricante), após transformação nas células DH5a. O número de colônias formadas mostrou o número de moléculas arredondadas (vetor não clonado) e uma subtração das colônias acima das colônias formadas sem o tratamento do vetor CIAP mostrou o número de vetores não desfosforilados.

Construção da Biblioteca de DNA Genômico

O DNA genômico foi parcialmente com seis enzimas de restrição que reconhecem freqüentemente as seqüências de hexa-nucleotídeos, que ocorrem dentro do DNA procariótico. *Eco*RI, *Bam*HI, *Pst*I, *Kpn*I, *Sma*I e *Hind*III são endonucleases de restrição tipo II, que reconhecem especificamente as seqüências 5'G/AATTC'3, 5'G/GATCC'3, 5'CTGCA/G'3, 5'GGTAC/C3', 5'CCC/GGG3' e 5'AAGCTT3' respectivamente, e fazem o duplo filamento

se quebrar dentro dessas seqüências, gerando projeções de 5 dos 4 nucleotídeos, AATT, GATC, AGCT para *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*, respectivamente, e projeções de 3, ACGT, GTAC para *PstI* e *KpnI* respectivamente e pontas obtusas para *SmaI*.

Todas essas enzimas foram ativas e habilitadas para clivagem de DNA somente na presença de íons de magnésio divalente. Esses íons foram os únicos cofatores necessários.

Digestão de Restrição do DNA

Todas as digestões de restrição das amostras de DNA genômico foram incubadas durante 2 horas à temperatura de 37°C e finalmente submetidas à inativação térmica à temperatura de 65°C durante 20 minutos. As reações foram, então, resfriadas até a temperatura ambiente e a quantidade adequada de tampão de carga foi adicionada, após a leve mistura com um capilar de vidro selado. As soluções, então, foram carregadas nos poços de uma placa com gel de agarose 0.8% (fornecimento de energia de 4 - 5 volts/cm para 14 – 16 horas) e a dimensão do DNA digerido foi estimado com aquela dos padrões de DNA de 1 kbp (Promega, UK) (Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2002)).

Purificação dos fragmentos gerados após a digestão de restrição

A purificação de fragmento das misturas de reação e os géis de agarose foi realizada através do uso do kit de extração de gel QIAEX da empresa Qiagen (West Sussex, UK). Os protocolos estão descritos com detalhes no manual do fabricante.

Ligação e Transformação do DNA

Após a purificação dos fragmentos de DNA com o kit de extração de gel Qiaxex, eles foram ligados com o vetor pSP72 tratado com CIAP. Para a ligação, as quantidades apropriadas de DNA foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 0.5 ml, conforme mostrado na Tabela 1.

Tubo	DNA
A	Vetor (15 fmoles [~ 29.7 ng])
B	Vetor (15 fmoles ~ 29.7 ng de DNA) mais insert (15 fmoles ~ 69.3 ng de material estranho)
C	Controle pUC (0.056 fmoles [~ 100 pg])
A proporção molar do vetor de DNA de plasmídeo para inserir um fragmento de DNA deveria ser de ~ 1:1 na reação de ligação. A concentração de DNA final deveria ser de ~10 ng/μl.	

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

Antes de cada ligação, os fragmentos de DNA foram aquecidos à temperatura de 45°C durante 5 minutos para fundir qualquer terminal coesivo que foi submetido ao reanelamento durante a preparação do fragmento. Uma proporção molar do vetor: insert de DNA de 1:1 foi selecionada para todas as reações de ligação e a montagem da reação foi realizada de acordo com as instruções da empresa Promega.

Aos tubos A e B foram adicionados 1.0 µl de tampão de ligação 10x e 0.5 unidades Weiss de T4 DNA ligase (Promega, UK) e o volume de ligação foi ajustado para 10 µl com água com grau biológico molecular. Ao tubo C foi adicionado 1.0 µl de tampão de ligação 10x e o volume de ligação foi ajustado para 10 µl com água com grau biológico molecular.

Os fragmentos de DNA foram adicionados aos tubos junto com água e, então, aquecidos até a temperatura de 45°C durante 5 minutos para fundir qualquer terminal coesivo que tenha sido submetido ao reanelamento durante a preparação. A temperatura do DNA foi resfriada até o ponto de 0°C antes que o restante dos reagentes de ligação seja adicionado e as misturas de ligação sejam incubadas por toda a noite à temperatura de 16°C (Sambrook e Russell, 2001).

Após a precipitação e purificação do etanol dos fragmentos ligados (a fim de remover a mistura de ligação que causa uma redução da eficiência de transformação), as transformações foram realizadas, de acordo com as instruções de Hanahan. Foi adicionado ~ 50 ng de DNA ligado em 5 µl de solução ao volume de 100 µl de células DH5a viáveis. Após o tratamento térmico e expressão do gene de resistência a ampicilina, as células foram espalhadas sobre a superfície das placas de LB contendo ampicilina (100 µg/ml), X-β-Gal (40 µl de X-β-Gal 2%) e IPTG (7 µl de IPTG 20%).

O número de transformantes de cada reação de ligação foi medido. O número de transformantes comumente obtido do tubo C foi de $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ cfu/µg enquanto do tubo A foi de 500 – 600 cfu/µg. O número de transformantes no tubo A foi uma indicação do tratamento eficiente do DNA do vetor. O número de transformantes no tubo B estava em uma faixa de $2 - 4 \times 10^4$ cfu/µg.

Número de Transformantes

As misturas de ligação com DNA cromossomal *Pst*I forneceu aumento aos 13 clones β-galactosidase positivos fora dos ~ 2500 transformantes exibidos enquanto que com *Bam*HI forneceu aumento aos 7 clones positivos (~ 1500 transformantes exibidos), *Eco*RI forneceu aumento aos 3 clones positivos (~ 1300 transformantes exibidos), *Kpn*I forneceu aumento aos 7 clones positivos (~ 2000 transformantes exibidos), *Sma*I forneceu aumento aos 3 clones positivos (~ 1600 transformantes exibidos) e *Hind*III forneceu aumento aos 2 clones positivos (~ 1200 transformantes exibidos).

Digestão Positiva de Clone

A fim de identificar os diferentes genes da β-galactosidase, os plasmídeos isolados

dos clones positivos foram digeridos de acordo com a seguinte tabela:

	Amostras	Enzimas
Primeira Digestão	pB1, pB2, pB3, pB4, pB5, pB6, pB7	<i>Bam</i> HI
Segunda Digestão	pP1, pP2, pP3, pP4, pP5, pP6, pP7, pP8, pP9, pP10, pP11	<i>Pst</i> I
Terceira Digestão	pP12, pP13, pP14	<i>Pst</i> I
Quarta Digestão	pE1, pE2, pE3	<i>Eco</i> RI
Quinta Digestão	pP1, pP12, pB1, pP2, pE1, pE2, pE3	<i>Pst</i> I e <i>Eco</i> RI
Sexta Digestão	pS1, pS2, pS3	<i>Sma</i> I
Sétima Digestão	pP1, pP12, pB1, pP2, pS1, pS2, pS3	<i>Pst</i> I e <i>Sma</i> I
Oitava Digestão	pK1, pK2, pK3, pK4, pK5, pK6, pK7	<i>Kpn</i> I
Nona Digestão	pP1, pP12, pB1, pP2, pK1, pK2, pK3, pK4, pK5, pK6, pK7	<i>Pst</i> I e <i>Kpn</i> I
A primeira letra (p) indica plasmídeo e o gene insert enquanto que a segunda letra (P, B, E, S, K) indica a enzima de restrição que foi utilizada para o isolamento do respectivo clone do DNA genômico.		

A análise de eletroforese com gel dos fragmentos gerados após a digestão mostrou que os plasmídeos pB1, pP1, pP2 e pP11 possuem cada um insert que codifica uma diferente β -galactosidase. Os clones contendo P2 foram utilizados para mais análises.

5 Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento de DNA foi realizado com o método de Sanger de terminação de cadeia de dideoxi através da utilização do kit de seqüenciamento de ciclo v.3.0 BigDye Terminator (Applied Biosystems, USA) e analisado com o ABI Prism 3100, um sistema de análise de DNA com base na fluorescência, incorporando eletroforese capilar.

- 10 As terminações 5' e 3' dos fragmentos de DNA do insert foram seqüenciados com os iniciadores específicos do vetor. Os inserts foram também seqüenciados através da utilização do Genome Priming System (GPS-1) (New England Biolabs, UK). O GPS-1 é um sistema "in vitro" com base no transposon TN7, que utiliza TnsABC Transposase para inserir Transposon randomicamente no DNA alvo. O doador: a proporção de massa do DNA alvo de 1:4 foi utilizada de acordo com as instruções do fabricante. O número de plasmídeos alvo foi de 25. Esse número foi calculado de acordo com as instruções do fabricante e ele assume 5 vezes uma profundidade de cobertura.

Devido à longa seqüência de nucleotídeo do plasmídeo pP2 na qual a proteína P2

foi codificada, somente a parte que continha o gene da β -galactosidase foi selecionada para ser seqüenciada. A enzima inativada após a inserção do insert da transposase em uma posição relativa de 172bp do fragmento seqüenciado, indicou que o códon inicial estava no sentido contrário dessa posição. De forma similar, a inserção do insert na posição 2882bp eliminou completamente a atividade da enzima, indicando que o códon de interrupção existia a partir dessa posição. Além disso, a atividade da enzima foi eliminada completamente com a inserção dos inserts nas posições 262bp, 331bp, 375bp, 621bp, 866bp, 1348bp, 1358bp, 1394bp, 1513bp, 1704bp, 2128bp, 2519bp com relação ao primeiro nucleotídeo que foi seqüenciado.

A análise do domínio N-terminal com software SignalP e PSORT não mostrou qualquer sinal de peptídeo, indicando que P2 não é secretado no meio extracelular.

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

Identificação da Estrutura de Leitura Aberta

A estrutura de leitura aberta (ORF) do P2 foi localizada através da utilização do localizador ORF da NCBI, cujo endereço na rede é [HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)). O código genético bacteriano foi utilizado e o comprimento da estrutura foi determinado como sendo de 100 bp. A seqüência de nucleotídeo foi traduzida em seis estruturas possíveis e uma estrutura de leitura aberta de 738 aminoácidos que codificam uma suposta β -galactosidase foi identificada (a tradução é mostrada na Figura 2).

Exemplo 2

Síntese com enzima clonada de β -galactosidase isolada do microorganismo *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171 na célula de hospedeiro do microorganismo *E.coli* (cepa DH5a)

A seguinte síntese descrita, a menos que estabelecido de outra forma, foi realizada com as células inteiras de hospedeiro DH5a de *E. coli* após o tratamento da biomassa de *E. coli* (coletada através de centrifugação a 10,000 g) com tolueno a uma concentração de 2000 ppm a fim de aumentar a permeabilidade celular e também fazer com que as células não viáveis sejam submetidas à destruição da sua membrana citoplasmática. A biomassa de *E. coli* foi preparada conforme descrito no Exemplo 1 sob o título de “Cepas de *E. coli*”.

Síntese com enzima clonada

A síntese com β -galactosidase foi realizada a uma concentração de substrato de 40% (p/p) da concentração inicial de lactose. A solução de síntese foi preparada em tampão fosfato 0.1 M a um pH de 6.0 contendo adicionalmente Tween 80 1 g/l (monooleato sorbitan de polioxietileno (20). A síntese foi realizada à temperatura de 40°C em banho-maria com

agitação de 150 rpm. O pH ótimo para a enzima específica foi selecionado com base nas medições de atividade (utilizando o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo como substrato) de uma preparação enzimática específica com valores variáveis de pH.

5 Para a síntese de galactooligossacarídeo, foi utilizado o volume de 2 ml do sobrenadante de lisado de célula (após a ruptura das células de *E. coli* através de prensa Francesa) com 8 g de lactose 50% (p/p) a fim de fornecer uma concentração final de substrato de 40% (p/p). Essa preparação enzimática possui uma atividade de 735 U/ml.

10 As concentrações dos diferentes açúcares presentes na mistura durante a síntese são mostradas na Figura 3. Os cromatogramas da cromatografia de troca iônica de alto desempenho acoplada com detecção amperométrica com pulso (HPAEC-PAD) das misturas de galactooligossacarídeos sintetizados através da β -galactosidase clonada do microorganismo *B. bifidum* NCIMB 41171 são mostrados na Figura 4. As concentrações de açúcar na mistura de galactooligossacarídeos no ponto de tempo ótimo de síntese são mostradas na Tabela 1.

15 Tabela 1: Composição de carboidrato da síntese de galactooligossacarídeo na concentração de lactose inicial de 40% (p/p) no ponto de tempo onde a concentração máxima de oligossacarídeo foi observada.

Síntese Inicial de Substrato	GOS DP ≥ 3	GOS DP = 2	Lac	Glc	Gal
% (p/p)	Concentração (% total de açúcares)				
40	8.82	16.25	39.40	20.76	14.85

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

Listagem de Sequência

<110> McDONALD, Sarah C
 <120> "PRODUTO E PROCESSO"
 <130> 14011:KG
 <150> GB 0606112.1
 <151> 28-03-2006
 <160> 2
 <170> PatentIn versão 3.4
 <210> 1
 <211> 4395
 <212> DNA
 <213> Bifidobacterium bifidum

<220>
 <221> Beta-galactosidase
 <222> (1)..(4395)

<400> 1	
tccttttagat tggattgaaa acttcctttt tttatgtaaa aggatattcg gggaaattcc	60
ctttttgaaa atttcatgac caaaaatccc cttaacgtga gttttcggtc cactgagcgt	120
cagaccccggt agaaaagatc aaaggatcct cttgagatcc tttttttctg cgcgtaactct	180
gctgcttgca aacaaaaaaa cccccgtac cagcgggtgg ttgtttgccg gatcaagagc	240
taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc	300
ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc	360
tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg	420
ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt	480
cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg	540
agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg	600
gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttcaggg gggaaacgcc tggatatctt	660
atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag	720
gggggaggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacgggtc ctggcctttt	780
gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta	840
ttaccgcctt tgagtgaagt gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt	900
cagtgaagca ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc	960
cgattcatta atgcagggtta acctggctta tcgaaattaa tacgactcac tatagggaga	1020
ccggcagatc tgatatcatc gatgaattcg agctcgggtac ccggggatcc tctagagtcg	1080
acctgcagaa gtactggcag tccggcctcg ccgccggcgc cgtcaaggag tgatctcgcg	1140
ggaggggccag tgtccgcttg cagcatgcgt cacgttcgtc tgacgggtctt gacgtgcgcc	1200
tagcgggtgg ccctccctac ggaacatgta tatgatatgg agggacgctc accgtgtgcg	1260

atgcgggctg	gcgcgatatg	gcaccagccc	gcatcgcatg	tcacagttga	tttttcgtcg	1320
atgcgacggt	tcggccgggg	cgtcagacaa	tgaacaagta	atggagcgga	atatgagtaa	1380
acgcagaaag	cacagttggc	cgcagccgct	gaagggcgcc	gaatcccgtc	tctggtatgg	1440
cggtgattac	aatccccgacc	aatggccgga	ggaggtcttg	gacgatgata	tccgtctgat	1500
gaagaaggcc	ggcgtcaacc	ttgtatcagt	cggcatcttc	tcattgggca	agatcgagcc	1560
ggaggaaggc	aagtacgatt	tcgactggct	ggaccgtgcc	atcgataagc	tcggcaaggc	1620
gggcatcgct	gtagacctcg	cctccgccac	cgcctccccg	ccgatgtggc	tgacccaggc	1680
ccatccggag	gtgctgtgga	aggacgagcg	cggcgacacc	gtgtggccgg	gtgcccgtga	1740
gcattggcgt	ccgacgagcc	ctgtgttccg	cgagtacgcg	ctgaacctgt	gccgtcgtat	1800
ggccgagcac	tataagggca	accatacgt	ggtggccttg	cacgtgagca	acgaatacgg	1860
ctgccacaac	cgcttcgact	actcggacga	cgccatgcgc	gccttccaga	agtggtgcaa	1920
gaagcgctac	aagaccatcg	acgcggtgaa	cgaggccttg	ggaacagcgt	tctgggcccc	1980
gcacatgaac	gatttctccg	agatcatccc	gcctcgctac	atcggtgacg	gcaacttcat	2040
gaaccggggc	aagctgctcg	actacaagcg	gttcagctcc	gacgcgctca	aggagctcta	2100
catcgccgaa	cgtgacgtgc	tggagtccat	cacgccgggt	ctgccgctga	ccaccaatth	2160
catggtgtct	gccggcggct	cgatgcttga	ctatgacgac	tggggtgcgg	aggctcgattt	2220
cgtctccaac	gaccactact	tcacgccggg	cgaggaccat	ttcgacgagg	ttgcgtacgc	2280
cgcgtcgctg	atggacggca	tttcacgcaa	ggaaccgttg	ttccagatgg	agcattccac	2340
ctccgcggtg	aattggcgtc	cgatcaacta	ccgtgcggag	ccgggctcgg	tcgtgcgcga	2400
ctccctcgcg	caggtcgcta	tgggcgccga	tgccatctgc	tatttccagt	ggcgacagtc	2460
caaggccggc	gcggagaagt	ggcactcctc	gatggtgccg	catgcgggcg	aggattcgca	2520
gatcttccgt	gatgtgtgcg	agctgggcgc	cgatctggga	cgtctgtccg	acgaggggtct	2580
gatgggcacc	aagacggtca	agtccaaggt	cgccgtcgtg	ttcgactacg	agtcccagtg	2640
ggccaccgag	tacaccgca	acccgaccca	gcaggtcgat	cattggaccg	agccgttggg	2700
ttggttccgc	gcgcttgccg	acaacggcat	caccgccgac	gtggttccgg	tgcggtccga	2760
ttgggattcc	tacgagattg	ccgtgctgcc	gtgcgtgtat	ttgctgtccg	aagagacgag	2820
ccgcagggtt	cgggagttcg	tggcgaacgg	cggcaagttg	ttcgtgacgt	actacaccgg	2880
attgagcgac	gagaacgacc	acatctggct	tggcggctac	ccgggctcga	ttcgtgacgt	2940
cgtcggcgtg	cgcgtcgaag	agttcgcccc	gatgggcaac	gacatgccgg	gcgcatttgg	3000
tcacctcgac	ctggacaatg	gcacggtggc	gcatgacttt	gccgacgtga	tcacgtccac	3060
ggccgacacg	tccacggtac	tggcctccta	taaggcgga	cgctggaccg	gcatgaacga	3120
ggtgccggcc	atcgtggcca	acgggtatgg	cgacgggcgg	accgtatatg	tcggatgccg	3180
tctgggccgt	caggggcttg	cgaagagcct	gccggcgatg	ctgggttcca	tggggctgtc	3240
ggacctcgcc	ggtgatggcc	gcgtgctgcg	tgtcgaacgc	gccgacgccg	cggcggcgag	3300

```

ccgcttcgag ttcgtgttca accgcaccca tgaaccggtg accgtcgacg ttgaagggga 3360
ggccatcgcg gcttcgctcg cgcgtgtcga cgacgggagg gccaccatcg atccgacggg 3420
tggtgtcgtg ctcaggcgat aatcggttga aacactgggc tgtaagggct taggaaaggc 3480
gtatgtttgc ggtgacacgc gacatacgcc ttatgggaaa gaaggcgctg gcgcttaccg 3540
ggctgaggcg atgctggtca gcgtcgctgc gtgcggcaac tcaagcagca gctccgctcc 3600
gaagcaggaa ggcgacgtca aggaaatcac cgtgtgggct tggggcctac gctgactcag 3660
gtggccaagg acttcaaaaa aggagaccgg catcaatgtc aacctggtga acaccggcca 3720
ggcgacaag acctgggacg agttctatca ggacgccaag aagattcaca cccttggcga 3780
caactactac atcacgtccg acaccgggtg cgccggcttc tacgactcga tgacctggct 3840
ggccagtgcg acgctgttct ccaccgaagg cgagacggtc accattaacc tgactggcgc 3900
cccgaaggtc aaggcccgcg gtatcttcgg cgactacctt ggcaagtcct acaccggcaa 3960
ccagaagctg agcgatggcg tcgccgcttt gggaacaggc tctgaaggac tacgcgaagg 4020
atcaggggcta caccgtcaag taaccttcgc agtcaagcaa tctggcgtgg taatgaccgg 4080
aatacgggtga ccttcggtca tcccttcctc gtgtgaaggc ccctcccctc aacagggagg 4140
ggccttcaca tatctgcccc tgttgcaacg cgcggtgaaa ctctacgatg agcgaattct 4200
tcccgcacaca tcgagcacgc taaggagatg acatgacgat atcggcacgg ttgtggcggc 4260
tgcacctgca tatctttgtg ttgctcaaga tctgtgagat gacactggca gcacgcctcc 4320
agcgcgccgc cggacacgcg caccctcatc accgaatgga cgggggacca tatcatgacg 4380
actctgatcg ccaat 4395

```

```

<210> 2
<211> 738
<212> PRT
<213> Bifidobacterium bifidum

```

```

<220>
<221> Beta-galactosidase
<222> (1)..(738)

```

```

<400> 2

```

```

Met Tyr Met Ile Trp Arg Asp Ala His Arg Val Arg Cys Gly Leu Ala
1           5           10           15

```

```

Arg Tyr Gly Thr Ser Pro His Arg Met Ser Gln Leu Ile Phe Arg Arg
20           25           30

```

```

Cys Asp Gly Ser Ala Gly Ala Ser Asp Asn Glu Gln Val Met Glu Arg
35           40           45

```

```

Asn Met Ser Lys Arg Arg Lys His Ser Trp Pro Gln Pro Leu Lys Gly
50           55           60

```

```

Ala Glu Ser Arg Leu Trp Tyr Gly Gly Asp Tyr Asn Pro Asp Gln Trp

```

65		70		75		80
Pro	Glu	Glu	Val	Trp	Asp	Asp
			85	Asp	Ile	Arg
				90	Leu	Met
					Lys	Lys
					Ala	Gly
					95	
Val	Asn	Leu	Val	Ser	Val	Gly
		100				Ile
						110
						Glu
						Pro
Glu	Glu	Gly	Lys	Tyr	Asp	Phe
		115				Asp
						120
						Trp
						Leu
						Asp
						Arg
						Ala
						125
						Ile
						Asp
						Lys
Leu	Gly	Lys	Ala	Gly	Ile	Ala
	130					Val
						Asp
						Leu
						Ala
						Ser
						140
						Ala
						Thr
						Ala
						Ser
Pro	Pro	Met	Trp	Leu	Thr	Gln
						Ala
						His
						Pro
						Glu
						Val
						Leu
						Trp
						Lys
						Asp
						160
Glu	Arg	Gly	Asp	Thr	Val	Trp
						Pro
						Gly
						Ala
						Arg
						Glu
						His
						Trp
						Arg
						175
						Pro
Thr	Ser	Pro	Val	Phe	Arg	Glu
						Tyr
						Ala
						185
						Leu
						Asn
						Leu
						Cys
						Arg
						190
						Arg
						Met
Ala	Glu	His	Tyr	Lys	Gly	Asn
						Pro
						Tyr
						Val
						Val
						Ala
						Trp
						205
						His
						Val
						Ser
Asn	Glu	Tyr	Gly	Cys	His	Asn
						Arg
						Phe
						Asp
						Tyr
						Ser
						220
						Asp
						Asp
						Ala
						Met
Arg	Ala	Phe	Gln	Lys	Trp	Cys
						Lys
						Lys
						Arg
						Tyr
						235
						Lys
						Thr
						Ile
						Asp
						Ala
						240
Val	Asn	Glu	Ala	Trp	Gly	Thr
						Ala
						Phe
						Trp
						250
						Ala
						Gln
						His
						Met
						Asn
						255
						Asp
Phe	Ser	Glu	Ile	Ile	Pro	Pro
						Arg
						Tyr
						265
						Ile
						Gly
						Asp
						Gly
						Asn
						270
						Phe
						Met
Asn	Pro	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp
						Tyr
						280
						Lys
						Arg
						Phe
						Ser
						Ser
						285
						Asp
						Ala
						Leu
Lys	Glu	Leu	Tyr	Ile	Ala	Glu
						Arg
						Asp
						Val
						Leu
						Glu
						290
						Ser
						Ile
						Thr
						Pro
Gly	Leu	Pro	Leu	Thr	Thr	Asn
						Phe
						Met
						Val
						Ser
						315
						Ala
						Gly
						Gly
						Ser
						Met
						320
Leu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Trp	Gly
						Ala
						Glu
						Val
						330
						Asp
						Phe
						Val
						Ser
						Asn
						335
						Asp
His	Tyr	Phe	Thr	Pro	Gly	Glu
						Asp
						His
						Phe
						Asp
						Glu
						Val
						Ala
						Tyr
						Ala

610					615					620					
Glu 625	Arg	Trp	Thr	Gly	Met 630	Asn	Glu	Val	Pro	Ala 635	Ile	Val	Ala	Asn	Gly 640
Tyr	Gly	Asp	Gly	Arg 645	Thr	Val	Tyr	Val	Gly 650	Cys	Arg	Leu	Gly	Arg 655	Gln
Gly	Leu	Ala	Lys 660	Ser	Leu	Pro	Ala	Met 665	Leu	Gly	Ser	Met	Gly 670	Leu	Ser
Asp	Leu	Ala 675	Gly	Asp	Gly	Arg	Val 680	Leu	Arg	Val	Glu	Arg 685	Ala	Asp	Ala
Ala 690	Ala	Ala	Ser	Arg	Phe	Glu 695	Phe	Val	Phe	Asn	Arg 700	Thr	His	Glu	Pro
Val 705	Thr	Val	Asp	Val	Glu 710	Gly	Glu	Ala	Ile	Ala 715	Ala	Ser	Leu	Ala	His 720
Val	Asp	Asp	Gly	Arg 725	Ala	Thr	Ile	Asp	Pro 730	Thr	Gly	Val	Val	Val 735	Leu
Arg Arg															

REIVINDICAÇÕES

1. Seqüência de DNA, **CARACTERIZADA** pelo fato de
 - a) codificar uma proteína com uma seqüência de aminoácidos conforme fornecido na SEQ. ID. NO: 2, ou
 - 5 b) hibridizar sob condições rigorosas de hibridização para a seqüência de a), ou
 - c) é um degenerativo da seqüência de a) ou b).
2. Seqüência de DNA, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato da seqüência ser fornecida na SEQ. ID. NO: 1 ou um seu fragmento.
3. Seqüência de DNA, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2,
10 **CARACTERIZADA** pelo fato da citada seqüência compreender substituições, adições ou deleções de nucleotídeo que resultam em menos do que 60% de mudança, preferivelmente menos do que 45% de mudança, mais preferivelmente menos do que 25% de mudança na seqüência de aminoácidos, de acordo com a SEQ. ID NO: 2 ou um seu fragmento.
4. Seqüência de DNA, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2,
15 **CARACTERIZADA** pelo fato da citada seqüência compreender substituições de nucleotídeo, que resultam nas substituições conservadoras de aminoácido.
5. Uma enzima, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser codificada por uma seqüência de DNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4.
6. Uma enzima, **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender uma seqüência de
20 aminoácidos, de acordo com a SEQ. ID NO: 2 ou um seu fragmento.
7. Uma β -galactosidase, **CARACTERIZADA** pelo fato de possuir uma seqüência conforme definido na SEQ. ID NO: 2.
8. Um vetor recombinante, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender uma seqüência de DNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4.
- 25 9. O vetor, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato do citado vetor ser um vetor de expressão.
10. Uma célula de hospedeiro, **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender uma seqüência de DNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4.
11. Uma célula de hospedeiro, **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender o ve-
30 tor, de acordo com qualquer a reivindicação 8 ou reivindicação 9.
12. Uma célula de hospedeiro, de acordo com a reivindicação 10 ou reivindicação 11, **CARACTERIZADA** pelo fato da citada célula ser uma célula bacteriana, uma célula de levedura ou uma célula de fungo.
13. Uma célula de hospedeiro, de acordo com a reivindicação 12,
35 **CARACTERIZADA** pelo fato da citada célula ser selecionada do grupo que consiste de Bifidobacterium, Lactococcus, Lactobacillus, Escherichia, Bacillus e Aspergillus.
14. Uma célula de hospedeiro, de acordo com a reivindicação 13,

CARACTERIZADA pelo fato da célula ser selecionada do grupo que consiste de *Bifidobacterium bifidum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans* e *Aspergillus niger*.

15. Uso de uma enzima, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 5 a 7, ou uma célula de qualquer uma das reivindicações de 10 a 14, **CARACTERIZADA** pelo fato de produzir uma mistura de oligossacarídeos.

16. Uso de uma enzima, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 5 a 7, ou uma célula de qualquer uma das reivindicações de 10 a 14, **CARACTERIZADA** pelo fato de produzir uma mistura de oligossacarídeos para ser parte de um produto selecionado do grupo que consiste de produtos laticínios, tais como leite líquido, leite em pó, tal como leite em pó integral, leite em pó desnatado, leite em pó semi-desnatado, pós a base de soro, leites para bebês, fórmulas para bebês, sorvetes, iogurte, queijo, produtos laticínios fermentados, bebidas, tais como suco de fruta, alimentos infantis, cereais, pães, biscoitos, doces, bolos, suplementos alimentares, produtos dietéticos, produtos comestíveis probióticos, produtos comestíveis prebióticos, ração animal, ração para aves domésticas e medicamentos.

17. Uso de uma célula de hospedeiro, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 10 a 14, **CARACTERIZADA** pelo fato de produzir um produto selecionado do grupo que consiste de produtos laticínios, tais como leite líquido, leite em pó, tal como leite em pó integral, leite em pó desnatado, leite em pó semi-desnatado, pós a base de soro, leites para bebês, fórmulas para bebês, sorvetes, iogurte, queijo, produtos laticínios fermentados, bebidas, tais como suco de fruta, alimentos infantis, cereais, pães, biscoitos, doces, bolos, suplementos alimentares, produtos dietéticos, produtos comestíveis probióticos, produtos comestíveis prebióticos, ração animal, ração para aves domésticas e medicamentos.

18. Processo para produção de uma enzima, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 5 a 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender a cultura de uma célula de hospedeiro, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 10 a 14, em um meio de cultura adequado sob condições que permitem a expressão da citada enzima e recuperação da enzima resultante da cultura.

Figura 1

1 tcccttagat tggattgaaa acttcctttt ttatgtaaa aggatattcg gggaaattcc
 61 cttttgaaa atttcatgac caaaaatccc ctaacgtga gtttcgttc cactgagcgt
 121 cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttagatcc tttttctg cgcgtaatct
 181 gctgcttgca aacaaaaaaa cccccgtac cagcgggtgt ttgttgccg gatcaagagc
 241 taccaactct tttcgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc
 301 ttctagtga gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc ttagcaccg cctacatacc
 361 tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg
 421 ggttggaactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt
 481 cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg
 541 agctatgaga aagcgccacg ctcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagg
 601 gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttcagg gggaacgcc tggatcttt
 661 atagtctgt cgggtttcgc cactctgac ttgagcgtcg attttgtga tgcctcgcag
 721 gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacgggtc ctggccttt
 781 gctggcctt tctcacatg ttcttctg cgtatcccc tgattctgtg gataaccgta
 841 ttaccgctt tgagtgaact gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt
 901 cagtgcgca ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaac gcctctccc gcgcgttggc
 961 cgattcatta atgcaggta acctggctta tcgaaataa tacgactcac tatagggaga
 1021 ccggcagatc tgatcatc gatgaattcg agctcggtac ccggggatcc ttagagtcg
 1081 acctgcagaa gtactggcag tccggcctcg ccgccggcgc cgtcaaggag tgatctcgc
 1141 ggagggccag tgcgcgttg cagcatggt cagttcgtc tgacggtctt gacgtgcgc
 1201 tagcggctgg ccctccctac ggaacatga tatgatattg agggacgctc accgtgtgcg
 1261 atcggggtg gcgcgatatg gcaccagccc gcatcgatg tcacagtga ttttcgtc
 1321 atgcgacggt tcggccgggg cgtcagacaa tgaacaagta atggagcggg atatgagtaa
 1381 acgcagaaag cacagttggc cgcagcgcgt gaaggcgccc gaatccctc tctggtatgg
 1441 cgggtattac aatcccgacc aatggccgga ggaggtctgg gacgatgata tccgtctgat
 1501 gaagaaggcc ggcgtcaacc ttgtatcagt cggcatcttc tcatgggcga agatcgagcc
 1561 ggaggaaggc aagtacgatt tcgactggct ggaccgtgcc atcgataagc tcggcaaggc
 1621 gggcctcgt gtagacctg cctccgccac cgcctcccc cgatgtggc tgaccaggc
 1681 ccatccggag gtgctgtgga aggacgagcg cggcgacacc gtgtggccgg gtgccgtga
 1741 gcattggcgt ccgacgagcc ctgtgtccg cgagtacgc ctgaacctgt gccgtctat
 1801 ggccgagcac tataagggca acccatcgt ggtggcctgg cagtgagca acgaatcgg
 1861 ctgccacaac cgttcgact actcggacga cgcctcgc gcctccaga agtggtgcaa
 1921 gaagcgctac aagaccatcg acgcggtgaa cgaggcctgg ggaacagcgt tctgggccc
 1981 gcacatgaac gattctccg agatcatcc gcctcgtac atcggtgacg gcaacttcat
 2041 gaacccgggc aagctgctc actacaagcg gttcagctcc gacgcgtca aggagctcta
 2101 catcgccgaa cgtgacgtc tggagtccat cagccgggt ctgccgtga ccaccaattt
 2161 catggtgtct gccggcggct cgatgctga ctatgacgac tggggtgcgg aggtcgattt
 2221 cgtctccaac gaccactact tcacccggg cgaggacct ttcgacgagg ttgcgtacgc
 2281 cgcgtcgtg atggacggca ttacgcaa ggaaccgtgg ttccagatgg agcattccac
 2341 ctcccggtg aattggcgtc cgatcaacta ccgtcgggag ccgggctcgg tctgcgcga
 2401 ctccctcgc caggtcgtc tgggcgccga tgccatctgc tatttcagt ggcgacagt
 2461 caaggccggc gcggagaagt ggactcctc gatggtgccg catcgggcg aggattcgca
 2521 gatcttccgt gatgtgtgc agctgggcgc cgatctggga cgtctgtcc acgagggtct

Figura 1 (Continuação)

2581 gatgggcacc aagacgggtca agtccaagggt cgccgtcgtg ttogactacg agtcccagtg
 2641 ggccaccgag tacaccgga acccgaccca gcaggtcgat cattggaccg agccgttggg
 2701 ttggttccgc gcgcttgccg acaacggcat caccgccgac gtggttccgg tgcggtccga
 2761 ttgggattcc tacgagattg ccgtgctgcc gtgcgtgtat ttgctgtccg aagagacgag
 2821 ccgcaggggt cgggagttcg tggcgaacgg cggcaagtig ttctgtacgt actacaccgg
 2881 attgagcgac gagaacgacc acatctggct tggcggctac ccgggctcga ttctgtacgt
 2941 cgtcggcgtg cgcgtcgaag agttcgcccc gatgggcaac gacatgccgg gcgcattgga
 3001 tcacctcgac ctggacaatg gcacggtggc gcatgacttt gccgacgtga tcacgtccac
 3061 ggccgacacg tccacggtac tggcctccta taaggcggaa cgctggaccg gcatgaacga
 3121 ggtgccggcc atcgtggcca acgggtatgg cgacgggagg accgtatatg tcggatgccg
 3181 tctgggcccgt caggggcttg cgaagagcct gccggcgatg ctgggttcca tggggctgtc
 3241 ggacctcgcc ggtgatggcc gcgtgctgcg tgcgaacgc gccgacggc cggcggcgag
 3301 ccgcttcgag ttctgttca accgcacca tgaaccgggt accgtcgacg ttgaagggga
 3361 ggccatcgcg gcttcgctcg cgcattcga cgacgggagg gccaccatcg atccgacggg
 3421 tgttgcgtg ctcaggcgat aatcgttga aacctgggc tgaagggct taggaaaggc
 3481 gtatgttgc ggtgacacgc gacataccc ttatgggaaa gaaggcgtg gcgcttaccg
 3541 ggctgcccgc atgtgtgtca gcgtcgtgc gtgcggcaac tcaagcagca gctccgtcc
 3601 gaagcaggaa ggcgacgtca aggaaatcac cgtgtgggtt tggggcctac gctgactcag
 3661 gtggccaagg actcaaaaa aggagaccgg catcaatgtc aacctggtga acaccggcca
 3721 gggcgacaag acctgggacg agttctatca ggacgccaag aagattcaca ccttggcga
 3781 caactactac atcacgtccg acaccggtgt cgcgggttc tacgactcga tgacctggt
 3841 ggccagtgcg acgctgttct ccaccgaagg cgagacggtc accattaacc tgactggcgc
 3901 cccgaaggtc aaggcccgcg gtatcttcgg cgactacctt ggcaagtctt acaccggcaa
 3961 ccagaagctg agcgatggcg tcgccgttt gggaacaggc tctgaaggac tacgcgaagg
 4021 atcagggcta caccgtcaag taaccttcgc agtcaagcaa tctggcgtgg taatgaccg
 4081 aatacggta ccttcggta tcccttcctc gtgtgaaggc cctccctc aacagggagg
 4141 ggcttcaca tatctgccc tgttgaacg cgcgtgtaaa ctctacgat agcgaattct
 4201 tccgacaca tcgagcacgc taaggagatg acatgacgat atcggcacgg ttgtggcggc
 4261 tgcacctga tatcttgtg ttgtcaaga tctgtgagat gacctggca gcacgcctcc
 4321 agcgcggcgc cggacacgc caccctcatc accgaatgga cgggggacca tatcatgacg
 4381 actctgatcg ccaat

Figura 2

MYMIWRDAHRVRCGLARYGTSPHRMSQLIFRRCDGSAGASDNEQVMERNMSK
RRKHSWPQPLKGAESRLWYGGDYNPDQWPEEVWDDDIRLMKKAGVNLVSV
GIFSWAKIEPEEGKYDFDWLDRAIDKLKGAGIAVDLASATASPPMWLTQAH
EVLWKDERGDTVWPGAREHWRPTSPVFREYALNLCRRMAEHYKGNPYVVAWH
VSNEYGCHNRFDYSDDAMRAFAQWCKKRYKTIDAVNEAWGTAFWAQHMNDFS
EIIPPRYIGDGNFMNPGKLLDYKRFSSDALKELYIAERDVLESITPGLPLTT
NFMVSAGGSMLDYDDWGAEVDFVSNDHYFTPGEDHFDEVAYAASLMDGISRK
EPWFQMEHSTS AVNWRP INYRAEPGSVVRDSL AQVAMGADAICYFQWRQSKA
GAEKWHSSMVP HAGEDS QIFRDVCELGADLGRLSDEGLMGT KTVKSKVAVVF
DYESQWATEYTANPTQQVDHWTEPLDWFRALADNGITADVVPVRSDWDSYEI
AVLPCVYLLSEETSRRVREFVANGGKLFVTTYTGLS DENDHIWLG GYPGSIR
DVVGVRVEEFAPMGNDMPGALDHLDDLNGTVAHDFADVITSTADTSTVLASY
KAERWTGMNEVPAIVANGYGDGRTVYVGCRLGRQGLAKSLPAMLGSMGLSDL
AGDGRVLRVERADAAAASRFEFVFNRTHEPVTVDVEGEAIAASLAHVDDGRA
TIDPTGVVVLRR

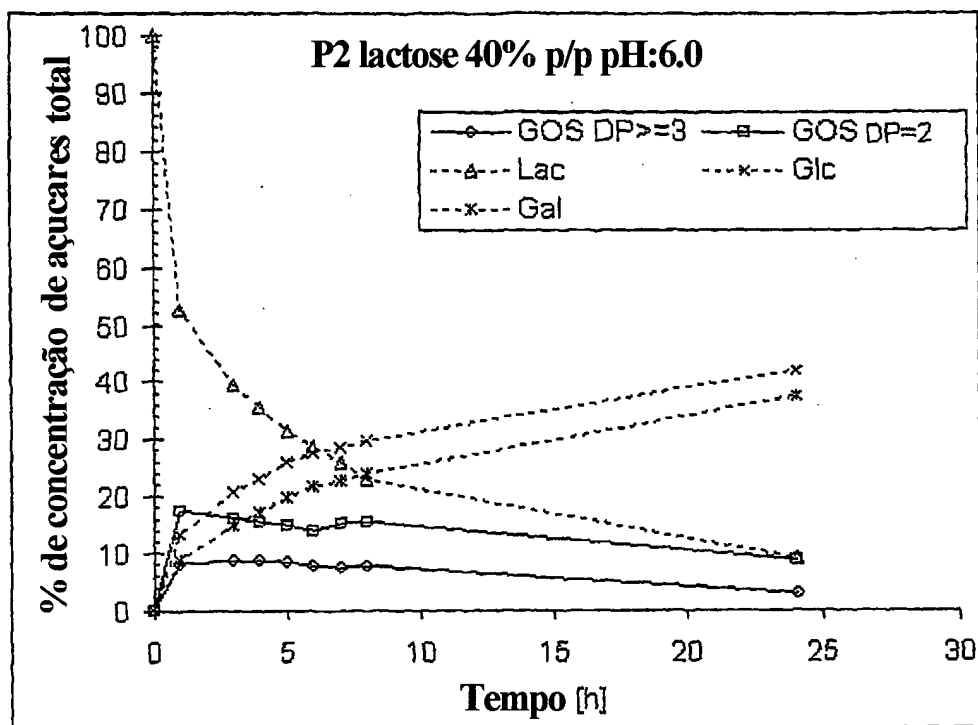
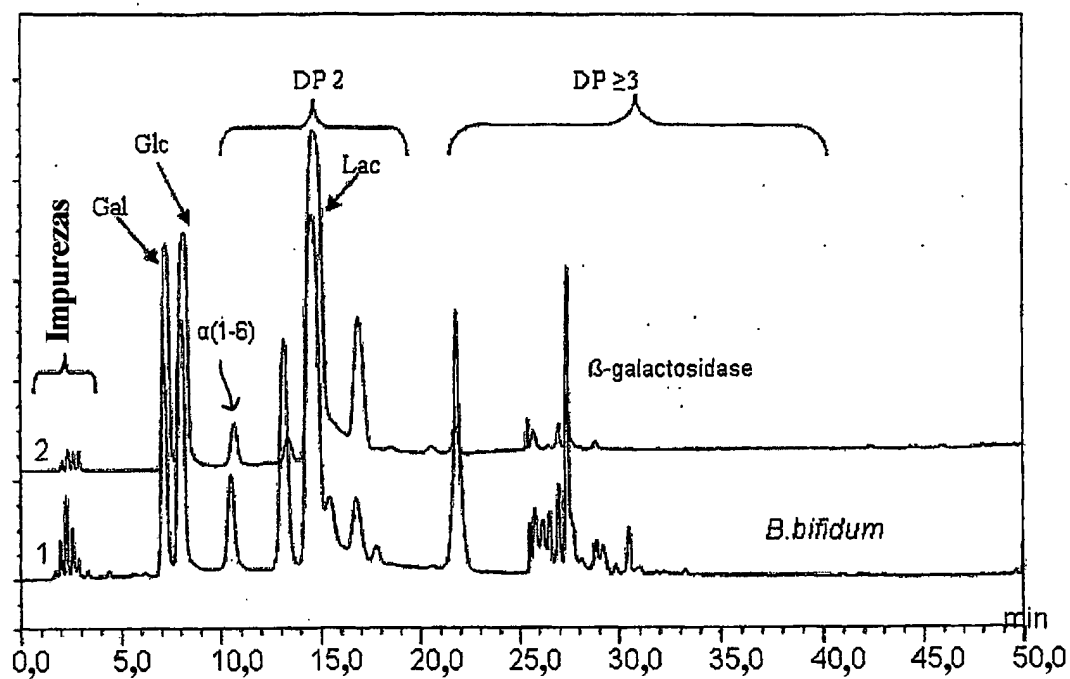


Figura 3

**Figura 4**

RESUMO**"BETA-GALACTOSIDASE COM ATIVIDADE TRANSGALACTOSILANTE"**

5 A presente invenção está relacionada com um nova β -galactosidase com atividade transgalactosilante, isolada do microorganismo *Bifidobacterium bifidum*. A β -galactosidase é capaz de converter a lactose em uma mistura de galactooligossacarídeos que são β -ligados e indesejavelmente produz a dissacarídeo galactobiose α -ligada. A mistura pode ser incorporada em numerosos produtos alimentícios e rações animais para a melhora da saúde intestinal, promovendo o crescimento de bifidobactéria no intestino, e reprimindo o crescimento da microflora patogênica.