

apropriado quando a estabilidade microbiana é necessária, porém sem o surgimento de sabores amanteigados (acetoina, diacetila), decorrentes do metabolismo secundário das bactérias do ácido láctico, como ocorre com frequência nos vinhos brancos. A linhagem de levedura ML01 também pode ser usada nos casos em que é necessário estabilizar o vinho o quanto antes, já que a estabilidade microbiana da bebida é intensificada logo que a fermentação maloláctica é completada, por meio da remoção do L-malato. Além disso, quanto antes terminar a fermentação maloláctica, mais cedo o vinho poderá ser sulfitado e engarrafado, com baixo risco de contaminação bacteriana (FDA-GRN 120).

IV. ENZIMAS E PROTEÍNAS COMERCIAIS, ORIUNDAS DE MICRO-ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS, DESTINADAS À INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

Enzimas são muito utilizadas no processamento de alimentos e na produção de ingredientes alimentares. Por tradição, isolam-se enzimas intrínsecas de micro-organismos cultiváveis, plantas e tecidos de mamíferos. Por isso, a produção e o isolamento dessas enzimas podem ser tarefas desafiadoras e as fontes disponíveis, limitadas. Além disso, muitas vezes, as enzimas são obtidas de micro-organismos não facilmente cultiváveis sob as condições industriais, ou que produzem subprodutos tóxicos. Por meio da seleção criteriosa dos micro-organismos hospedeiros, é possível a construção de linhagens recombinantes que possibilitam a produção eficiente de enzimas substancialmente livres de subprodutos ou outros metabólitos microbianos indesejáveis. Um número cada vez maior de enzimas é produzido com o uso de sistemas heterólogos de expressão, nos quais a tecnologia transgênica é empregada para criar transgenes por engenharia genética e introduzi-los em linhagens microbianas hospedeiras, que podem ser geneticamente modificadas para otimizar o processo biotecnológico. Por exemplo, várias linhagens de micro-organismos desenvolvidos recentemente para a produção de enzimas foram modificadas por engenharia genética para aumentar a produtividade de enzimas, por meio da deleção dos genes originais que codificam proteases extracelulares. Além disso, algumas linhagens de fungos foram modificadas para reduzir ou eliminar o potencial natural para a produção de metabólitos secundários tóxicos (Olempska-Beer *et al.*, 2006).

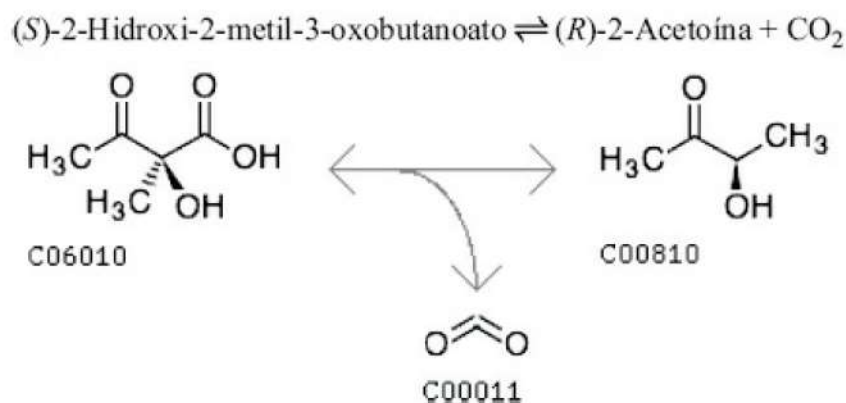
As enzimas originais, muitas vezes, não estão bem adaptadas para as condições encontradas na moderna produção de alimentos. A crescente sofisticação do processamento de alimentos cria uma demanda para uma ampla variedade de enzimas que tenham características compatíveis com as condições atuais. Assim, com o auxílio da engenharia genética, realizam-se mudanças no DNA que alteram as sequências de aminoácidos. Dessa forma, criam-se especificamente enzimas com propriedades melhoradas para uso em processos industriais. Por exemplo, adoçantes utilizados com frequência, como o xarope de glicose ou frutose, em geral são produzidos a partir do amido de milho, com o uso de enzimas hidrolíticas. Na primeira etapa da hidrólise do amido, este é liquefeito com α -amilase por aquecimento a 105°C, durante 2-5 minutos, seguido de aquecimento a 90°C -100°C, por 1-2 horas. Com o uso da engenharia genética, criaram-se α -amilases com maior estabilidade ao calor e maior compatibilidade com os outros parâmetros do processo de liquefação (Olempska-Beer *et al.*, 2006).

Os parágrafos apresentados a seguir enfocam as propriedades bioquímicas, bem como a origem e as modificações genéticas das enzimas recombinantes produzidas por MGMs, que são utilizados na atual produção de alimentos (Tabela 13.4). Não serão discutidas as características relacionadas com a segurança alimentar. A avaliação da segurança das enzimas para processamento alimentar, oriundas de micro-organismos recombinantes, já foi discutida extensamente na literatura (Jonas *et al.*, 1996; Pariza e Johnson, 2001) e em documentos de orientação emitidos por órgãos reguladores e organizações internacionais; por exemplo, pelo Comitê Científico para Alimentos (SCF, 1992) ou no documento de orientação da EFSA sobre a avaliação dos riscos dos produtos derivados de MGMs (EFSA, 2011). Em princípio, as considerações relativas à segurança são aplicáveis às enzimas provenientes de micro-organismos originais e recombinantes. O componente-chave da avaliação da segurança das enzimas é a análise da segurança da linhagem produtora; em especial, de seu potencial patogênico e toxigênico

(Pariza e Johnson, 2001). Embora não se utilizem intencionalmente micro-organismos patogênicos ou toxigênicos na produção de enzimas para o processamento de alimentos, constatou-se que certos fungos – empregados, por costume, como fontes de enzimas – produzem baixos teores de metabólitos secundários tóxicos, em condições fermentativas propícias para a síntese desses compostos. Alguns desses micro-organismos são utilizados, atualmente, como fonte de enzimas recombinantes (Olempska-Beer *et al.*, 2006).

A. Acetolactato descarboxilase

A acetolactato descarboxilase (EC 4.1.1.5) diminui o aroma indesejável de manteiga de diacetila, que ocorre como um subproduto da fabricação da cerveja, pela conversão de diacetila (acetolactato) em acetoína de sabor neutro (KEGG R02948):



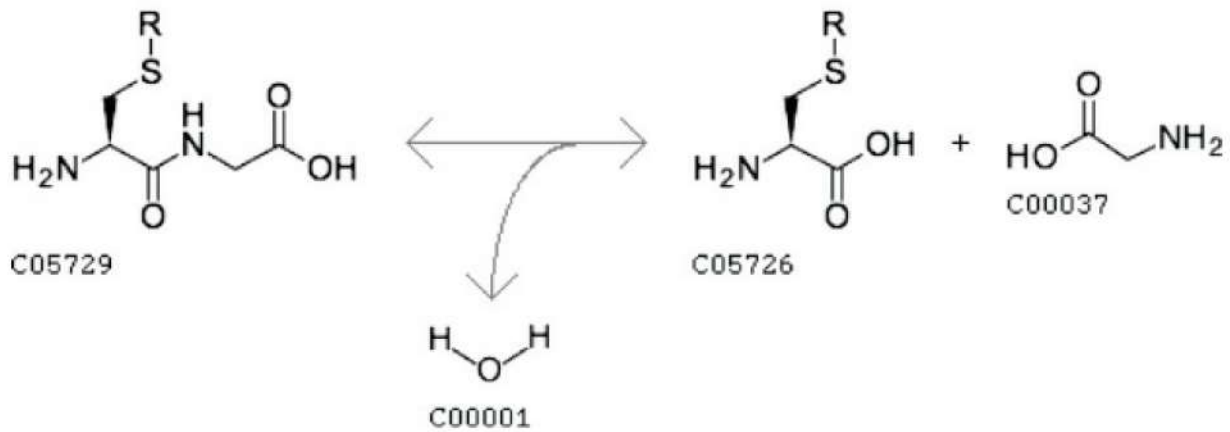
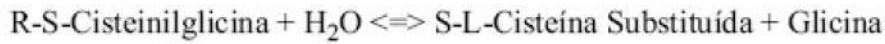
Durante o armazenamento da cerveja, o aroma de diacetila é lentamente convertido em um aroma neutro. A fim de encurtar o tempo de conversão, a diacetila é eliminada, por meio da adição de acetolactato descarboxilase.

Atualmente, a acetolactato descarboxilase transgênica é oriunda de uma linhagem modificada de *Bacillus subtilis* que contém o gene não modificado, que codifica a a-acetolactato descarboxilase do *Bacillus brevis* (21 CFR 173.115).

Até hoje, há dois tipos de acetolactato descarboxilase produzidos com biotecnologia sendo comercializados, na Europa, produzidos com o auxílio da levedura para cerveja *S. cerevisiae* GM. Nos Estados Unidos, é permitido o uso em alimentos para consumo humano de uma preparação enzimática derivada de uma linhagem modificada do *B. subtilis*, a qual contém o gene que codifica a a-acetolactato descarboxilase, oriunda de *B. brevis* (21 CFR 173.115).

B. Aminopeptidase

As aminopeptidases (EC 3.4.11) são enzimas produzidas e secretadas por glândulas do intestino delgado, no qual participam da digestão de proteínas; essas enzimas estão amplamente distribuídas por todo o reino animal e também são encontradas em todos os micro-organismos (banco de dados da KEGG). Uma aminopeptidase cliva um único aminoácido da extremidade N-terminal de uma proteína ou peptídeo. Por exemplo, a aminopeptidase EC 3.4.11.1 consegue mediar a clivagem de uma glicina N-terminal (KEGG R04951):



Essas clivagens alteram os sabores das proteínas de uma matriz alimentar. Por isso, as aminopeptidases são utilizadas na produção de queijos, bebidas, aromatizantes, carnes e produtos à base de leite, com o objetivo de intensificar e otimizar o aroma e o sabor. A adição de aminopeptidases é capaz de acelerar a maturação do queijo. Elas também são utilizadas nas rações, para melhorar o uso das proteínas na alimentação de leitões e aves. A clivagem de uma glicina N-terminal foi descrita na reação anterior, como um exemplo de mecanismo das aminopeptidases.

Diversas aminopeptidases são produzidas por biotecnologia, com o uso de diversas culturas de fungos e bactérias (como *Aspergillus*, *Lactococcus* e *Trichoderma*). Entre as peptidases recombinantes produzidas estão a aminopeptidase (PepN), oriunda das linhagens *Lactobacillus rhamnosus* S93, *Lactococcus lactis* (FDA 21CFR184.1985) e *Aspergillus sojae* (Patente europeia 0967286).

C. Amilases

As amilases são enzimas amilolíticas que hidrolisam amido em açúcares e são encontradas em todo o reino animal, vegetal e em micro-organismos (OrthoDB EC 3.2.1). Existem várias amilases que clivam com muita especificidade as ramificações das moléculas de amido. Dependendo do tipo de amilase, os compostos resultantes podem ser açúcares simples, como a glicose, açúcares compostos, como a maltose, ou formas especiais de amido, como as dextrinas. Todas as amilases são glicosídeo hidrolases que agem sobre as ligações α -(1,4) e/ou α -(1,6) dos polímeros de amido (Goesaert *et al.*, 2009). A Figura 13.13 traz uma visão geral dos modos de ação das enzimas amilolíticas.

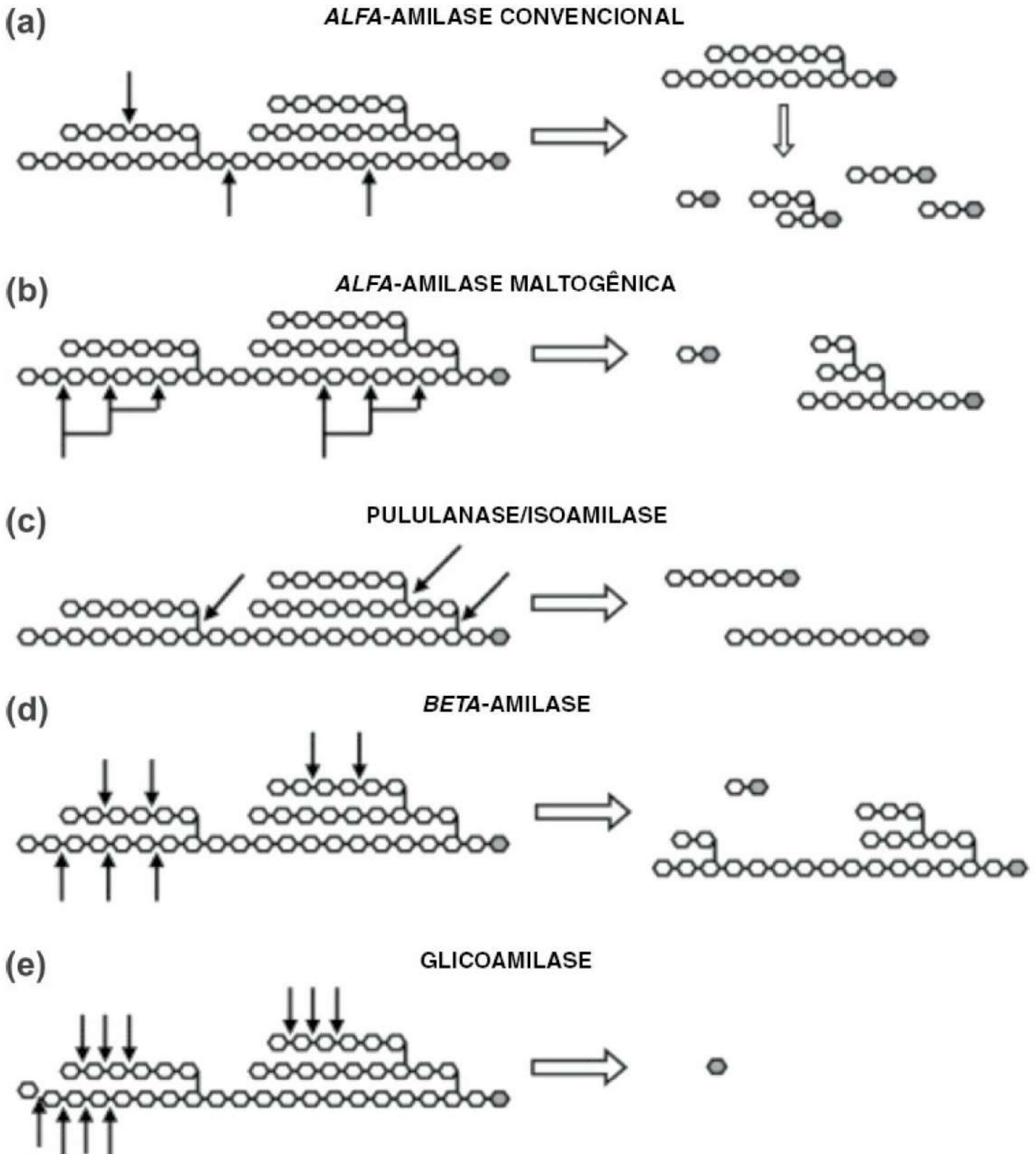


FIGURA 13.13 Representação esquemática da ação de diferentes enzimas amilolíticas sobre amido e derivados. A estrutura em anel de cor cinza representa um resíduo de glicose redutor, sendo: (a) Ação do tipo endo da α -amilase, que produz dextrinas lineares e ramificadas de baixa massa molecular; (b) Ação, sobretudo, do tipo exo da α -amilase maltogênica, que produz principalmente maltose; (c) Ação da enzima desramificante, que produz dextrinas lineares; (d) Ação apenas do tipo exo da β -amilase, que produz maltose e dextrinas β -limite; (e) Ação apenas do tipo exo da glucoamilase, que produz glicose. Extraído de Goesaert *et al.* (2009).

As amilases são utilizadas na indústria do processamento de alimentos, principalmente para modificar as matérias-primas que contêm amido. Sua área de aplicação mais importante é a produção de açúcares, a partir do amido (xarope de glicose, xarope de frutose), que depois se tornam ingredientes de uma ampla variedade de

produtos alimentícios, como doces, produtos de panificação, sorvetes e molhos de tomate ketchup. As amilases estão naturalmente presentes em muitas matérias-primas, como cereais e leveduras. No entanto, essa forma de amilase costuma ser insuficiente ou tem um efeito muito lento. Por isso, é comum a adição de amilases produzidas industrialmente, para conduzir ou acelerar a degradação do amido. Essas preparações contêm uma mistura de vários tipos de amilase (GMO Compass).

As amilases são utilizadas rotineiramente na padronização da farinha empregada na fabricação de bolos e pães, e também como agente antienvelhecimento. Na farinha de trigo intacta, as α -amilases estão praticamente ausentes, enquanto as β -amilases estão presentes em abundância, embora tenham pouca ou nenhuma atividade sobre os grânulos de amido intactos, e não danificados, e sejam inativadas antes da gelatinização do amido. Por essa razão, a atividade das amilases na farinha de trigo é, muitas vezes, otimizada, por meio da adição de α -amilases fúngicas. As amilases adicionadas aumentam o teor de açúcares redutores e fermentáveis na farinha e na massa do pão, estimulando a fermentação pela levedura e a formação de produtos da reação de Maillard; esses produtos, por sua vez, intensificam o sabor e a cor da crosta do pão. No entanto, a funcionalidade da amilase também pode ser relacionada com a redução da viscosidade da massa do pão durante a gelatinização do amido, prolongando o crescimento no forno e resultando em um pão com volume maior. Algumas amilases podem retardar o endurecimento do miolo do pão e, dessa forma, agir como agente antienvelhecimento. Os mecanismos ou modos de ação possíveis, por meio dos quais essas enzimas retardam o processo de endurecimento/envelhecimento, são discutidos mais adiante. Os produtos típicos antienvelhecimento de pães que contêm amilases consistem, em sua maioria, de α -amilases bacterianas ou fúngicas com termoestabilidade intermediária (Goesaert *et al.*, 2009).

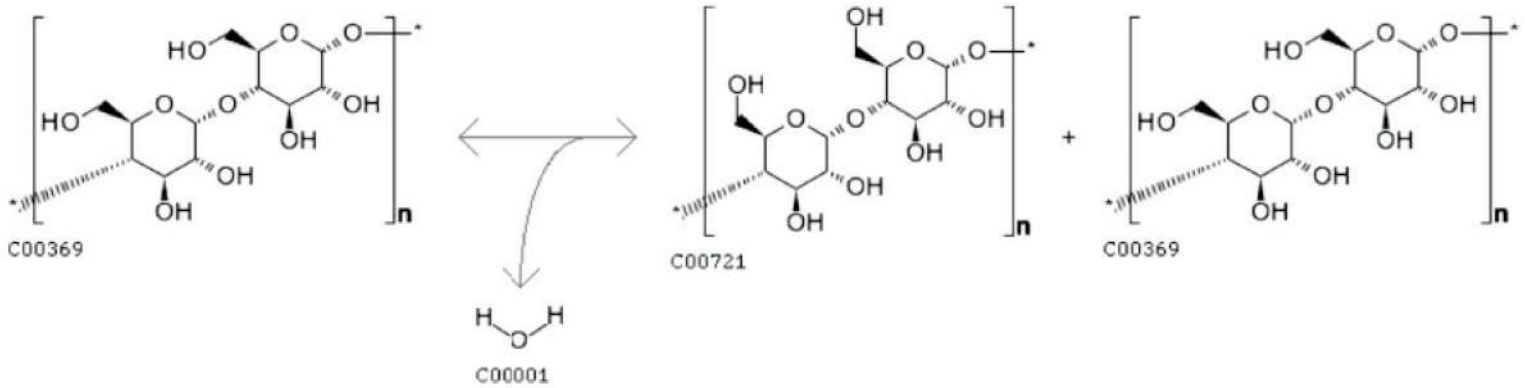
Durante a produção de bebidas alcoólicas fermentadas, o amido das matérias-primas precisa ser hidrolisado em moléculas menores de açúcar, para permitir que a levedura transforme-as em álcool. As enzimas realizam esse processo em duas etapas: liquefação e sacarificação. Por costume, as enzimas são acrescentadas por meio da adição de malte, que está sendo cada vez mais substituído por preparos à base de enzimas, nas operações de destilação. Uma quantidade pequena de enzimas industriais é capaz de substituir quantidades significativas de malte.

Nos sucos de frutas, as amilases eliminam o sedimento que contém amido. Isso é de especial importância quando as frutas são colhidas verdes e armazenadas por períodos relativamente longos, em baixa temperatura. Sob essas condições, a polpa das frutas contém amido em quantidade suficiente para causar turbidez ou gelatinizar, o que dificulta o processamento. A adição de enzimas amilolíticas neutraliza essas reações. Na forma de aditivos para rações, as amilases aumentam a hidrólise do amido e, dessa forma, contribuem para o melhor uso das rações à base de vegetais.

Há algum tempo, é possível produzir-se amilases com uma variedade de culturas de fungos e bactérias sem modificações genéticas. Em geral, as amilases bacterianas são mais estáveis em relação à temperatura que aquelas provenientes de culturas de fungos. Hoje, as amilases bacterianas são, sobretudo, produzidas com MGMs (vários tipos de *Bacillus*). Na produção de amilases com o uso de fungos, é mais frequente a adoção de culturas não consideradas geneticamente modificadas (GMO Compass).

1. α -Amilases

As α -amilases (EC 3.2.1.1) são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações internas α -1,4-glicosídicas de polissacarídeos, originando produtos com baixa massa molecular, como a glicose, a maltose e as unidades de maltotriose (de Souza e Magalhães, 2010). As α -amilases atuam de modo aleatório sobre o amido, o glicogênio e polissacarídeos ou oligossacarídeos relacionados; essa ação leva à liberação de grupos redutores com configuração a (KEGG R02108):



A letra “ α ” está relacionada com a configuração anomérica inicial do açúcar liberado, e não com a configuração da ligação hidrolisada. Diversos mutantes recombinantes produtores de α -amilase criados por engenharia genética para aplicações específicas são produzidos atualmente, utilizando-se *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Pseudomonas fluorescens* (Olempska-Beer *et al.*, 2006). O gene da α -amilase (*amyl*) do *B. licheniformis* normalmente é utilizado como transgene e modelo para modificações (FDA-GRN 79). Além disso, várias α -amilases termoestáveis são isoladas de micro-organismos termofílicos e expressas em linhagens com produção heteróloga. O tratamento do amido com a α -amilase pode ser seguido por um tratamento com outras enzimas adequadas, como a glicamilase, a pululanase e a glicose isomerase.

O Termamyl SC é uma preparação elaborada com a α -amilase termoestável de *Bacillus stearothermophilus*, produzida por *B. licheniformis* (GRASP 0G0363, FDA-GRN 24). A sequência do gene *amyS* da α -amilase do *B. stearothermophilus* foi modificada para aumentar a estabilidade da enzima em concentrações baixas de cálcio e pH baixo. A enzima modificada apresenta deleção de dois aminoácidos (posições 181 e 182) e uma substituição (posição 193), quando comparada à sequência do gene *amyS* original do *B. stearothermophilus*. O Termamyl SC pode ser utilizado na indústria, para a liquefação contínua do amido em temperaturas de até 105-110°C, na indústria do álcool, para liquefazer o amido dos mostos para destilação, na fabricação da cerveja, para liquefazer o amido adicionado ao mosto e na indústria do açúcar, para hidrolisar o amido do caldo de cana (FDA-GRASP 0G0363, FDA-GRN 24).

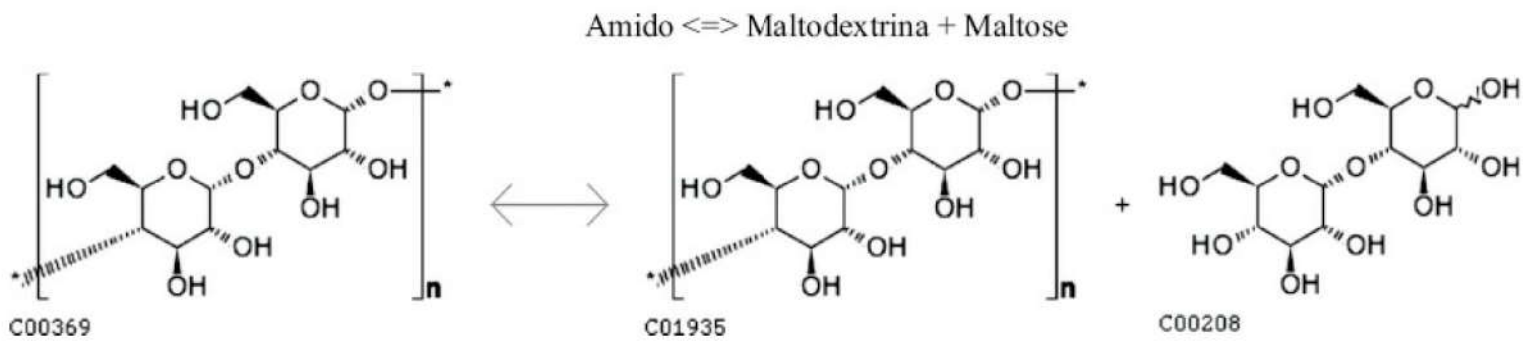
O Termamyl LC é uma preparação elaborada com a α -amilase termoestável de *B. licheniformis*, produzida por *B. licheniformis* geneticamente modificada (FDA-GRN 22). A sequência do gene *amyL* da α -amilase do *B. licheniformis* foi modificada para possibilitar a atuação da enzima em pH mais baixo e em teores de cálcio mais baixos que as α -amilases termoestáveis convencionais. O molde para a enzima do Termamyl LC foi o gene *amyS* da α -amilase de *B. licheniformis*, e esse gene foi utilizado na produção do Termamyl SC (FDA-GRASP 3G002612). A enzima do Termamyl LC foi construída por meio da união, na região N-terminal, da sequência da α -amilase do *B. amyloliquefaciens* e da alteração na sequência do DNA que codifica outros resíduos específicos de aminoácidos; as mudanças visaram o aumento da estabilidade da enzima em pH baixo, concentração baixa de cálcio e temperatura alta (FDA-GRN 22). As enzimas do Termamyl foram desenvolvidas a partir da sequência de nucleotídeos E01158 de um banco de genes, por meio de uma molécula intermediária, denominada M38570. As preparações enzimáticas são utilizadas na indústria alimentícia, como auxiliar na liquefação do amido para a produção de xarope, ou na indústria do álcool, para hidrolisar o amido dos mostos que seguem para a destilação.

Baseando-se na enzima do Termamyl LC, foi desenvolvida outra α -amilase modificada, denominada Novozym 28035. O objetivo foi obter uma enzima com uma estabilidade ainda maior em pH baixo, concentração baixa de cálcio e temperatura elevada. A enzima α -amilase do Novozym 28035 apresenta substituições em mais quatro aminoácidos, quando comparada à precursora, a α -amilase Termamyl LC, e suas aplicações são equivalentes (FDA-GRN 79).

Sequências do gene de linhagens de *Thermococcales archaeobacteria* foram utilizadas para obter a α -amilase BD5088 (FDA-GRN 126), uma enzima híbrida derivada de três α -amilases de linhagens selvagens arquea. A enzima hibridizada foi selecionada para comercialização por causa de sua estabilidade e atividade em pH baixo, temperatura alta e concentração de cálcio baixa. O alinhamento das sequências de aminoácidos das α -amilases termofílicas de linhagens arquea revelou uma homologia de pelo menos 85% com a α -amilase BD5088. A α -amilase BD5088 foi desenvolvida para ser utilizada na hidrólise do amido comestível, para a obtenção de produtos que resultam dessa hidrólise, entre eles xarope de glicose, xarope de milho com alto teor de frutose, glicose cristalina (dextrose) e etanol destilado para uso em alimentos e bebidas (FDA-GRN 126).

2. β -Amilases

As β -amilases (EC 3.2.1.2) ou amilases maltogênicas atuam na extremidade não redutora do amido, glicogênio, e polissacarídeos e oligossacarídeos relacionados, formando β -maltose (duas unidades de glicose) com inversão da configuração. A β -amilase é intrínseca a bactérias e plantas; durante o amadurecimento de uma fruta, a β -amilase quebra o amido em maltose, que deixa um sabor adocicado na fruta madura. A letra “ β ” está relacionada com a configuração anomérica inicial do açúcar livre liberado, e não à configuração da ligação hidrolisada (KEGG R02112):

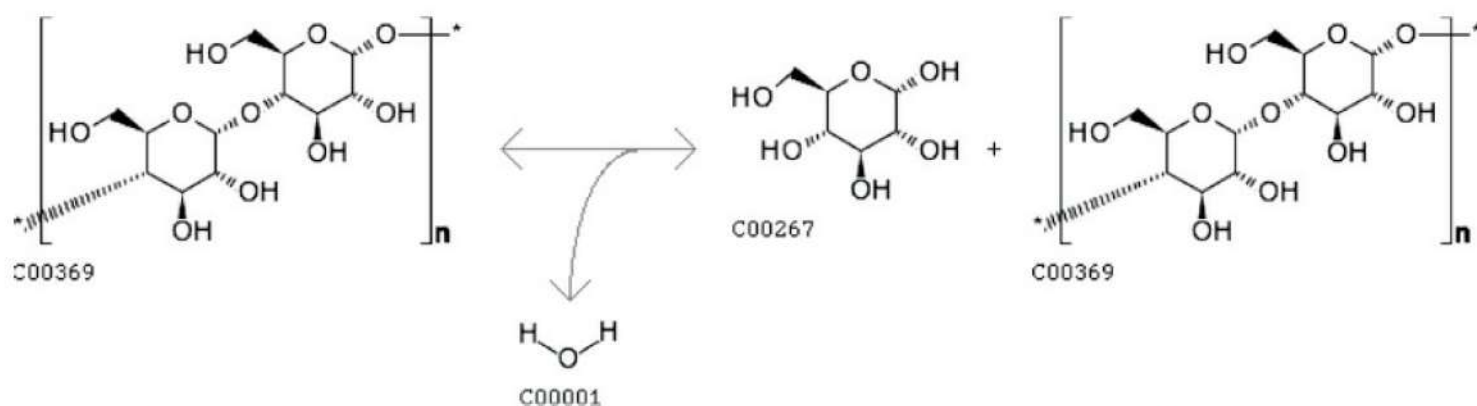


3. Amilase maltogênica

A amilase maltogênica (EC 3.2.1.133) é uma exoenzima que catalisa a hidrólise das ligações α -1,4-glicosídicas da amilose, da amilopectina e de polímeros de glicose relacionados. Resíduos de α -maltose são removidos sucessivamente, a partir da extremidade não redutora do amido ou de polissacarídeos e oligossacarídeos relacionados, até que a molécula seja degradada ou, no caso da amilopectina, até que seja alcançada uma ramificação (WHO Food Additives Series 40). A amilase maltogênica pode ser produzida pela fermentação submersa de uma linhagem não patogênica e não toxigênica do *Bacillus subtilis*, a qual contém o gene *amyM* do *Bacillus stearothermophilus*, que codifica a amilase maltogênica (WHO Food Additives Series 40; Diderichsen e Christiansen, 1988) (FDA-GRASP 7G0326).

4. γ -Amilases

As γ -amilases (EC 3.2.1.3) hidrolisam as ligações 1,4- α -d-glicosídicas, a partir das extremidades não redutoras das cadeias, de maneira sucessiva, liberando β -d-glicose. A maioria das formas das enzimas consegue hidrolisar rapidamente as ligações 1,6- α -d-glicosídicas, quando a ligação seguinte na sequência é do tipo α -1,4, e algumas preparações dessa enzima hidrolisam ligações α -1,6 e 1,3-d-glicosídicas de outros polissacarídeos (KEGG R01790):



As γ -amilases ou glicoamilases são encontradas apenas em fungos (KEGG, OrthoDB); diferentemente das outras formas de amilase, a γ -amilase é mais eficiente em pH ácido e apresenta atividade ótima em pH 3.

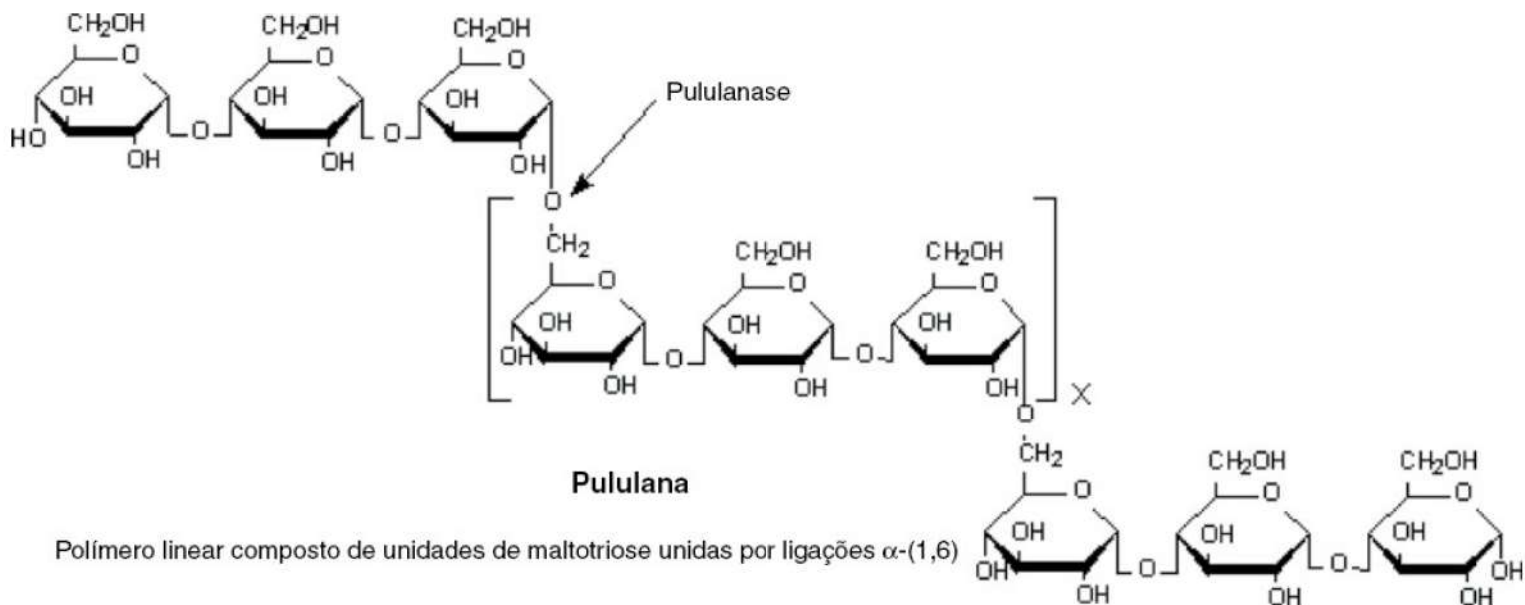
A glicoamilase de *Trichoderma reesei* foi superexpressa no próprio micro-organismo, *T. reesei*. A linhagem produtora foi geneticamente modificada, por meio da inativação de vários genes de celulases, a fim de facilitar a superexpressão do gene original *TrGA* do *T. reesei* para a produção e secreção da enzima glicoamilase recombinante.

Dois cassetes de expressão que contêm o promotor e o terminador do gene *cbh1* do *T. reesei*, flanqueando o gene *glal* que codifica a glicoamilase do *T. reesei*, foram integrados ao genoma da linhagem produtora final, designada 70H2-TrGA #32-9 (FDA-GRN 372).

A glicoamilase derivada é utilizada para sacarificar o amido de milho liquefeito na fabricação de adoçantes à base de amido de milho, como o xarope com alto teor de frutose. Ela maximiza a conversão do substrato amiláceo em carboidratos fermentáveis. Além disso, intensifica a extração e a sacarificação do amido (*mashing*) de cereais maltados, de cereais e de outras fontes vegetais (que incluem cevada, milho, trigo, centeio, sorgo (*milo*), arroz, tapioca e batatas). Os líquidos (mostos) resultantes do processo são fermentados, normalmente por uma levedura, para produzir etanol (e, às vezes, ácidos orgânicos). A glicoamilase do *Trichoderma reesei* também é empregada nos processos de fabricação do ácido láctico, similares àqueles utilizados na fabricação do álcool para bebidas (FDA-GRN 372).

5. Pululanases

As pululanases (EC 3.2.1.41) são tipos específicos de glucanases, exoenzimas amilolíticas, que degradam a pululana, a amilopectina, o glicogênio e α - e β - dextrinas limite da amilopectina e do glicogênio. Elas são produzidas na forma de lipoproteínas extracelulares ancoradas à superfície das células por bactérias Gram-negativas. As pululanases do tipo I atacam as ligações α -1,6, em específico, enquanto as do tipo II também são capazes de hidrolisar as ligações α -1,4. As pululanases clivam as ramificações das moléculas de amilopectina do amido, produzindo cadeias de amilose e, por isso, são denominadas enzimas desramificantes (Lee e Whelan, 1972). A maltose é o menor açúcar que elas conseguem liberar da ligação α -1,6:



Singh *et al.* (2008)

Elas são utilizadas com outras enzimas, principalmente, para intensificar a sacarificação do amido em glicose e xarope de glicose. Às vezes, são aplicadas como enzimas na preparação de pães, bolos etc. ou na indústria de bebidas alcoólicas, aumentando a quantidade de açúcares fermentáveis disponíveis para conversão em álcool (FDA-GRN 20). As pululanases são produzidas por fermentação, utilizando-se culturas de bactérias (*Bacillus* e *Klebsiella*) ou fungos (*Trichoderma*).

Existe uma pululanase recombinante específica, oriunda do *Bacillus naganoensis*, expressa em *Bacillus subtilis* (FDA FDA-GRN 20). O *Bacillus subtilis* também é utilizado para expressar a pululanase do *Bacillus acidopullulyticus* (FDA FDA-GRN 205). Uma terceira pululanase, oriunda do *Bacillus deramificans*, é expressa no *B. licheniformis* (FDA FDA-GRN 72).

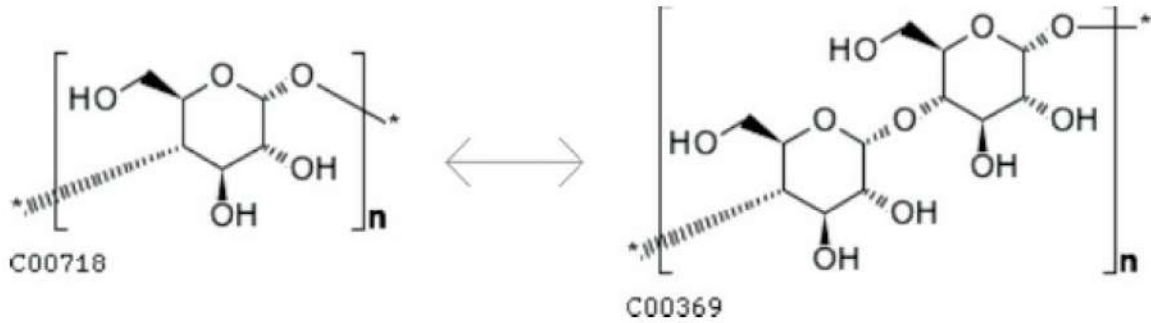
6. Amilases formadoras de maltotetraose

As amilases formadoras de maltotetraose (EC 3.2.1.60) são utilizadas para retardar o processo de envelhecimento de pães, bolos etc. e, desse modo, estender o período durante o qual os produtos apresentam uma qualidade aceitável para o consumo. Uma amilase formadora de maltotetraose, a amilase G4, é utilizada como auxiliar de processamento na indústria do amido. A amilase G4 heteróloga é produzida na linhagem de *B. licheniformis* GICC03279, a qual expressa o gene *mta* de *Pseudomonas saccharophila* (FDA-GRN 277). A fim de melhorar a termoestabilidade da enzima durante a preparação de pães, bolos etc., a sequência de DNA do gene da linhagem selvagem de *P. saccharophila* PS4 foi alterada, por meio da remoção do domínio C-terminal de ligação ao amido e da mudança de 16 dos 429 aminoácidos restantes do núcleo catalítico (FDA-GRN 277). A introdução dessas mutações aumentou a termoestabilidade e o desempenho da enzima durante o cozimento, o que tornou a amilase G4 muito mais adequada como agente anti-envelhecimento do pão que a enzima maltotetraose-hidrolase do tipo selvagem, oriunda de *P. saccharophila*.

7. Glicosiltransferase ramificante

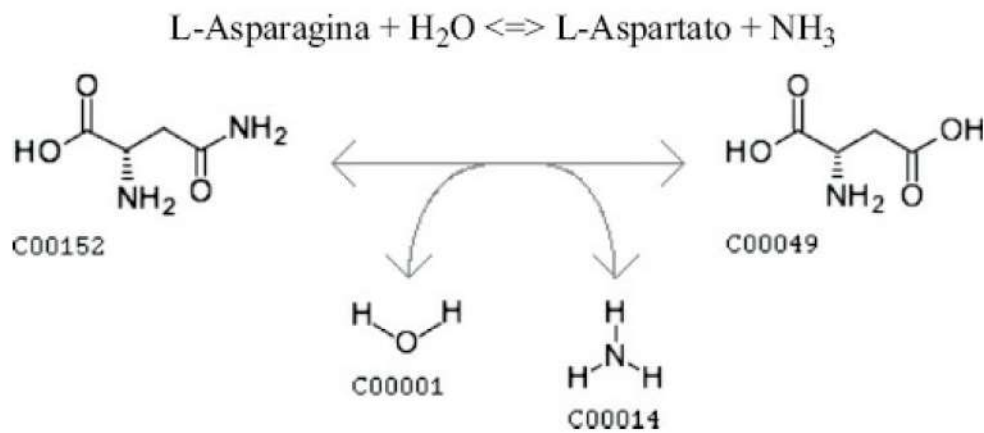
A glicosiltransferase ramificante (EC 2.4.1.18) de *Rhodothermus obamensis* produzida pelo *B. subtilis* é utilizada como enzima na indústria do amido para obter dextrinas com propriedades físicas melhoradas, como solubilidade mais alta, viscosidade mais baixa e retrogradação reduzida (FDA-GRN 274). Uma preparação melhorada de dextrinas pode ser utilizada em sopas, molhos, alimentos desidratados instantâneos, produtos com baixo teor de

gordura e refrigerantes. A glicosiltransferase ramificante catalisa a transferência de um segmento de uma cadeia α -1,4-d-glucana para um grupo hidroxila primário em uma cadeia glucana similar, criando ligações α -1,6 e aumentando o número de pontos de ramificação. Ela converte a amilose em amilopectina (KEGG R02110):



D. Asparaginase

A asparaginase (EC 3.5.1.1) converte o aminoácido asparagina em ácido aspártico (KEGG R00485):



A asparagina é um precursor da acrilamida, que é um possível carcinógeno. Quando alimentos ricos em açúcares redutores e asparagina são assados, fritos e grelhados em temperaturas superiores a 100°C ocorre escurecimento e a formação de acrilamidas, por meio da reação de Maillard. Quando se adiciona asparaginase, a asparagina torna-se indisponível e o teor de acrilamida no alimento processado pode ser reduzido em até 90%. O valor nutricional, o sabor e o escurecimento do produto permanecem inalterados (Pruser e Flynn, 2011).

As preparações à base de asparaginase são utilizadas em alimentos que contêm carboidratos e asparagina e que são aquecidos acima de 120°C , como os pães (por exemplo, pão de forma, pão francês, pães para cachorro-quente e hambúrguer, bisnagas, baguetes, pães com passas, pães com tipos diferentes de grãos e outras variedades de pães, além de biscoitos e bolachas do tipo *cracker*), outros produtos à base de cereais (por exemplo, bolos, rocamboles, bolos de mel holandês e cereais matinais), produtos à base de batatas (por exemplo, batatas fritas e batatas *chips*) e em reações nas quais ocorre formação de compostos de sabor (FDA-GRN 214).

As preparações à base de asparaginase são comercializadas com os nomes Acrylaway e PreventASe. Essa última é fabricada com o auxílio do fungo geneticamente modificado *Aspergillus niger*, transgênico para o próprio gene *aspA* da asparaginase, que está sob o controle do promotor do gene *glaA* para exibir uma expressão maior da enzima de 378 aminoácidos. Na linhagem de *A. niger* GAM-53 receptora, sete *loci* do gene da glicoamilase foram removidos e substituídos por sítios para integração direcionada, denominados *plug sites*. O gene *pepA* da principal protease, bem como os genes *amyA* e *amyB* das principais amilases, foram suprimidos, intensificando a capacidade da linhagem de secretar proteínas (FDA-GRN 214).

A preparação Acrylaway é produzida pelo fungo *Aspergillus oryzae* com o próprio gene da asparaginase, que

foi modificado e está sob o controle do promotor do gene *Pna2/tpi* para aumentar a expressão da enzima (FDA-GRN 201). A linhagem de *A. oryzae* BECh2 hospedeira foi modificada para eliminar a secreção de TAKA-amilase e de metaloproteinase neutra I, por meio de deleção genética. Além disso, a síntese dos ácidos ciclopiazônico e kójico foi eliminada, mediante irradiação gama e ultravioleta (FDA-GRN 201).

E. Proteinase aspártica

A proteinase aspártica, ou mucorpepsina (EC 3.4.23.23), hidrolisa proteínas, atuando preferencialmente nos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos localizados em P1 e P1'. Ela coagula o leite, mas não aceita lisina em P1 e, por essa razão, não ativa o tripsinogênio.

A proteinase aspártica clonada, oriunda de *Rhizomucor miehei* e produzida por *A. oryzae*, é utilizada como enzima para coagulação do leite e aprovada para uso na produção de queijos (21CFR 173.1 50). Uma proteinase aspártica subclonada, oriunda de *R. miehei* e produzida pela linhagem de *A. oryzae* IFO 4177, é utilizada como agente amaciante sob a marca registrada NovoCarne. A linhagem receptora *A. oryzae* IFO 4177 é uma linhagem industrial geneticamente modificada, bastante conhecida do Instituto para Fermentação de Osaka, Japão. Nesse plasmídeo de expressão, a proteinase aspártica está sob o controle do promotor do gene da TAKA-amilase de *A. oryzae* (FDA-GRN 34). Utilizada na forma líquida, a enzima é injetada na carne que, em seguida, passa por um processo mecânico (*tumbling*) que aumenta a distribuição. Ela também pode ser misturada aos ingredientes da marinação e, posteriormente, passar pelo processo mecânico. O preparado NovoCarne Tender tem uma especificidade limitada, agindo apenas sobre as proteínas miofibrilares, e não sobre as proteínas do tecido conjuntivo. Exibe também uma hidrólise autolimitada da miosina. Esses fatores impedem que ele amacie excessivamente a carne (FDA-GRN 34).

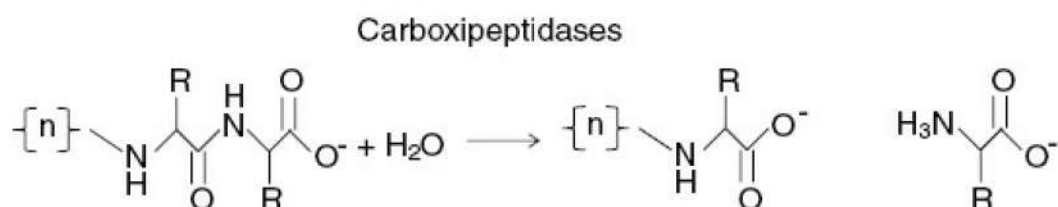
F. Aspergilopepsina I/Protease ácida fúngica

A protease ácida fúngica, ou aspergilopepsina I (EC 3.4.23.18), é uma protease que hidrolisa proteínas e apresenta uma especificidade ampla.

O gene da protease ácida fúngica do *Trichoderma reesei* é superexpresso nesse micro-organismo. O DNA que codifica a protease ácida fúngica secretada madura do *T. reesei* foi fundido no DNA que codifica o peptídeo-sinal da celobio-hidrolase I (CBHI) do *T. reesei*, intensificando a produção e a secreção. Esse quadro de leitura aberto é flanqueado pelas sequências do promotor e do terminador do gene da CBHI, oriundo do *T. reesei*, para otimizar a superexpressão. A protease ácida fúngica isolada é utilizada na maceração do milho, na fabricação de bebidas alcoólicas para aumentar o nitrogênio amino livre ou reduzir a espuma, na clarificação do suco de maçã e na degomagem das membranas durante a fabricação do suco de laranja (FDA-GRN 333).

G. Carboxipeptidases

As carboxipeptidases pertencem à subclasse das peptidases que hidrolisam as extremidades C-terminal de cadeias polipeptídicas. Também são chamadas de exopeptidases (EC 3.4.11.x-3.4.19.x):



A função tecnológica da carboxipeptidase é liberar aminoácidos da extremidade C-terminal de proteínas e peptídeos, presentes em vários alimentos, como o leite (caseína, soro do leite) e a carne, a fim de facilitar e/ou acelerar o surgimento de sabores durante a fase de maturação.

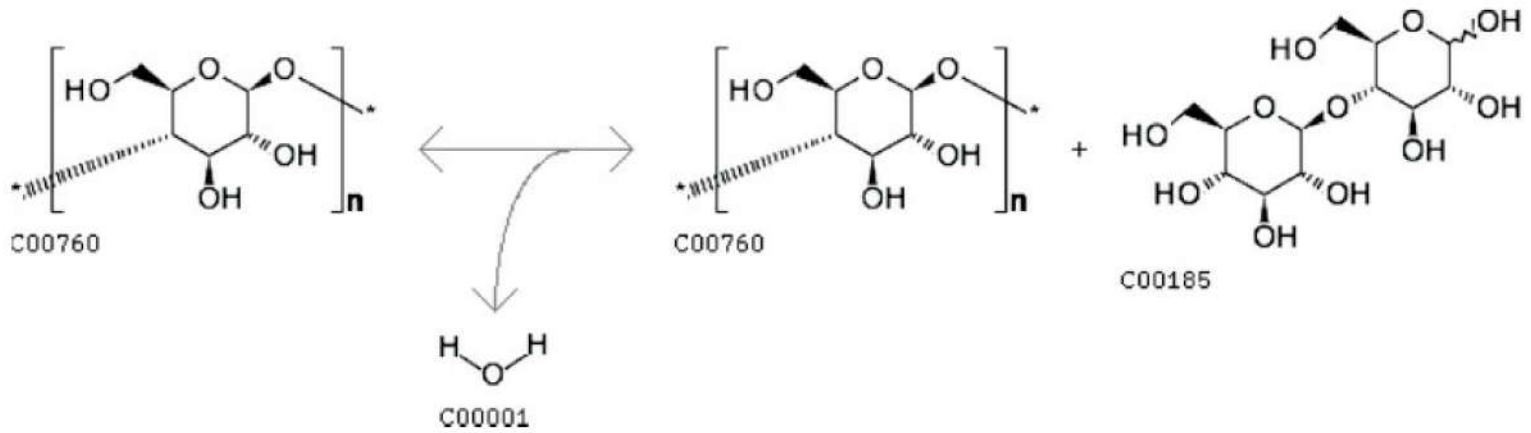
A preparação enzimática à base de carboxipeptidase do tipo serina, comercializada com o nome *Accelerzyme CPG*, deriva de culturas geneticamente modificadas de *Aspergillus niger*. A linhagem hospedeira *A. niger* ISO-528 deriva da linhagem GAM-53 pela deleção dos sete *loci* do gene *glaA* da glicoamilase, os quais foram substituídos pelos chamados *plug sites* ou sítios para integração direcionada. Esses sítios do gene Δ *glaA* permitem a inserção (guiada pelos sítios) dos cassetes de expressão. Além disso, o gene *pepA*, que codifica a principal protease foi inativado e os genes *amyA* e *amyB*, que codificam as principais amilases, foram suprimidos. A linhagem também tem a capacidade melhorada de secretar proteínas, a qual foi selecionada mediante geração por mutação clássica (FDA-GRN 345).

O cassete de expressão da carboxipeptidase contém DNA do *A. niger*, que começa com o promotor do gene *glaA*, acompanhado da sequência inteira do gene *pepG*, a qual codifica a proteína carboxipeptidase, e flanqueado em 3' pela sequência do terminador do gene *gluA*. Essa sequência garante a terminação eficiente da transcrição do gene *pepG* e o direcionamento da unidade de expressão para os *loci* Δ *glaA* (FDA-GRN 345).

A preparação *Accelerzyme CPG*, à base de carboxipeptidase, pode ser utilizada em queijo, queijo modificado por enzimas e carne fermentada. Na produção de queijos, a enzima é adicionada ao leite, junto com as bactérias do ácido láctico, que possibilitam à enzima agir sobre as proteínas presentes no queijo e liberar os aminoácidos como precursores dos compostos responsáveis pelo sabor. Dessa forma, desenvolvem-se os mesmos tipos de compostos responsáveis pelo sabor encontrados na maturação regular, porém a velocidade do desenvolvimento do sabor é acelerada, resultando em um período mais curto de maturação do queijo, bem como na redução do sabor amargo durante o processo. Na carne fermentada, a carboxipeptidase também pode ser utilizada para acelerar o desenvolvimento do sabor durante a maturação. A carne seca fermentada é produzida por meio do corte e mistura de pedaços frescos de carne e toucinho defumado, junto com bactérias do ácido láctico. A mistura é embutida em intestino de porco ou material sintético e deixada para secar e fermentar em uma câmara de maturação com temperatura e umidade controladas. Durante o período de maturação de três semanas, a umidade se reduz por evaporação, o pH diminui como resultado da formação de ácido láctico pelas bactérias do ácido láctico, as quais também formam os componentes responsáveis pelo desenvolvimento do sabor. A adição da carboxipeptidase às bactérias do ácido láctico durante o corte e a mistura da carne e do toucinho defumado leva à liberação de aminoácidos, que estimulam as bactérias do ácido láctico a formar os componentes responsáveis pelo sabor. Como consequência, a carne alcança o sabor desejado depois de 22 dias, e não 28 (FDA-GRN 345).

H. Celulase

A celulase (EC 3.2.1.4) é a enzima responsável pela endo-hidrólise das ligações β -1,4-d-glicosídicas da celulose, da liquenina e das β -d-glucanas dos cereais. Além disso, as celulases hidrolisam as ligações β -1,4- em β -d-glucanas, que também contêm ligações β -1,3 (KEGG R02886):



As preparações à base de celulase podem ser utilizadas para: hidrólise de celulose de uma ampla variedade de alimentos que contêm celulose, tais como produtos cítricos ou outras frutas utilizadas na produção de sucos e vinhos; remoção de fibras das tortas de prensagem na produção de óleos comestíveis; aumento da recuperação de amido de batatas e de outras fontes de amido; extração de proteínas de folhas e gramíneas; amaciamento de frutas e verduras antes do cozimento; extração de óleos essenciais e compostos de aroma de vegetais; tratamento do mosto para destilação; extração de componentes do chá-verde; e outros usos (FDA-GRN 292).

Há uma preparação à base de celulase que deriva de um fungo geneticamente modificado, o *Myceliophthora thermophila*. Cópias extras do gene *eg5* da celulase do *M. thermophila* foram incorporadas ao cromossomo do *M. thermophila* receptor. Essas cópias adicionais estão sob o controle do promotor do gene *cbh1*, resultando em uma linhagem hiperprodutora de celulase (FDA-GRN 292).

I. Ciclodextrina glucanotransferase

A ciclodextrina glucanotransferase (CGTase; EC 2.4.1.19) é uma enzima singular capaz de converter amido ou derivados do amido em ciclodextrinas, por meio de uma reação de ciclização. Essa enzima provoca a ciclização de parte de uma cadeia de α -1,4-d-glucana, pela formação de uma ligação α -1,4-d-glicosídica (KEGG EC 2.4.1.19).

Inicialmente, a enzima cliva a ligação α -1,4-glicosídica entre os resíduos ligados nos subsítios +1 e -1, levando à formação de um intermediário covalente. Em seguida, a cadeia linear do intermediário adquire uma conformação cíclica, que é a etapa de circularização. Depois, forma-se uma nova ligação α -1,4-glicosídica com o grupo terminal 4-hidroxila do intermediário. Os resíduos catalíticos envolvidos na clivagem da ligação são Asp²²⁹ e Glu²⁵⁷ (numeração da ciclodextrina glucanotransferase do *B. circulans*) (Figura 13.14) (Li *et al.*, 2007).

Como resultado, formam-se de modo reversível ciclodextrinas (dextrinas de Schardinger) de vários tamanhos a partir do amido e de substratos similares. As maltodextrinas lineares também podem ser desproporcionadas sem ciclização. As ciclodextrinas são α -1,4-glucanas cíclicas, compostas de 6 a mais de 100 unidades de glicose, e as formas mais comuns são a α , a β e a γ -ciclodextrinas. A produção de ciclodextrinas a partir do amido, mediada pela ciclodextrina glicosiltransferase, resulta em uma mistura de ciclodextrinas α , β e γ , que consistem em seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente (Figura 13.15) (Li *et al.*, 2007).

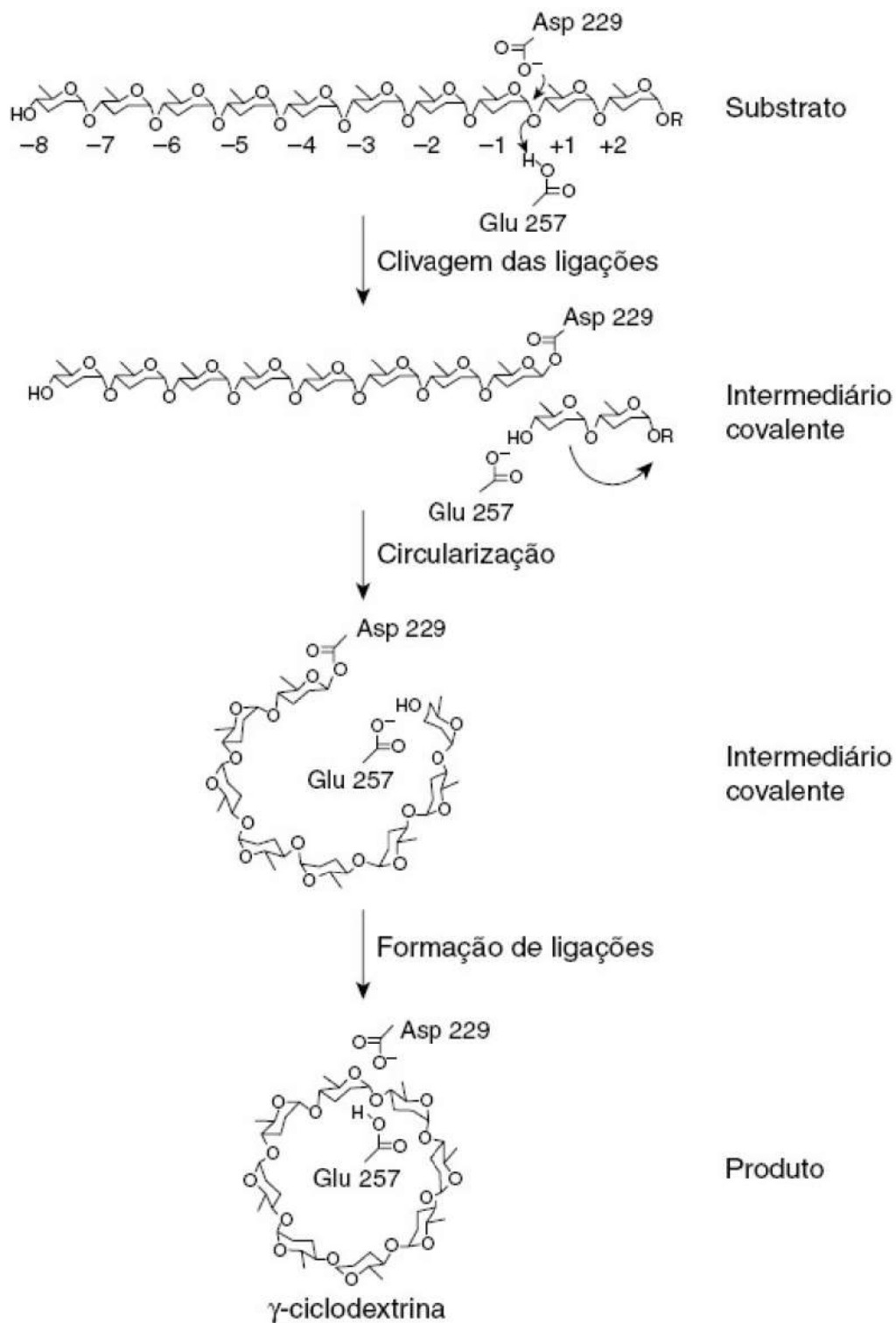


FIGURA 13.14 Circularização de derivados do amido em ciclodextrinas, catalisada pela ciclodextrina glicanotransferase (CGTase; EC 2.4.1.19). Extraído de Li *et al.*(2007).

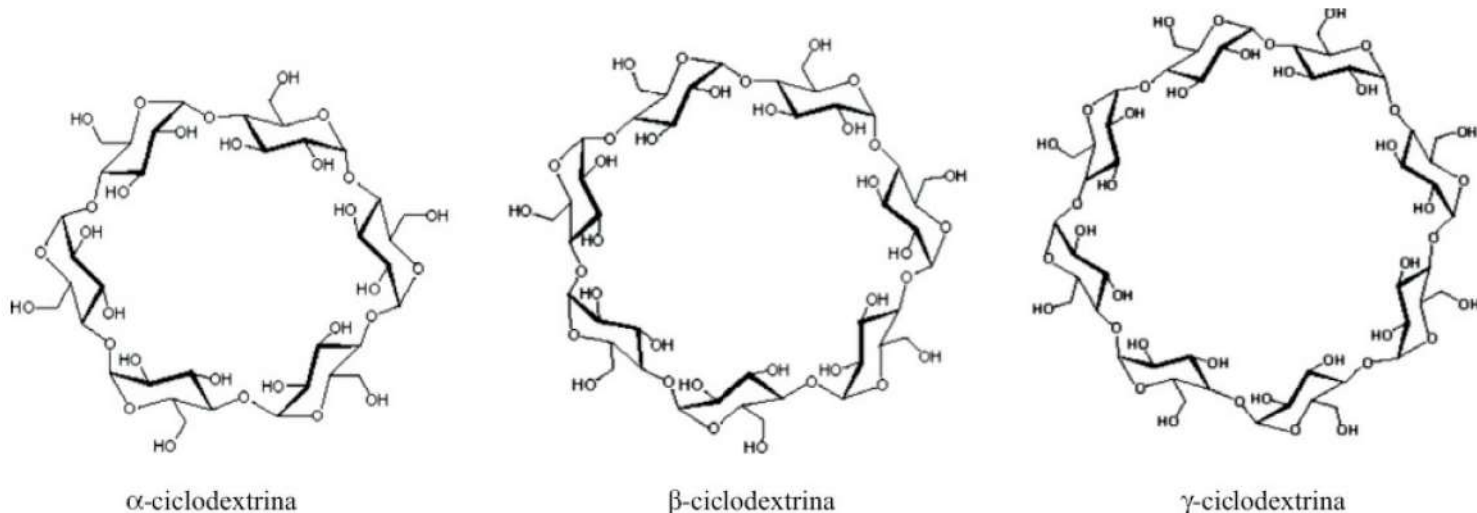


FIGURA 13.15 Formas mais comuns de ciclodextrinas circulares. Extraído de Li *et al.* (2007).

As moléculas circulares de α , β e γ -ciclodextrina têm a forma de um cone truncado e oco ou de um anel. Os átomos de hidrogênio e oxigênio das ligações glicosídicas estão voltados para o lado interno do anel, enquanto os grupos hidroxila estão localizados do lado externo; como consequência disso, as ciclodextrinas têm uma cavidade hidrofóbica e, ao mesmo tempo, uma superfície externa hidrofílica, que as torna solúveis em água. A cavidade hidrofóbica permite que as ciclodextrinas formem complexos de inclusão com vários compostos orgânicos. O diâmetro da cavidade cria certa seletividade para os complexos que podem ser formados pelas moléculas “hóspedes”, isto é, o anel maior da γ -ciclodextrina de oito unidades consegue acomodar uma variedade maior de moléculas hóspedes que os anéis menores das α e β -ciclodextrinas. Moléculas maiores podem formar complexos com mais de uma molécula de ciclodextrina (Tsoucaris *et al.*, 1987). A formação de um complexo de inclusão com uma molécula hóspede é a base para a utilização das ciclodextrinas em alimentos, cosméticos e preparações farmacêuticas (Li *et al.*, 2007).

As ciclodextrinas podem ser utilizadas para aumentar o teor de fibras dos alimentos sólidos, semilíquidos e líquidos. Por causa de sua capacidade de formar complexos com certas moléculas orgânicas, as ciclodextrinas podem executar certas funções tecnológicas, como adjuvante de sabor; adjuvante de coloração; ou agente transportador, estabilizante ou solubilizante de certas vitaminas (por exemplo, acetato de retinol, vitaminas K₁ e C, riboflavina e b-caroteno) e ácidos graxos (FDA-GRN 155). Em geral, são consideradas agentes estabilizadores, emulsificantes, transportadores e auxiliares da formulação de alimentos (FDA-GRN 64).

As ciclodextrinas são produzidas com o uso de preparações de ciclodextrina glucanotransferase. Nos Estados Unidos, essas preparações são elaboradas por linhagem *E. coli* K12 recombinante, a qual expressa o gene que codifica a α -CGTase da *Klebsiella oxytoca* (FDA-GRN 155). A enzima é totalmente removida da ciclodextrina final (FDA-GRN 155, FDA-GRN 64).

J. Quimosina

A quimosina (EC 3.4.23.4) é uma peptidase com ampla especificidade pelo substrato. Ela é mais conhecida por sua capacidade de coagular o leite, ao clivar a ligação Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ da κ -caseína (Gilliland *et al.*, 1991) e, por essa razão, ser essencial na produção de queijos firmes. A quimosina produzida de maneira heteróloga substitui as preparações tradicionais obtidas do estômago de bezerras.

A quimosina B bovina (*Bos taurus*) é produzida por fermentação submersa de *Trichoderma reesei*. O DNA que codifica a porção proquimosina da proteína quimosina foi sintetizado utilizando-se os códons do *T. reesei*, sem alteração da sequência de aminoácidos codificada. O gene sintético da quimosina B está sob o controle do

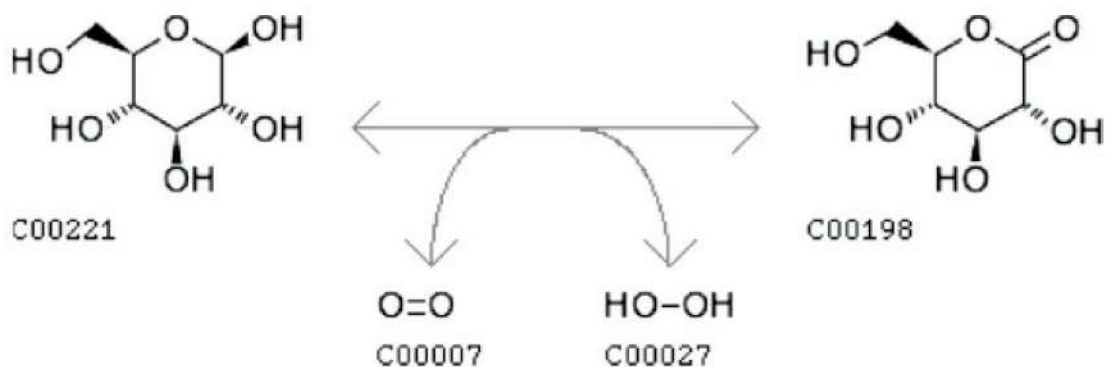
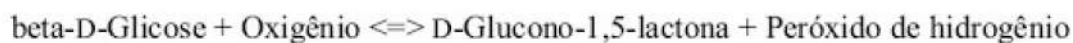
promotor e do terminador originais de *T. reesei*. Um segundo cassete de expressão do DNA transformante codifica uma chaperonina do *T. reesei* que é encontrada no retículo endoplasmático e está envolvida no enovelamento de proteínas nascentes secretadas. Essa sequência codificadora está fundida em um promotor e em um terminador diferentes, oriundos do *T. reesei*, para o controle da expressão (FDA-GRN 230). A linhagem de *Trichoderma reesei* GICC03278 hospeda a sequência construída para a expressão, e a preparação enzimática resultante é conhecida pelo nome comercial Chymostar Supreme. A linhagem *T. reesei* GICC03278 foi otimizada quanto à produção da enzima, por meio da supressão de vários genes.

A quimosina bovina é produzida na forma de proteína de fusão utilizando-se o gene da glicamilase de *A. niger* como molécula transportadora. Para tal, introduziu-se no *A. niger* var. *awamori* uma cópia sintética da quimosina bovina que apresenta os códons de uso otimizado e uma alteração de serina-351 para treonina. A quimosina é liberada da proteína de fusão glicamilase-proquimosina pela clivagem autocatalítica do propeptídeo (Kappeler *et al.*, 2006).

A quimosina recombinante bovina transcrita a partir do gene sintético da proquimosina bovina também é produzida em *E. coli*, em *A. niger* var. *awamori* (Chy-Max) e na levedura *Kluyveromyces lactis* (Maxiren) (FDA 21 CFR 184.1685).

K. Glicose oxidase

A glicose oxidase (EC 1.1.3.4) é uma oxidoredutase que catalisa a oxidação da glicose em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e D-glucono-1,5-lactona, agindo sobre os grupos CH-OH, com o oxigênio como acceptor (KEGG R01522):



Extraído de Li *et al.* (2007)

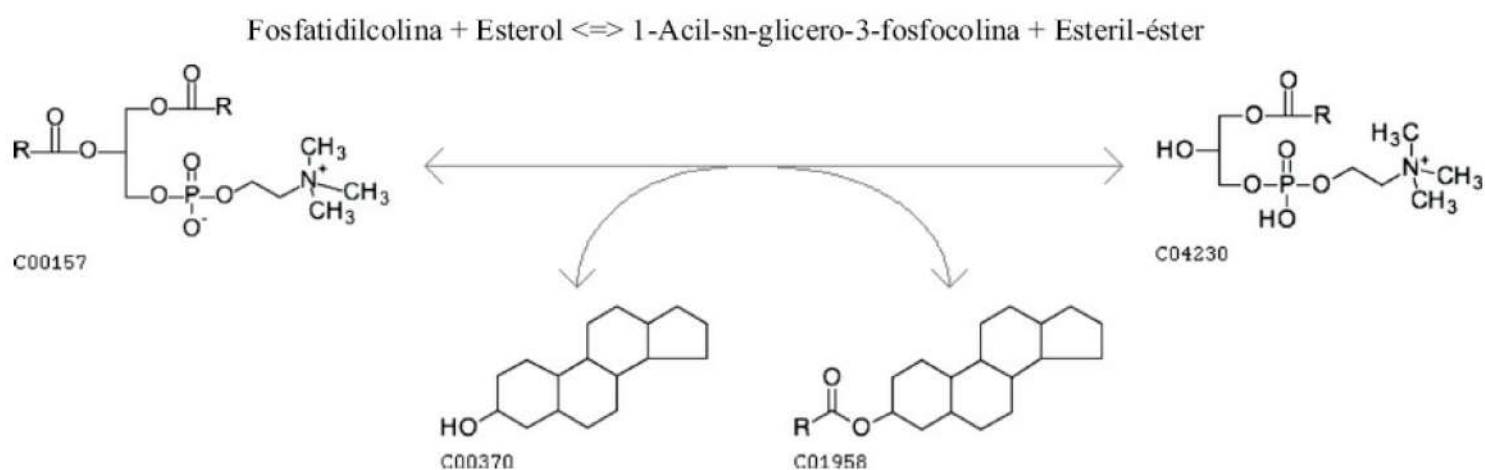
A glicose oxidase é utilizada na indústria da panificação como auxiliar de processamento para reforçar o glúten em massas. A enzima contribui para a oxidação dos grupos sulfidrilas livres do glúten, que participam da formação de ligações de dissulfeto. Como resultado, a massa torna-se mais forte, mais elástica, com maior resistência ao choque mecânico, assim como melhor desenvolvimento no forno e o pão com volume maior (FDA-GRN 106). A glicose oxidase também é utilizada na remoção da d-glicose da clara do ovo, a fim de evitar o escurecimento. Ela é empregada para eliminar o oxigênio das embalagens de alimentos – como o oxigênio presente no espaço livre acima das bebidas engarrafadas ou enlatadas – e também para reduzir o escurecimento não enzimático dos vinhos e maioneses.

A glicose oxidase recombinante é produzida pela linhagem *Aspergillus oryzae* BECh2 geneticamente modificada, que não produz amilase, protease alcalina (*alp*) e metaloprotease I neutra (*Npl*) e exibe deficiência de ácidos ciclopiazônico e kójico. Esse micro-organismo transporta o gene codificador da glicose oxidase de *A. niger* sob o controle do promotor do gene *Pna2ltpI* da amilase neutra I. Além disso, a parte não traduzida 5' desse

promotor foi substituída pela parte não traduzida 5' do promotor (*TPI*) do gene da fosfato isomerase de *Aspergillus nidulas* (FDA-GRN 106). A preparação enzimática resultante está registrada sob o nome comercial Gluzyme.

L. Glicerofosfolípido colesterol aciltransferase

As glicerofosfolípido colesterol aciltransferases (EC 2.3.1.43) catalisam a transferência de resíduos acila, como os resíduos palmitoíla, oleoíla e linoleoíla, para vários esteróis (KEGG R02114):



Uma glicerofosfolípido colesterol aciltransferase de *Aeromonas salmonicida* é expressa de maneira heteróloga em *Bacillus licheniformis*. O organismo hospedeiro é a linhagem de *B. licheniformis* Bra7, modificada mediante deleção de várias enzimas (proteases, amilase), um gene para esporulação e genes originais para a resistência ao cloranfenicol para se tornar adequada à expressão de proteínas heterólogas. O gene que codifica a glicerofosfolípido colesterol aciltransferase da *A. salmonicida* foi sintetizado e o códon, otimizado. Um aminoácido foi trocado, e o gene sintético está sob o controle do promotor e do terminador originais do *B. licheniformis*. A integração no gene (*catH*) da resistência ao cloranfenicol do *B. licheniformis* foi obtida por meio de recombinação homóloga; esse gene atua na seleção, integração cromossômica e amplificação do cassete. As sequências do gene *catH* flanqueiam o cassete de expressão com as sequências montante e jusante. Parte da sequência do gene *catH*, situada a montante (denominada repetição 5'), está presente duas vezes no plasmídeo para permitir a amplificação do cassete de expressão no cromossomo (FDA-GRN 265).

A eficácia da glicerofosfolípido colesterol aciltransferase do *B. licheniformis* baseia-se em seus efeitos sobre a membrana celular ao transferir grupos acila dos fosfolípidos e glicolípidos para aceptores como os esteróis, os alcoóis graxos e outros alcoóis primários menores. Os grupos acila transferidos são, principalmente, ácidos graxos com 14C a 18C: os ácidos mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico. O colesterol e outros esteróis aceitam os grupos acila transferidos para se transformarem em ésteres do colesterol e ésteres de esteróis. Os alcoóis graxos (definidos como alcoóis com 12C ou maiores) também podem ser esterificados. Os produtos da reação formados dependem do(s) substrato(s), consistindo, em geral, em lisofosfolípidos, ésteres do colesterol com ácidos graxos de 14C a 20C e ésteres de esteróis com ácidos graxos de 14C a 20C (campesterol, estigmasterol, betasitosterol, 5-avenasterol e 7-estigmasterol).

A preparação enzimática é utilizada em gemas do ovo e em ovos inteiros, em carnes processadas, na degomagem de óleos vegetais, em produtos lácteos como o queijo e em produtos de panificação que contenham ovos, como os bolos. Seu nome comercial é FoodPro™ LysoMaxa Oil (FDA-GRN 265).

A gema do ovo é bastante utilizada na indústria de alimentos, por causa de suas propriedades emulsificantes. Cerca de 30% dos lípidos da gema do ovo são fosfolípidos, que contribuem para as propriedades emulsificantes

da gema. Essas propriedades são exploradas em muitos alimentos, como a maionese, os molhos para salada e outro molhos e os bolos. No entanto, em alguns casos, as propriedades emulsificantes da gema não são suficientes para a obtenção de um produto homogêneo, sem separação. Por exemplo, a pasteurização da maionese em temperaturas altas provoca uma separação no produto. A preparação enzimática é utilizada para transformar os fosfolipídeos da gema do ovo em lisofosfolipídeos e ésteres do colesterol. Pode-se evitar a separação do produto na pasteurização em alta temperatura utilizando-se, no caso da maionese, gema de ovo modificada por enzimas. A gema de ovo assim modificada deixa o miolo dos bolos mais fofo e macio.

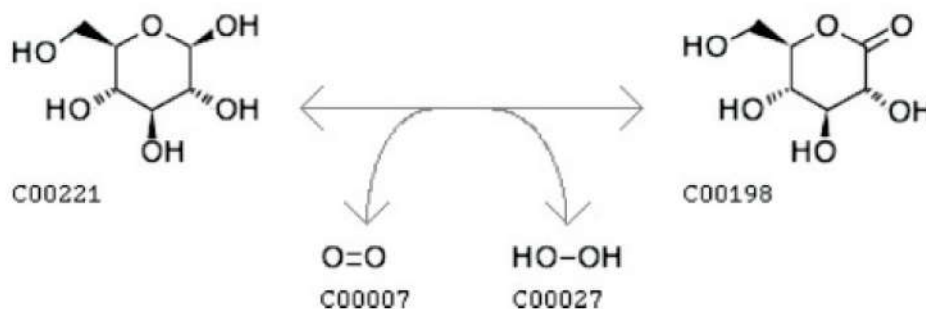
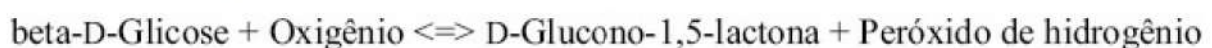
A preparação enzimática também é adotada em produtos cárneos processados. Ela melhora a emulsificação dos produtos cárneos processados e contribui para melhorar a consistência e reduzir a perda de peso por cozimento. Se adicionada à carne processada, converte os fosfolipídeos presentes em lisofosfolipídeos.

Os óleos vegetais brutos, como os de soja, contêm cerca de 12% de fosfolipídeos, que são removidos durante o processo de refinamento para melhorar sua qualidade e evitar a sedimentação. A remoção dos fosfolipídeos é realizada na etapa de degomagem do processo de refino do óleo, que pode ser realizada por meios químicos ou enzimáticos. Na degomagem, a enzima converte os fosfolipídeos em lisofosfolipídeos, que são mais solúveis em água e podem ser removidos do óleo por lavagem com água. A hidrólise enzimática dos fosfolipídeos é um processo mais suave que a degomagem química, que necessita de mais ácidos e álcalis. Além disso, a degomagem com a enzima produz menos efluentes. No processo de degomagem, a enzima catalisa a transferência de ácidos graxos dos fosfolipídeos para os fitosteróis do óleo durante a formação dos ésteres de fitosteróis. Os fitosteróis normalmente são removidos na etapa de desodorização do refino do óleo, mas, quando a preparação enzimática é utilizada, eles são convertidos em ésteres de fitosteróis; esses ésteres não são removidos durante o processo de refino, por causa da volatilidade mais baixa dos ésteres de esteróis. Os ésteres de fitosteróis não são elementos estranhos no óleo vegetal, porque uma parte menor dos fitosteróis já existe de forma natural na forma de ésteres.

O uso da preparação enzimática em produtos lácteos contribui para aumentar o rendimento durante a produção do queijo. A enzima adicionada ao leite converte seus fosfolipídeos em lisofosfolipídeos, intensificando as propriedades emulsificantes e aumentando o rendimento do queijo ao aprisionar mais lipídeos no queijo de coalho (FDA-GRN 265).

M. Hexose oxidase

A hexose oxidase (EC 1.1.3.5) catalisa a oxidação de vários monossacarídeos e oligossacarídeos (em especial, a glicose; mas, também, a maltose, a lactose, a d-galactose, a d-manose e a celobiose) com o oxigênio para produzir lactonas e peróxido de hidrogênio (KEGG R01522):



A principal aplicação da hexose oxidase está na fabricação de pães, aumentando a força da massa e o volume do pão. Para esse fim, a enzima age de modo similar à glicose oxidase, ou seja, o peróxido de hidrogênio produzido atua como oxidante de outros componentes do alimento. No entanto, essa enzima traz vantagens adicionais, uma

vez que age sobre uma variedade maior de substratos. Na indústria de alimentos, a hexose oxidase é utilizada na fabricação de queijos e tofu – auxiliando na formação do coalho –, na limitação do escurecimento indesejável – ao reduzir as reações de Maillard nos alimentos – e removendo o oxigênio durante a produção de molhos para saladas e outros molhos. Essa enzima também é adotada pelas indústrias que fabricam massas e macarrões; nesse caso, ela reforça a estrutura da massa, o que diminui a perda de amido e proteínas durante o cozimento e confere uma consistência mais firme à mordida e uma textura melhor (FSANZ A475).

Há algum tempo, é sabido que a hexose oxidase pode ser extraída de várias algas vermelhas. Porém, por causa da dificuldade para recuperar as pequenas quantidades da enzima dessas algas, suas propriedades foram pouco aproveitadas. Nos últimos anos, esse obstáculo foi superado com o uso das tecnologias do DNA recombinante, possibilitando a produção de quantidades maiores da enzima e, dessa forma, permitindo uma caracterização mais completa. As técnicas permitiram que processos industriais fossem empregados na produção de preparações enzimáticas comercialmente viáveis.

O gene que codifica a hexose oxidase foi isolado da alga *Chondrus crispus* e inserido na levedura hospedeira *Hansenula polymorpha*. O plasmídeo utilizado nessa construção foi criado a partir do plasmídeo pBR322 de *E. coli*, por meio da inserção do gene *URA3* (que codifica a oritidina-5'-fosfato descarboxilase) do *S. cerevisiae*, um promotor e um terminador original da *H. polymorpha* e o gene que codifica a hexose oxidase de *C. crispus*. Além disso, os genes que codificam a resistência à ampicilina (*Apr*) e à tetraciclina (*TCr*) na linhagem pBR322 original foram removidos. O organismo resultante produz a enzima em quantidades comerciais durante o processo de fermentação submersa (FSANZ A475, FDA-GRN 238).

N. Proteína estruturadora de gelo

As proteínas estruturadoras de gelo estão amplamente distribuídas na natureza, como em peixes de água fria, vegetais, grãos, líquens e bactérias. Elas ligam-se ao gelo, ajudando alguns organismos a sobreviver em ambientes muito frios, seja reduzindo a temperatura na qual os cristais de gelo se formam, seja modificando o tamanho e a forma dos cristais de gelo, de modo que o gelo seja menos nocivo aos tecidos (Hall-Manning *et al.*, 2004; EFSA 768, 2008).

A proteína estruturadora de gelo de tipo III foi isolada pela primeira vez do sangue do *Macrozoarces americanus*, um peixe encontrado na costa nordeste da América do Norte, e consiste em 12 isoformas que podem ser separadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). A isoforma HPLC-12 produz o pico maior e é a enzima funcionalmente mais ativa nos estudos *in vitro* sobre a estruturação do gelo (EFSA 768, 2008). Essa proteína é identificada pelo código de acesso P19614, do banco de dados Swiss Prot. Tem massa molecular de 7,027 kDa, não é glicosilada, é termoestável, estável no intervalo de pH 2-12 e consiste nos 66 aminoácidos apresentados a seguir:

NQASVVANQL IPINTALTLV MMRSEVVTPV GIPAEDIPRL VSMQVNRAVP LGTTLMPDMV KGYPPA

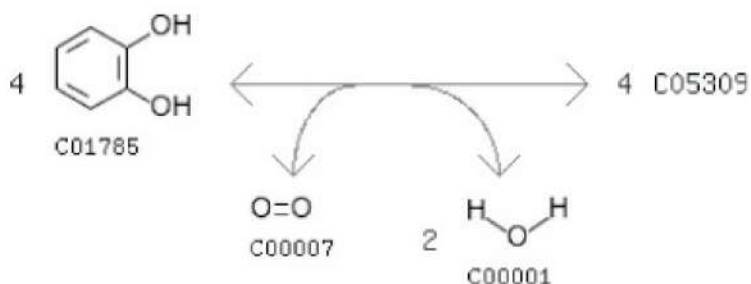
Essa isoforma da proteína estruturadora de gelo do *M. americanus* é preparada mediante fermentação de uma linhagem geneticamente modificada da levedura de panificação *S. cerevisiae*, em cujo genoma foi inserido um gene sintético para a proteína estruturadora de gelo. A proteína expressa pela levedura tem a mesma sequência de aminoácidos da proteína do peixe norte-americano, mas a sequência dos nucleotídeos foi construída de modo que favorecesse o uso dos códons da levedura, com o objetivo de maximizar a expressão. Ela é expressa e secretada no meio de cultura (EFSA 768, 2008, FDA-GRN 117). A proteína estruturadora de gelo produzida na linhagem de levedura recombinante é uma mistura de 60% de proteína não glicosilada com 40% de proteína glicosilada. Apenas a proteína não glicosilada é capaz de se ligar a cristais de gelo e alterar a estrutura do gelo.

É utilizada na fabricação de produtos gelados comestíveis, como sorvetes à base de creme, sorvetes à base de

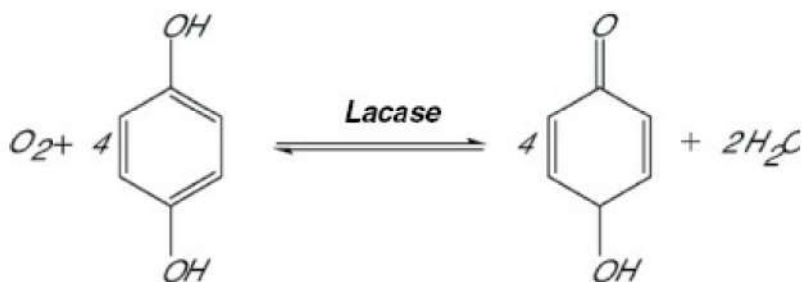
leite, sorvetes à base de água, sorvetes à base de frutas e outros tipos de sorvetes, sobremesas geladas e quaisquer produtos similares. Ela possibilita a elaboração de produtos com baixo teor de gordura, açúcar e calorias. De 2003 a 2007, mais de 470 milhões de produtos gelados comestíveis contendo a proteína estruturadora de gelo foram vendidos nos Estados Unidos, e 47 mil litros de sorvete à base de creme contendo a proteína estruturadora de gelo foram vendidos na Austrália e na Nova Zelândia (EFSA 768, 2008).

O. Lacase

As lacases (EC 1.10.3.2) são um grupo de oxidoredutases que contêm vários íons de cobre e agem sobre *o*-quinóis e *p*-quinóis e, muitas vezes, também sobre os aminofenóis e a fenilenediamina (KEGG R00083):

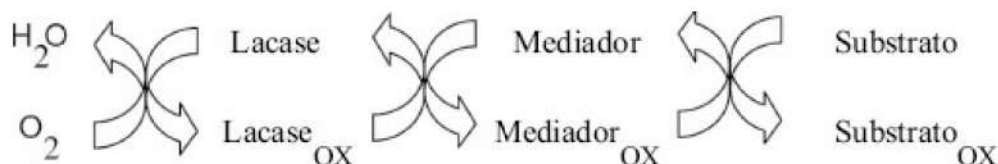


Ou:



A semiquinona pode reagir de modo enzimático ou não. As lacases catalisam a oxidação de uma ampla variedade de fenóis e outros substratos com a redução concomitante do oxigênio em água. Reações entre lacases e fenóis são comuns na natureza. Um exemplo que se destaca é a oxidação de fenóis de frutas e verduras por lacases com a formação de polímeros marrons, conhecido como escurecimento enzimático.

Nos produtos utilizados para refrescar o hálito, como as balas de hortelã, as gomas de mascar, as pastas dentais e os enxaguatórios bucais, a lacase reage com compostos polifenólicos de ocorrência natural em alimentos. As semiquinonas resultantes reagem com os compostos sulfurados voláteis causadores de odor presentes na cavidade oral, desodorizando-os e removendo o mau hálito (FDA-GRN 122):



Kunamneni *et al.* (2008)

Visto que as lacases têm a capacidade de catalisar a oxidação e a polimerização de fenóis e outras substâncias, elas são utilizadas em várias aplicações, como a clarificação de vinhos, a melhora do armazenamento da cerveja, a estabilização de sucos de frutas, a melhora das massas para a fabricação de pães e a produção de etanol. As lacases fúngicas são utilizadas para acelerar a polimerização de polifenóis na produção de bebidas como a cerveja, o vinho

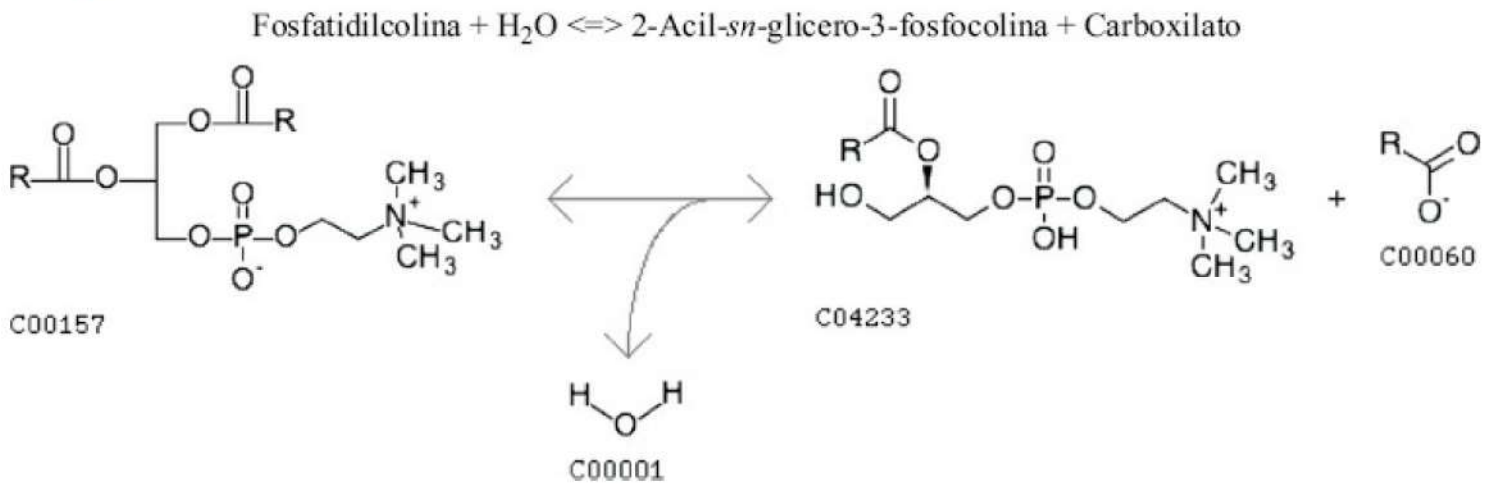
e o suco de maçã. Na clarificação dos vinhos, a lacase é utilizada para remover os fenóis do mosto de uvas brancas. A enzima também pode ser utilizada na remoção do oxigênio durante o processamento de alimentos, impedindo a oxidação de substâncias sensíveis e, ao mesmo tempo, preservando os compostos aromáticos ou evitando a formação de sabores indesejados (FDA-GRN 122).

Uma lacase transgênica foi produzida por fermentação submersa da linhagem *Aspergillus oryzae* How B711. Os três genes da TAKA-amilase dessa linhagem foram removidos, por meio do processo de interrupção do gene sítio dirigida, e fez-se a inserção do plasmídeo de expressão que codifica uma lacase de *Myceliophthora thermophila*. Com isso, o gene da lacase ficou sob o controle transcricional do promotor da TAKA-amilase de *A. oryzae* e do terminador da glicoamilase de *A. niger*.

P. Lipases

1. Fosfolipase A1

A fosfolipase A₁ (EC 3.1.1.32) hidrolisa a ligação *sn*-éster dos diacilfosfolipídeos, formando 2-acil-lisofosfolipídeo e ácido graxo livre (KEGG R01314):



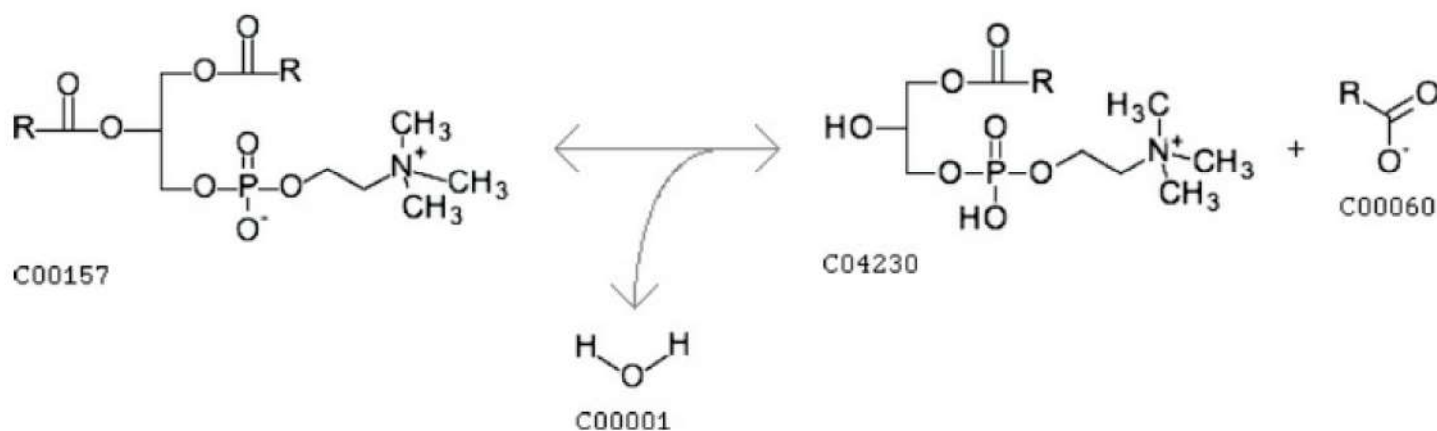
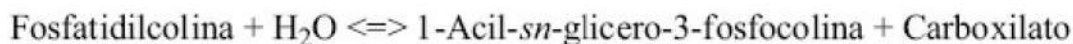
A fosfatidilcolina, muitas vezes chamada de lecitina, é composta de um esqueleto de glicerol esterificado a uma fosfocolina e a dois ácidos graxos, sendo um dos principais componentes da porção fosfolipídica da membrana celular.

O gene *FvPLA1*, oriundo do fungo *Fusarium venenatum*, foi utilizado na produção heteróloga da fosfolipase A₁ na linhagem de *A. oryzae* BECh2. O cassete de expressão contém um elemento promotor duplo, construído a partir do promotor *Pna2* [menos TATA] da amilase neutra II de *A. niger*, fundido na unidade *Pna2/TPI*, que corresponde ao promotor da amilase neutra II de *A. niger* no qual a parte 5' não traduzida foi substituída pela parte 5' não traduzida do promotor da triose fosfato isomerase (TPI) de *A. nidulans*. O gene *FvPLA1* da fosfolipase de *F. venenatum* é flanqueado em 3' pelo terminador da amiloglicosidase de *A. niger* (FDA-GRN 142).

A preparação enzimática tem o nome comercial Novozyme 46016 e age, em específico, sobre o ácido graxo da posição 1 dos fosfolipídeos. É utilizada na indústria de laticínios como auxiliar de processamento durante a produção de queijos, sendo adicionada ao leite. Os fosfolipídeos modificados do leite destinado à fabricação de queijos têm propriedades emulsificantes melhoradas e, dessa forma, tornam a produção mais eficiente ao reter mais componentes originais do leite no queijo e reduzir a perda de gordura e de outros sólidos que acompanham o soro do leite (FDA-GRN 142).

2. Fosfolipase A₂

A fosfolipase A₂ (EC 3.1.1.4) catalisa a hidrólise dos 3-*sn*-fosfolipídeos na posição 2, dando origem a 1-acil-3-*sn*-lisofosfolipídeos e ácidos graxos livres (KEGG R01313):



Embora a fosfolipase A₂ seja capaz de hidrolisar esses fosfolipídeos quando eles estão na forma monomérica, ela é muito mais ativa quando esses substratos estão organizados na forma de micelas ou em membranas lipídicas. A presença de íons cálcio é essencial para a atividade enzimática da fosfolipase A₂.

A linhagem de *A. niger* ISO-502 geneticamente modificada não produtora de protease e glicoamilase foi utilizada como linhagem hospedeira para expressar a fosfolipase A₂ suína. A sequência codificadora da fosfolipase A₂ suína deriva de uma biblioteca de cDNA do tecido pancreático e foi integrada a uma proteína de fusão. As sequências codificadoras dos 498 aminoácidos N-terminais do gene (*glaA*) da glicoamilase do *A. niger* estão ligadas ao gene da fosfolipase A₂ suína, por meio do sítio proteolítico sintético KEX2. A expressão dessa construção é regulada pelo promotor do gene *glaA* e a terminação eficaz do RNA é garantida pelo terminador do gene *glaA* que flanqueia 3', ambos derivados da linhagem parental de *A. niger*. A linhagem produtora, designada PLA-54, possui várias cópias do cassete de expressão e, como resultado disso, os níveis de expressão da enzima fosfolipase A₂ são comercialmente atrativos (FDA-GRN 183).

A unidade de expressão é traduzida em uma proteína de fusão glicoamilase-profosfolipase A₂. Durante a secreção dessa proteína pela célula microbiana, a protease endógena kexina separa a profosfolipase A₂ da glicoamilase no sítio proteolítico KEX2. Além disso, a parte “pro” da profosfolipase A₂ também é separada, resultando em uma enzima madura, ativa. A glicoamilase truncada secretada ainda tem atividade enzimática normal (FDA-GRN 183).

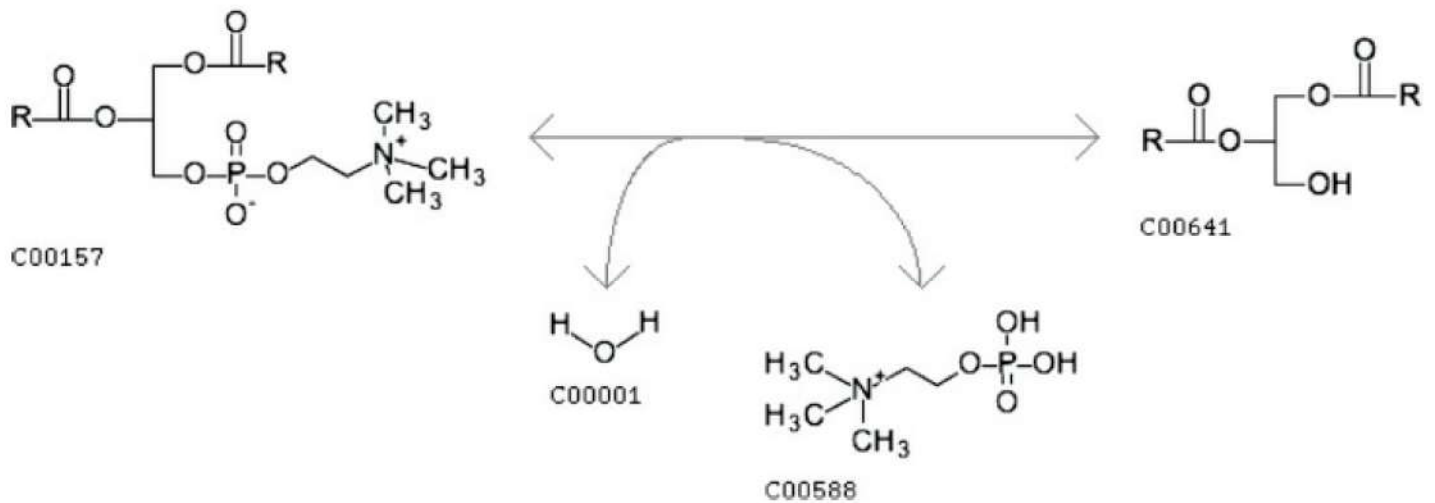
A fosfolipase A₂ suína heteróloga hidrolisa os fosfolipídeos naturais presentes nos alimentos, levando à formação de lisofosfolipídeos, agentes ativos de superfície com propriedades emulsificantes que imitam os efeitos dos emulsificantes químicos nos alimentos. Durante a mistura e a subsequente fermentação da massa do pão, a fosfolipase A₂ hidrolisa os fosfolipídeos presentes na farinha de trigo. Os lisofosfolipídeos resultantes reforçam a massa, melhorando a tolerância à mistura e ao processo mecânico do equipamento e a retenção de gás na massa. Como consequência, há um aumento no volume do pão, a crosta torna-se mais crocante e melhoram a textura e a maciez do miolo. Nos produtos finos de panificação feitos à base de gemas de ovos, a fosfolipase A₂ hidrolisa os fosfolipídeos presentes nos ovos que fazem parte da receita da massa batida e aerada. Essa ação contribui para a estrutura dos produtos derivados dessa massa, como pão de ló e *pound cakes*, por meio da incorporação e retenção eficientes de ar. A adição de fosfolipase A₂ aos molhos feitos à base de gema de ovo aumenta consideravelmente as propriedades emulsificantes, a estabilidade ao calor e a viscosidade (FDA-GRN 183). Os nomes comerciais dos

produtos em pó são Bakezyme e Cakezyme (dependendo da aplicação) e o produto líquido é vendido com o nome Maxapal A₂.

Outra fosfolipase A₂ heteróloga é produzida pela linhagem *Streptomyces violaceruber* AS-IO. Essa linhagem transporta um cassete de expressão que contém o gene codificador da enzima fosfolipase A₂ de *S. violaceruber*, regulado pelo promotor e pelo terminador da fosfolipase D de *Streptomyces cinnamoneum*. A preparação enzimática, denominada PLA2 Nagase, é utilizada como auxiliar de processamento no tratamento das gemas de ovos ou na hidrólise da lecitina. A gema de ovo tratada e a lecitina hidrolisada melhoram as propriedades emulsificantes e, por consequência, produzem um sabor melhor quando adicionadas a alimentos – como a maionese – e/ou aumentam a vida de prateleira do produto (FDA-GRN 212).

3. Fosfolipase C

As fosfolipases C (EC 3.1.4.3) catalisam a hidrólise de um fosfolípido, originando um diglicerídeo e fosfato de colina (KEGG R01312):

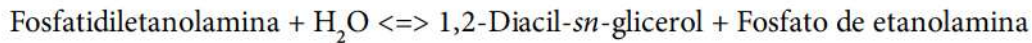


As fosfolipases C bacterianas também agem sobre a esfingomiéline e o fosfatidilinositol; a enzima oriunda do plasma seminal não age sobre o fosfatidilinositol.

Um fragmento genético que codifica as fosfolipases C, designado gene PLC BD1649, foi isolado de uma biblioteca de DNA do solo e transferido para *Pichia pastoris*, para criar a linhagem DVSA-PLC-004. As sequências específicas de DNA utilizadas na construção da linhagem incluem o gene codificador das fosfolipases C – proveniente de uma biblioteca ambiental – ligado à sequência do sinal de secreção do fator a de *S. cerevisiae*; um fragmento do gene da álcool oxidase de *P. pastoris* (3' *P.p.* *AOXI*); um gene marcador de seleção de *Pichia pastoris*, o gene *HIS4* (histidinol desidrogenase); e as sequências reguladoras não codificadoras e bem caracterizadas de *P. pastoris*, que englobam o promotor da álcool oxidase (*AOXI*) e o terminador transcricional de *AUXI* (FDA-GRN 204).

A preparação enzimática é utilizada na degomagem de óleos, a primeira etapa do processo de refino projetada para remover os fosfolípidos ou fosfatídeos contaminantes que poderiam interferir no processamento dos óleos com alto teor de fósforo, como os óleos de soja, canola, milho e girassol. A fosfolipase C BD 16449 catalisa a hidrólise da ligação fosfodiéster que une o glicerol às porções fosfato na posição *sn*-3 dos glicerofosfolípidos, como a fosfatidilcolina, a fosfatidiletanolamina, a fosfatidilserina e o ácido fosfatídico; por exemplo:





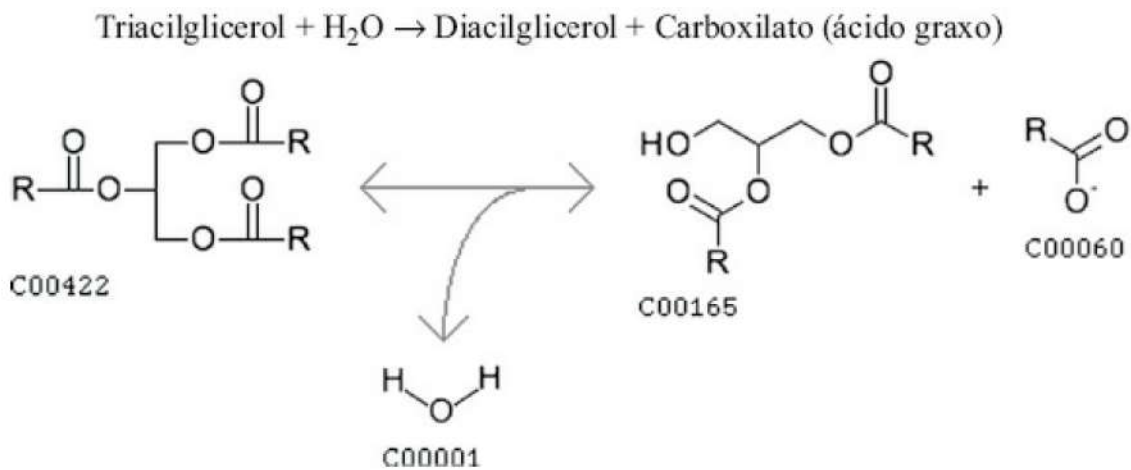
Os produtos da hidrólise são o diacilglicerol e os ésteres de fosfato solúveis em água, o que resulta nos seguintes benefícios:

- Redução da quantidade de fosfolipídeos da goma e da massa total da goma.
- Redução do fósforo total contido no óleo.
- Redução da massa total de óleo neutro arrastado na goma de fosfolipídeos.
- Aumento da quantidade de diacilglicerol contido no óleo.

Em consequência, a produção de óleo é maior e a necessidade de branqueamento é menor, o que leva à redução do uso de água, de terra de branqueamento e de recursos ambientais.

4. Triacilglicerol lipases

As triacilglicerol lipases (EC 3.1.1.3) catalisam a hidrólise de triglicerídeos, bem como de fosfolipídeos e galactolipídeos, agindo sobre as ligações éster (KEGG R01369):



As triglicerídeo lipases hidrolisam ésteres em solução aquosa; no entanto, também são conhecidas por catalisar a esterificação de ácidos graxos com alcoóis ou rearranjar os ácidos graxos de glicerídeos em certas condições, nas quais o teor de água é baixo (FDA-GRN 43). Portanto, a especificidade de uma lipase não é determinada apenas pela espécie química, mas também depende dos reagentes e das condições da reação. Por exemplo, em algumas reações, determinada lipase mostra especificidade posicional 1,3, enquanto em outras reações atua como lipase não específica.

O rearranjo dos ácidos graxos de glicerídeos pode melhorar as características físicas e nutricionais dos produtos à base de glicerídeos. As lipases são utilizadas na indústria de sucos de frutas, nos produtos de panificação, na fermentação de vegetais e em laticínios. Tradicionalmente, as lipases são adotadas na indústria de óleos e gorduras, onde são empregadas principalmente na catálise da clivagem dos ácidos graxos de triglicerídeos. Elas são usadas na degomagem de óleos comestíveis para remover os fosfolipídeos. Também podem ser utilizadas para melhorar as propriedades emulsificantes de ingredientes (como a lecitina e a gema do ovo) durante o processamento de alimentos. Na fabricação de pães, as enzimas melhoram a estabilidade e as propriedades de manuseio da massa e, com isso, o volume do pão e a homogeneidade de seu miolo (FSANZ A569). Atualmente, existem várias triacilglicerol lipases produzidas de maneira heteróloga na cadeia alimentar e as mais importantes serão discutidas na seção a seguir.

Uma preparação enzimática à base de triacilglicerol lipase recombinante é produzida por meio de fermentação submersa, utilizando-se uma linhagem selecionada da levedura *Hansenula polymorpha*; essa linhagem transporta o

gene que codifica uma triacilglicerol lipase do fungo *Fusarium heterosporum*. O gene original é resintetizado com otimização do uso do códon, para ser expresso na levedura. No cassete de expressão, o gene sintético codifica a mesma sequência de aminoácidos do gene original de *F. heterosporum* e está sob o controle de um promotor e um terminador originais de *H. polymorpha* (FDA-GRN 238, FSANZ A569). Essa preparação enzimática específica tem o nome comercial GRINDAMYLO POWERBake.

Comercializadas com o nome Panamore™, as triacilglicerol lipases transgênicas produzidas por *Aspergillus niger* são utilizadas por causa de sua capacidade de melhorar as propriedades dos produtos para panificação. Nesse caso, o hospedeiro *A. niger* transporta um gene que codifica uma pré-prolipase (o gene *lfs*) e foi construído sinteticamente, com base nas sequências de várias espécies de *Fusarium*. Sua expressão é controlada pelo promotor *glaA* da glicoamilase e pela sequência do terminador *glaA* que flanqueia 3', ambos oriundos da linhagem parental de *A. niger* (FDA-GRN 296).

Uma lipase derivada de *Candida antarctica* é produzida pela linhagem *A. niger* MBin118; que foi otimizada para expressar proteínas heterólogas, por meio da supressão do gene *pyrG* e da interrupção dos genes da glicoamilase, da amilase estável em meio ácido, do regulador de protease, da amilase neutra II e da amilase neutra I. A lipase de *C. antarctica* está sob o controle do promotor *Pna2/tpi* da amilase neutra II de *A. niger*; nesse promotor, a parte 5' não traduzida foi substituída pela parte 5' não traduzida do promotor da triose fosfato isomerase de *Aspergillus nidulans*. O terminador da amiloglicosidase de *A. niger* completa esse cassete de expressão. A preparação enzimática é comercializada com o nome Lipozyme e é indicada para a indústria de óleos e gorduras, com a função de melhorar as propriedades físicas e/ou nutricionais dos produtos à base de triglicerídeos (FDA-GRN 158).

Culturas de *Aspergillus oryzae* são utilizadas para produzir várias triacilglicerol lipases transgênicas, oriundas dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Rhizomucor miehei* e *Thermomyces lanuginosus* (antigamente conhecido como *Humicola lanuginosa*) (FSANZ A569, FDA-GRN 43, FSANZ A402).

Culturas da linhagem geneticamente modificada de *A. oryzae* H-1-52/c (sinônimo de AI-11) podem expressar o gene da triacilglicerol lipase de *T. lanuginosus*, sob o controle do promotor de TAKA-amilase de *A. oryzae* e a sequência do terminador da glicoamilase de *A. niger*. Há duas preparações enzimáticas derivadas dessas culturas comercializadas: a Lipozyme TL IM, para a interesterificação de gorduras puras ou produção de gorduras para fritura, gorduras e componentes da margarina; e a Novozym 677 BG, para aumentar a estabilidade da massa e o volume dos produtos de panificação, melhorar a maciez e a estrutura do miolo e tornar mais branco o miolo dos pães (FDA-GRN 43).

Uma triacilglicerol lipase de *F. oxysporum* é expressa de maneira heteróloga na linhagem de *A. oryzae* MStr115, que foi geneticamente modificada para não produzir amilase, protease alcalina e metaloprotease neutra I. Esse cassete de expressão está sob o controle do promotor do gene da amilase neutra II de *A. niger*, que está ligado à sequência-líder não traduzida da extremidade 5' do gene da triose fosfato isomerase de *A. nidulans*. A terminação da transcrição é garantida pelo terminador do gene da amiloglicosidase do *A. niger*. As preparações enzimáticas resultantes são comercializadas com os nomes Lipopan F, utilizada em panificação, e Lecitase Novo, empregada na indústria de gorduras e óleos para a degomagem do óleo vegetal, na hidrólise da lecitina para alterar as propriedades emulsificantes e na modificação da gema do ovo (FDA-GRN 75).

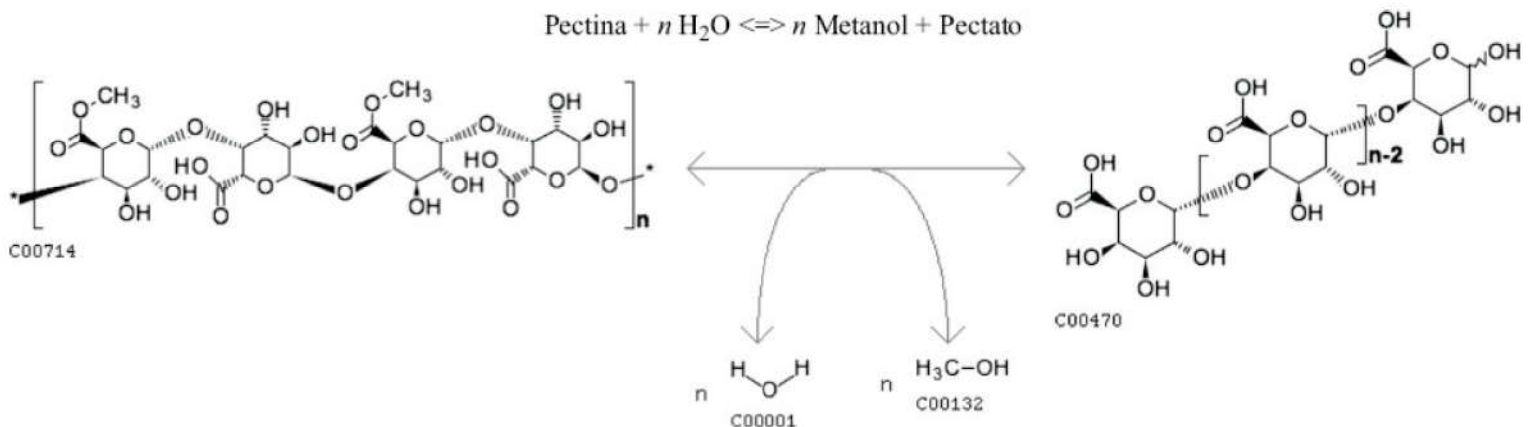
A triacilglicerol lipase de *R. miehei* expressa no *A. niger* é comercializada com o nome Palatase, mas, infelizmente, parece não haver informações disponíveis nos registros públicos sobre a natureza das construções genéticas (FSANZ A402).

Uma construção genética híbrida foi obtida dos fungos *T. lanuginosus* e *F. oxysporum* para a produção de uma triacilglicerol lipase que age, especificamente sobre o ácido graxo da posição 1, tanto de triglicerídeos quanto de fosfolipídeos (FDA-GRN 103). A proteína híbrida é constituída de 284 aminoácidos N-terminais, oriundos do

gene *Tli* da lipase de *T. lanuginosus*; esses aminoácidos estão ligados a 54 aminoácidos C-terminais, oriundos do gene *FoL* da lipase de *F. oxysporum*. Além disso, a sequência da lipase de *T. lanuginosus* foi modificada em três resíduos aminoácidos específicos: glicina¹¹³ → alanina, ácido aspártico¹¹⁸ → triptofano e ácido glutâmico¹²¹ → lisina. Lipopan H e Lecitase Ultra são os nomes comerciais das preparações utilizadas, respectivamente, na panificação e na indústria de gorduras e óleos. Na panificação, adota-se a atividade direcionada aos triglicerídeos e fosfolipídeos, enquanto nos óleos e gorduras, a atividade direcionada aos fosfolipídeos (fosfatídeos, lecitinas) predominará, como resultado das condições específicas do processamento. A especificidade da lipase direcionada aos ácidos graxos de cadeia longa da posição 1 é empregada na indústria da panificação; a tendência menor para liberar ácidos graxos de cadeia curta das ligações éster primárias de triglicerídeos e fosfolipídeos diminui o risco de geração de sabores indesejados nas fórmulas que contêm gordura de leite. Quando utilizada com óleos e gorduras, essa enzima apresenta maior atividade em relação aos fosfolipídeos, e alta eficácia, se aplicada na modificação da gema do ovo ou do ovo inteiro, na hidrólise da lecitina para alterar as propriedades emulsificantes e na degomagem de óleos vegetais (FDA-GRN 103).

Q. Pectinesterase

As pectinesterases (EC 3.1.1.11) catalisam a desesterificação da pectina em pectato e metanol. Elas hidrolisam a ligação éster entre o metanol e o ácido galacturônico da pectina esterificada (KEGG R02362):



A pectina é um dos principais componentes da parede da célula vegetal. Nas plantas, as pectinesterases desempenham papéis importantes no metabolismo da parede celular durante o amadurecimento das frutas. A desesterificação enzimática das pectinas produz uma pectina baixamente metoxilada que, na presença de íons cálcio, forma um gel forte. A conversão enzimática da pectina altamente metoxilada em pectina de baixo teor de metoxilação possibilita a formação do gel e pode tornar desnecessária a adição de mais agentes espessantes em produtos como geleias e molhos de tomate ketchup. A pectina esterase também dá firmeza a frutas e legumes, depois que se difunde pelo tecido vegetal (FDA-GRN 8).

Uma pectina esterase heteróloga é produzida pela linhagem de *Aspergillus oryzae* IFO 4177; que transporta o gene que codifica a pectina esterase de *Aspergillus aculeatus*. O cassete de expressão consiste no promotor do gene da TAKA-amilase de *A. oryzae*, acompanhado pelo gene da pectina esterase de *A. aculeatus* e pela sequência do terminador do gene da glicoamilase de *A. niger*. A preparação enzimática resultante é comercializada com o nome Rheozyme™ e utilizada na gelificação de materiais vegetais, no espessamento de preparações vegetais, no aumento da firmeza de frutas e legumes e na desmetilação controlada das pectinas altamente metoxiladas. Ela pode ser encontrada em preparações à base de frutas, compotas, sidra, geleias e tomates (FDA-GRN 8).

R. Pectina liase

A pectina é um heteropolissacarídeo encontrado em frutas; seus principais componentes são o ácido galacturônico e o metanol, havendo também alguns açúcares neutros, como a d-galactose, a l-arabinose e a d-xilose. As moléculas de pectina são formadas por ligações α -1,4-glicosídicas entre os anéis de piranose das unidades de ácido d-galacturônico. Essas cadeias de galacturonanas são interrompidas periodicamente pela inserção de resíduos α -l-ramnopiranosil com ligação do tipo 1,2. Os grupos carboxila da pectina estão parcialmente esterificados com metanol, enquanto os grupos hidroxila, às vezes, estão parcialmente acetilados.

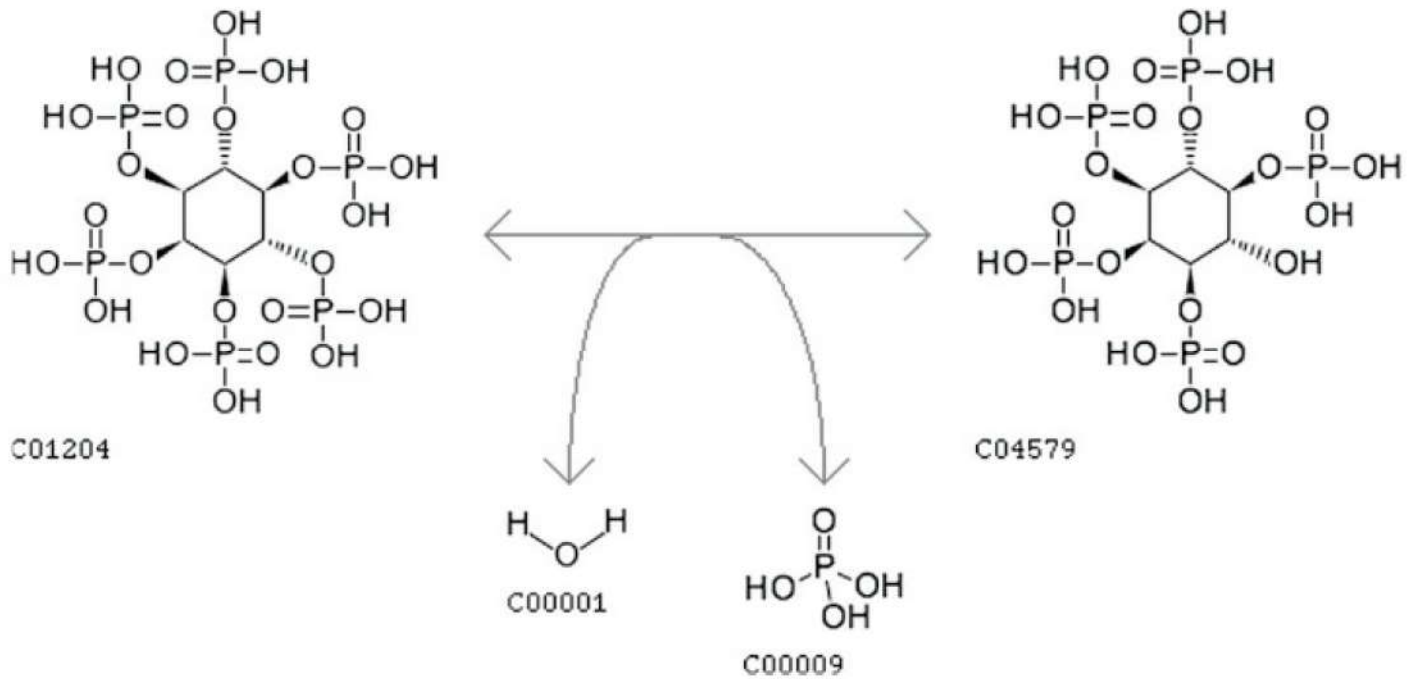
A pectina liase (EC 4.2.2.10) cliva o éster metílico da α -1,4-d-galacturonana em oligossacarídeos com grupos 4-desoxi-6-O-metil- α -d-galacto-4-enuronosil em suas extremidades não redutoras. Portanto, a enzima cliva o esqueleto do ácido poligalacturônico metilado da pectina esterificada, por meio de uma reação de transeliminação, e os oligômeros clivados contêm o grupo ácido 4,5-desidrogalacturônico em sua extremidade não redutora.

Uma pectina liase de *Trichoderma reesei* é produzida por *Aspergillus niger*. O gene (*pe/D*) da pectina liase do *T. reesei* na linhagem recombinante de *T. reesei* está sob o controle do promotor *cbhl*. Essa pectina liase é uma endoenzima de forte especificidade, com capacidade de clivar o ácido poligalacturônico altamente esterificado. No entanto, apenas as ligações glicosídicas adjacentes a um grupo éster metílico são rompidas. Por isso, a pectina liase mostra uma intensa atividade, direcionada apenas para as pectinas com elevado grau de esterificação. No caso da pectina solúvel em água esse grau é de 65-98%. A clivagem de somente um pequeno número de ligações glicosídicas provoca uma diminuição acentuada da viscosidade. Tal redução tem influência favorável tanto sobre a velocidade de filtração quanto sobre o coeficiente de transmissão de calor durante a fabricação do concentrado. Essa preparação enzimática específica à base de pectina liase heteróloga é utilizada no processamento de frutas e verduras em que há a necessidade de uma redução rápida da viscosidade. No processamento de sucos, há um aumento de seu rendimento e de compostos coloridos (FDA-GRN 32).

S. Fitases

Uma fitase (*mio*-inositol hexaquisfosfato fosfo-hidrolase) é qualquer tipo de fosfatase que catalisa a hidrólise do ácido fítico (hexaquisfosfato de *mio*-inositol), uma forma orgânica não digerível de fósforo encontrada em grãos e sementes oleaginosas, que libera uma forma aproveitável de fósforo inorgânico (Mullaney *et al.*, 2000a, b). A 4-fitase, também chamada de 6-fitase (EC 3.1.3.26), catalisa a seguinte reação (KEGG R03372):

Hexaquisfosfato de mio-inositol + H₂O \rightleftharpoons 1,2,3,5,6-pentaquisfosfato de inositol + Ortofosfato



Uma 6-fitase heteróloga de *Peniophora lycii* é produzida de maneira heteróloga na linhagem de *Aspergillus oryzae* Pz-3 (FSANZ A371) (EFSA, 2004). A expressão está sob o controle do promotor Pna2/TPI, construído com o promotor da amilase neutra II de *A. niger*, no qual a parte 5' não traduzida foi substituída pela parte 5' não traduzida do promotor da triose fosfato isomerase (TPI) de *Aspergillus nidulans*. Na Austrália e na Nova Zelândia, essa preparação enzimática é utilizada como auxiliar de processamento na indústria do amido (FSANZ A371). Ela também é conhecida como aditivo de rações para a engorda do gado monogástrico, melhorando a utilização do fósforo nos animais alimentados com dietas à base de cereais (nome comercial Bio-Feed).

T. Transglicosidase

As transglicosidases (EC 2.4.1.24) transferem um resíduo α -D-glicosil de uma α -1,4-D-glucana para o grupo hidroxil primário da glicose, livre ou combinada a uma α -1,4-D-glucana (KEGG).

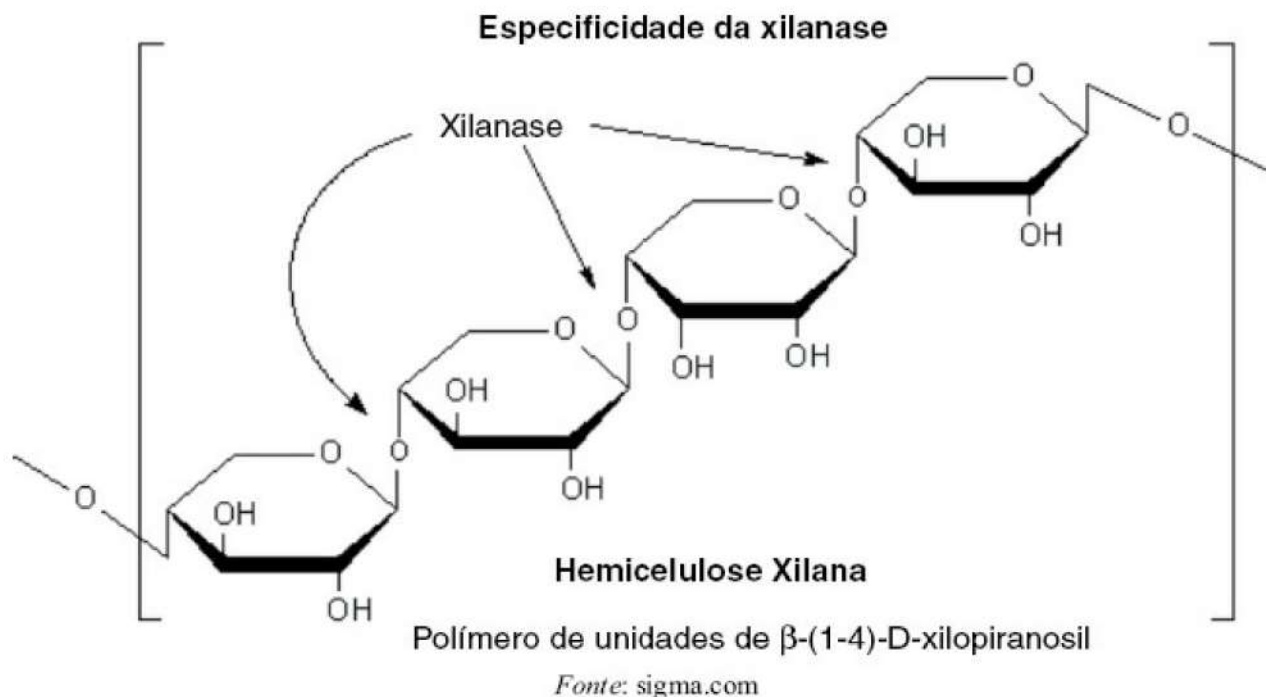
O gene da transglicosidase do *Aspergillus niger* foi expresso de maneira heteróloga na linhagem de *Trichoderma reesei* RL-P37, geneticamente modificada pela deleção de vários genes de celulase. O cassete de expressão contém o DNA que codifica a proteína transglicosidase madura de *A. niger*, proteína que está fundida no peptídeo-sinal CBHI de *T. reesei* para intensificar a secreção. Esse quadro de leitura aberto é flanqueado pelo promotor e pelas sequências do terminador do gene (*cbhl*) da celobio-hidrolase 1 de *T. reesei* (FDA-GRN 315).

A transglicosidase de *A. niger* age apenas sobre oligossacarídeos com grau baixo de polimerização (Goffin *et al.*, 2010). Essa transglicosidase catalisa a hidrólise e também a transferência de α -D-glico-oligossacarídeos, resultando em uma variedade de produtos (Goffin *et al.*, 2010). A transferência ocorre com maior frequência para a HO-6, produzindo isomaltose, a partir de D-glicose, e panose, a partir de maltose. A transglicosidase também pode transferir para a HO-2 ou HO-3 da D-glicose, para formar kojibiose ou nigerose, ou de volta para a HO-4, para formar maltose. A ação sobre a maltose produz uma concentração equimolar de panose e glicose. Como resultado da catálise da transglicosidase, os malto-oligossacarídeos são convertidos em isomalto-oligossacarídeos, que contêm quantidades elevadas de resíduos glicosil unidos por ligações do tipo α -D-1,6, a partir da extremidade não redutora. Portanto, os açúcares não fermentáveis, inclusive a rafinose e a estaquiose, são convertidos em sacarose, galactose, glicose e frutose, que podem, em seguida, ser fermentados em álcool (FDA-GRN 315). Em

consequência, a preparação é utilizada como auxiliar de processamento na produção de xarope de isomalto-oligossacarídeos, a partir do amido, e de álcool para bebidas, a partir do melão.

U. Xilanase

As xilanases (EC 3.2.1.8) hidrolisam as ligações β -1,4-d-xilosídicas do esqueleto da arabinoxilana:



O polissacarídeo linear β -1,4-d-xilana é um componente das hemiceluloses, principais constituintes da parede das células vegetais. As arabinoxilanas são xilanas altamente ramificadas encontradas em vários cereais e existem nas formas solúvel e insolúvel.

O gene da endo- β -1,4-xilanase de *Thermomyces lanuginosus* foi transferido para uma linhagem selecionada de *Fusarium venenatum* (nome comercial NOVOZYM 899) e também de *Aspergillus oryzae* (FDA-GRN 54), com o gene xilanase de *T. lanuginosus* sob o controle do promotor e do terminador do gene da tripsina de *F. oxysporum*. As preparações enzimáticas à base de xilanase heteróloga são utilizadas na indústria alimentícia, mais especificamente como auxiliar de processamento na panificação. A hidrólise das ligações xilosídicas do esqueleto da arabinoxilana resulta na despolimerização da arabinoxilana em oligossacarídeos menores. Como consequência, a elasticidade da malha de glúten aumenta, melhorando o manuseio da massa.

REFERÊNCIAS

- Agriculture and Agri-food Canada (as of 1 April 1997, the Canadian Food Inspection Agency), 1995. Monsanto Canada Inc.'s Glyphosate-tolerant soybean (*Glycine max* L.) Line GTS 40-3-2. DD95-05. (Available electronically at <http://www.cfia-acia.ca/english/food/pbo/bhome.html>.)
- Agriculture and Agri-food Canada, Food Production and Inspection Branch (as of 1 April 1997, the Canadian Food Inspection Agency), 1996. Monsanto Canada Inc.'s Roundup Herbicide-Tolerant Brassica napus Canola line GT200. DD96-07. (Available electronically at <http://www.cfia-acia.ca/english/food/pbo/bhome.html>.)
- Barry, G.F., Kishore G.M., 1997. Glyphosate tolerant plants. U.S. patent no. 5776760.
- Baulcombe, D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Baulcombe, D.C., 2007. Amplified silencing. *Science* 315, 199-200.
- Benfey, P.N., Chua, N.H., 1989. Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244, 174-181.
- Benfey, P.N., Chua, N.H., 1990. The cauliflower mosaic virus-35s promoter – combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250, 959-966.
- Birch, R.G., 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 48, 297-326.
- Bos, L., 1982. Crop losses caused by viruses. *Crop Protect.* 1, 263-282.
- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S.S., Soberon, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423-

- Cannon, R.J.C., 1996. *Bacillus thuringiensis* use in agriculture: a molecular perspective. *Biol. Rev.* 71, 561-636.
- Coulon, J., Husnik, J.I., Inglis, D.L., van der Merwe, G.K., Lonvaud, A., Erasmus, D.J., van Vuuren, H.J.J., 2006. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to minimize the production of ethyl carbamate in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 113-124.
- Crickmore, N., 2011. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Available at http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.
- Croon, K.S., 1996. Petition for Determination of Nonregulated Status: Insect-protected Roundup Ready Corn Line MON 802. USDA Petition No. 96-317-01P.
- Dale, P.J., Irwin, J.A., Scheffler, J.A., 1993. The experimental and commercial release of transgenic crop plants. *Plant Breeding* 111, 1-22.
- Davis, M.J., Ying, Z., 2004. Development of papaya breeding lines with transgenic resistance to Papaya ringspot virus. *Plant Dis.* 88, 352-358.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J.S., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Voinnet, O., 2006. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68-71.
- Della-Cioppa, G., Bauer, S.C., Klein, B.K., Shah, D.M., Fraley, R.T., Kishore, G.M., 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher-plants *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 6873-6877.
- de Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17, 193-199.
- de Souza, P.M., Magalhães, P.O., 2010. Application of microbial α -amylase in industry – a review. *Braz. J. Microbiol.* 41, 850-861.
- Devine, M.D., Shukla, A., 2000. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop Protect* 19, 881-889.
- Diderichsen, B., Christiansen, L., 1988. Cloning of a maltogenic alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56, 53-59.
- Dougherty, W.G., Parks, T.D., 1995. Transgenes and gene suppression – telling us something new. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 399-405.
- Dougherty, W.G., Lindbo, J.A., Smith, H.A., Parks, T.D., Swaney, S., Proebsting, W.M., 1994. RNA-mediated virus-resistance in transgenic plants – exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7, 544-552.
- Dröge-Laser, W., Siemeling, U., Puhler, A., Boer, I., 1994. Herbicide l-phosphinothricin (glufosinate) – identification, stability, and mobility in transgenic, herbicide-resistant, and untransformed plants. *Plant Physiol.* 105, 159-166.
- Duke, S.O., Powles, S.B., 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest. Manag. Sci.* 64, 319-325.
- Eamens, A., Wang, M.B., Smith, N.A., Waterhouse, P.M., 2008. RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiol.* 147, 456-468.
- EFSA, 2011. Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use. *EFSA J.* 9 (6), 20.
- EFSA, 2004. Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the safety of the change of strain of the producing micro-organism of the enzyme preparation Bio-Feed Phytase. *EFSA J.* doi:10.2903/j.efsa.2004.66.
- European Commission, Directorate General XXIV, Policy and Consumer Health Protection: Scientific Committee on Plants, 1998. Opinion of the Scientific Committee on Plants regarding submission for placing on the market of fodder beet tolerant to glyphosate notified by DLF-Trifolium. Monsanto and Danisco Seed (notification C/K/97/01) (Opinion expressed by SCP on 23 June 1998). (See: http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scp/out16_en.htm).
- European Commission, Directorate General XXIV, Policy and Consumer Health Protection: Scientific Committee on Plants, 1998. Opinion of the Scientific Committee on Plants regarding the genetically modified cotton tolerant to glyphosate herbicide notified by the Monsanto Company (notification C/ES/97/01) (Opinion expressed by the SCP on 14 July 1998). (See: http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scp/out17_en.htm).
- Fuchs, M., Gonsalves, D., 2007. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 173-202.
- Gatehouse, A.M.R., Ferry, N., Edwards, M.G., Bell, H.A., 2011. Insect-resistant biotech crops and their impacts on beneficial arthropods. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 366, 1438-1452.
- Gerlach, W.L., Llewellyn, D., Haseloff, J., 1987. Construction of a plant-disease resistance gene from the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Nature* 328, 802-805.
- Gill, S.S., Cowles, E.A., Pietrantonio, P.V., 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 615-636.
- Gilliland, G.L., Oliva, M.T., Dill, J., 1991. Functional implications of the three-dimensional structure of bovine chymosin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 306, 23-37.
- GMO Compass. Available at www.gmo-compass.org/.
- Goesaert, H., Slade, L., Levine, H., Delcour, J.A., 2009. Amylases and bread firming – an integrated view. *J. Cereal Sci.* 50, 345-352.
- Goffin, D., Wathelet, B., Blecker, C., Deroanne, C., Malmendier, Y., Paquot, M., 2010. Comparison of the glucooligosaccharide profiles produced from maltose by two different transglucosidases from *Aspergillus niger*. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment* 14 (4), 607-616.
- Golemboski, D.B., Lomonosoff, G.P., Zaitlin, M., 1990. Plants transformed with a tobacco mosaic-virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 6311-6315.
- Gonsalves, D., 1998. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 415-437.
- Gottula, J., Fuchs, M., 2009. Toward a quarter century of pathogen-derived resistance and practical approaches to plant virus disease control. *Adv. Virus Res.* 75, 161-183.
- Hall-Manning, T., Spurgeon, M., Wolfreys, A.M., Baldrick, A.P., 2004. Safety evaluation of ice-structuring protein (ISP) type IIIHPLC 12 preparation. Lack of genotoxicity and subchronic toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 42, 321-333.
- Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C., 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., Baulcombe, D., 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21, 4671-4679.
- Hannon, G.J., 2002. RNA interference. *Nature* 418, 244-251.
- Harrison, B.D., Mayo, M.A., Baulcombe, D.C., 1987. Virus-resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic-virus satellite RNA. *Nature* 328, 799-802.
- Harrison, L.A., Bailey, M.R., Naylor, M.W., Ream, J.E., Hammond, B.G., Nida, D.L., Burnette, B.L., Nickson, T.E., Mitsky, T.A., Taylor, M.L., Fuchs, R.L., Padgett, S.R., 1996. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4, is rapidly digested *in vitro* and is not toxic to acutely gavaged mice. *J. Nutr.* 126, 728-740.
- Hérout, C., Esdaile, D.J., Mallyon, B.A., Debruyne, E., Schulz, A., Currier, T., Hendrickx, K., Van Der Klis, R.J., Rouan, D., 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 41, 134-149.
- Hoerlein, G., 1994. Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino-acid with unexpected herbicidal properties. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 138, 73-145.
- Höfte, H., de Greve, H., Seurinck Jansen, J.S., Mahillon, J., Ampe, C., Vanderkerchove, J., Vanderbruggen, H., Montagu, M.V., Zabeau, M., Vaek, M., 1986. Structural and functional analysis of a cloned delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Eur. J. Biochem.* 161, 273-280.
- Hofte, H., Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242-255.
- Holt Editor-in-chief, J.G., 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. William and Wilkins, Baltimore.
- Hudspeth, R.L., Guala, J.W., 1989. Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C-4 photosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 12, 579-589.
- Husnik, J.I., Delaquis, P.J., Cliff, M.A., Van Vuuren, H.J.J., 2007. Functional analyses of the malolactic wine yeast ML01. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 42-52.
- ISAAA GM Approval Database. Available at <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>.
- James, C., 2009. Executive summary. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009. ISAAA Brief No. 41. ISAAA, Ithaca, NY.

- James, C., 2010. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. ISAAA Brief No. 42. ISAAA, Ithaca, NY.
- Johnson, S.R., Strom, S., Grillo, K., 2007. Quantification of the Impacts on US Agriculture and Biotechnology-Derived Crops in 2006. National Center for Food and Agriculture Policy, Washington, DC.
- Jonas, D.A., Antignac, E., Antoine, J.M., Classen, H.G., Huggett, A., Knudsen, I., Mahler, J., Ockhuizen, T., Smith, M., Teuber, M., Walker, R., De Vogel, P., 1996. The safety assessment of novel foods. Guidelines prepared by ILSI Europe Novel Food Task Force. *Food Chem. Toxicol.* 34, 931-940.
- Kaniewski, W.K., Thomas, P.E., 2004. The potato story. *AgBioForum* 7, 41-46.
- Kappeler, S.R., Van Den Brink, H.M., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhani, Z., Hansen, E.B., Johansen, E., 2006. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 647-654.
- Kessler, H.A., Pottage, J.C., Bick, J.A., Benson, C.A., 1992. Aids Part II. *Dis. Mon.* 38 691-674.
- Kishore, G.M., Shah, D.M., 1988. Amino-acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 627-663.
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., Sanford, J.C., 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic-acids into living cells. *Nature* 327, 70-73.
- Kollar, A., Dalmay, T., Burgyan, J., 1993. Defective interfering RNA-mediated resistance against cymbidium ringspot tomosvirus in transgenic plants. *Virology* 193, 313-318.
- Kunamneni, A., Camarero, S., Garcia-Burgos, C., Plou, F.J., Ballesteros, A., Alcalde, M., 2008. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microb. Cell Fact.* 7, 32.
- Lee, E.Y.C., Whelan, W.J., 1972. Glycogen and starch debranching enzymes. In: Boyer, P. (Ed.), *The Enzymes*, vol 3. Academic Press, New York, p. 191-234.
- Li, Z., Wang, M., Wang, F., Gu, Z., Du, G., Wu, J., Chen, J., 2007. γ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 245-255.
- Likitvivanavong, S., Chen, J.W., Evans, A.M., Bravo, A., Soberon, M., Gill, S.S., 2011. Multiple receptors as targets of cry toxins in mosquitoes. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2829-2838.
- Lin, S.S., Henriques, R., Wu, H.W., Niu, Q.W., Yeh, S.D., Chua, N.H., 2007. Strategies and mechanisms of plant virus resistance. *Plant Biotechnol. Rep.* 1, 125-134.
- Lindbo, J.A., Silvarosales, L., Proebsting, W.M., Dougherty, W.G., 1993. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants – implications for regulation of gene-expression and virus-resistance. *Plant Cell.* 5, 1749-1759.
- Maiti, I.B., Murphy, J.F., Shaw, J.G., Hunt, A.G., 1993. Plants that express a potyvirus proteinase gene are resistant to virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6110-6114.
- Malysenko, S.I., Kondakova, O.A., Nazarova, J.V., Kaplan, I.B., Taliansky, M.E., Atabekov, J.G., 1993. Reduction of tobacco mosaic-virus accumulation in transgenic plants producing nonfunctional viral transport proteins. *J. Gen. Virol.* 74, 1149-1156.
- McBride, K.E., Svab, Z., Schaaf, D.J., Hogan, P.S., Stalker, D.M., Maliga, P., 1995. Amplification of a chimeric bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio-Technology* 13, 362-365.
- McElroy, D., Rothenberg, M., Wu, R., 1990. Structural characterization of a rice actin gene. *Plant Mol. Biol.* 14, 163-171.
- Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, 1996. Current Status of Commercialization of Transgenic Crop Plants in Japan. (Available electronically at <http://ss.s.affrc.go.jp/docs/sentan/index.htm>).
- Monsanto, 1997. Petition for determination of nonregulated status: Roundup Ready Corn Line GA21 (submitted to United States Department of Agriculture, Petition No. 97-099-01P). (Copies of the documents are available from USDA-APHIS, Unit 147, 4700 River Road, Riverdale, Maryland 20737.)
- Mullaney, E.J., Daly, C.B., Sethumadhavan, K., Rodriguez, E., Lei, X.G., Ullah, A.H.J., 2000. Phytase activity in *Aspergillus fumigatus* isolates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 759-763.
- Mullaney, E.J., Daly, C.B., Ullah, A.H.J., 2000. Advances in phytase research. *Adv. Appl. Microbiol.* 47, 157-199.
- Nelson, R.S., Abel, P.P., Beachy, R.N., 1987. Lesions and virus accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of tobacco mosaic-virus. *Virology* 158, 126-132.
- Neuhaus, G., Spangenberg, G., Scheid, O.M., Schweiger, H.G., 1987. Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoids. *Theor. Appl. Genet.* 75, 30-36.
- Nida, D.L., Kolacz, K.H., Buehler, R.E., Deaton, W.R., Schuler, W.R., Armstrong, T.A., Taylor, M.L., Ebert, C.C., Rogan, G.J., Padgett, S.R., Fuchs, R.L., 1996. Glyphosate-tolerant cotton: genetic characterization and protein expression. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1960-1966.
- Obbard, D.J., Gordon, K.H.J., Buck, A.H., Jiggins, F.M., 2009. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 99-115.
- OECD, 1999. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to glyphosate herbicide. OECD, Safety Assessment of Transgenic Organisms, OECD Consensus Documents, vol. 1. OECD Publishing (2006).
- OECD, 2002. ENV/JM/MONO(2002)14. Available at www.oecd.org/dataoecd/17/39/46815748.pdf.
- OECD, 2010. Section 2, Molecular characterisation of plants derived from modern biotechnology. OECD, Safety Assessment of Transgenic Organisms, OECD Consensus Documents, vol. 3. OECD Publishing.
- Olempska-Ber, Z.S., Merker, R.I., Ditto, M.D., DiNovi, M.J., 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms – a review. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 45, 144-158.
- Oppert, B., 1999. Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 42, 1-12.
- Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X., Re, D.B., Lavalley, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholtz, D.A., Peschke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B., Kishore, G.M., 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.* 35, 1451-1461.
- Padgett, S.R., Re, D.B., Barry, G.F., Eichholtz, D.E., Delannay, X., Fuchs, R.L., Kishore, G.M., Fraley, R.T., 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready gene. In: Duke, S.O. (Ed.), *Herbicide-resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, and London, England, p. 53-84.
- Pariza, M.W., Johnson, E.A., 2001. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 33, 173-186.
- Parrish, S.K., Kaufmann, J.E., Croon, K.A., Ishida, Y., Ohta, K., Itoh, S., 1995. MON 37500: a new selective herbicide to control annual and perennial weeds in wheat. Brighton Crop Protection Conference, Weeds – 1995. Vols. 1-3, 57-63.
- Pollegioni, L., Schonbrunn, E., Siehl, D., 2011. Molecular basis of glyphosate resistance – different approaches through protein engineering. *FEBS J.* 278, 2753-2766.
- Potrykus, I., 1991. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 205-225.
- Powell-Abel, P., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T., Beachy, R.N., 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic-virus coat protein gene. *Science* 232, 738-743.
- Prins, M., Laimer, M., Noris, E., Schubert, J., Wassenegger, M., Tepfer, M., 2008. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol. Plant Pathol.* 9, 73-83.
- Pruser, K.N., Flynn, N.E., 2011. Acrylamide in health and disease. *Front. Biosci.* S3, 41-51.
- Register, J.C., Beachy, R.N., 1988. Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. *Virology* 166, 524-532.

- Sanford, J.C., 1990. Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant.* 79, 206-209.
- Sanford, J.C., Johnston, S.A., 1985. The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J. Theoret. Biol.* 113, 395-405.
- Sauer, H., Wild, A., Ruhle, W., 1987. The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis. 2. The causes of inhibition of photosynthesis. *Z. Naturforsch. C.* 42, 270-278.
- Scientific Committee on Food, 1992. Reports of the Scientific Committee on Foods (Twenty-sixth series). Food Science and Techniques. European Commission, Luxembourg.
- Sharma, H.C., Sharma, K.K., Crouch, J.H., 2004. Genetic transformation of crops for insect resistance: potential and limitations. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23, 47-72.
- Shea, K., 2009. Determination of Nonregulated Status for Papaya Genetically Engineered for Resistance to the Papaya Ringspot Virus. US Federal Register Volume 74 (168), 45163-45164.
- Singh, R.S., Sini, G.K., Kennedy, J.F., 2008. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydr. Polymers.* 73, 515-531.
- Soberon, M., Pardo, L., Munoz-Garay, C., Sanchez, J., Gomez, I., Porta, H., Bravo, A., 2010. Pore formation by cry toxins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 677, 127-142.
- Stalker, D.M., McBride, K.E., 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Klebsiella ozaenae* plasmid-borne gene encoding a nitrilase specific for the herbicide bromoxynil. *J. Bacteriol.* 169, 955-960.
- Stanley, J., Frischmuth, T., Ellwood, S., 1990. Defective viral-DNA ameliorates symptoms of geminivirus infection in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 6291-6295.
- Steinrucken, H.C., Amrhein, N., 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic-acid 3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94, 1207-1212.
- Svab, Z., Maliga, P., 1993. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 913-917.
- Swiegers, J.H., Pretorius, I.S., 2007. Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 954-960.
- Tachibana, K., Watanabe, T., Sekizawa, Y., Takematsu, T., 1986. Action mechanism of Bialaphos. 1. Inhibition of glutamine-synthetase and quantitative changes of free amino-acids in shoots of Bialaphos-treated Japanese barnyard millet. *J. Pest. Sci.* 11, 27-31.
- Taylor, N., Chavarriaga, P., Raemakers, K., Siritunga, D., Zhang, P., 2004. Development and application of transgenic technologies in cassava. *Plant Mol. Biol.* 56, 671-688.
- Tepfer, M., 2002. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 467-491.
- Then, C., 2010. Risk assessment of toxins derived from *Bacillus thuringiensis* – synergism, efficacy, and selectivity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 791-797.
- Tsoucaris, G., Le Bas, G., Rysanek, N., Villain, F., 1987. Conformational and enantiomeric discrimination in cyclodextrin inclusion compounds. *J. Inclusion Phenom.* 5, 77-84.
- USDA, 1994. Petition under 7CFR Part 340. Petition Number 93-258-01p, Monsanto, Soybean, Herbicide Tolerance, Glyphosate-tolerant. Approved 5/19/94. (See: <http://www.aphis.usda.gov/bbep/bp/petday.html>).
- USDA, 1995. Petition under 7CFR Part 340. Petition Number 95-045-01p, Monsanto, Cotton, Herbicide Tolerance, Glyphosate-tolerant. Approved 7/11/95. (See: <http://www.aphis.usda.gov/bbep/bp/petday.html>).
- USDA, 1997. Petition under 7CFR Part 340. Petition Number 96-317-01p, Monsanto, Cotton, Herbicide Tolerance, Glyphosate-tolerant. Approved 5/27/97. (See: <http://www.aphis.usda.gov/bbep/bp/petday.html>).
- USDA, 2011. Adoption of genetically engineered crops in the US. Available at <http://www.ers.usda.gov/Data/BiotechCrops/>.
- US EPA, 1996. Plant pesticide inert ingredient CP4 enolpyruvylshikimate-3-3 and the genetic material necessary for its production in all plants. Federal Register, vol. 61, No. 150, p. 40338-40340. (Available electronically at <http://www.access.gpo.gov>.)
- US EPA, 1997. Phosphinothricin acetyltransferase and the genetic material necessary for its production in all plants – exemption from the requirement of a tolerance on all raw agricultural commodities. Federal Register 70, 17717-17720.
- Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I.H., Ji, T.H., Bulla, L.A., 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270, 5490-5494.
- Vaeck, M., Reynaerts, A., Hofte, H., Jansens, S., Debeuckeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Vanmontagu, M., Leemans, J., 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328, 33-37.
- Vardi, E., Sela, I., Edelbaum, O., Livneh, O., Kuznetsova, L., Stram, Y., 1993. Plants transformed with a cistron of a potato virus-Y protease (Nia) are resistant to virus-infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 7513-7517.
- Voinnet, O., 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* 17, 449-459.
- Voinnet, O., 2005. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet.* 6, 206-220.
- Voinnet, O., 2008. Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 464-470.
- Waterhouse, P.M., Smith, N.A., Wang, M.B., 1999. Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends Plant Sci.* 4, 452-457.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B., Lough, T., 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, 834-842.
- Waterworth, H., Hadidi, A., 1998. Economic losses due to plant viruses. In: Hadidi, A., Khetarpa, R.K., Koganezawa, H. (Eds.), *Plant Virus Disease Control*, APS Press, p. 13.
- Whalon, M.E., Wingerd, B.A., 2003. Bt: mode of action and use. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 54, 200-211.
- WHO Food Additives Series 40, 1998. World Health Organization International Program on Chemical Safety, Committee on Food Additives (JECFA). Safety evaluation of certain food additives and contaminants: Maltogenic Amylase Report available under <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v040je06.htm>.
- Wilmink, A., Vandeven, B.C.E., Dons, J.J.M., 1995. Activity of constitutive promoters in various species from the Liliaceae. *Plant Mol. Biol.* 28, 949-955.
- Wong, E.Y., Hironaka, C.M., Fischhoff, D.A., 1992. *Arabidopsis thaliana* small subunit leader and transit peptide enhance the expression of *Bacillus thuringiensis* proteins in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 20, 81-93.
- Zaccamer, B., Cellier, F., Boyer, J.C., Haenni, A.L., Tepfer, M., 1993. Transgenic plants that express genes including the 3' untranslated region of the turnip yellow mosaic-virus (Tymv) genome are partially protected against Tymv infection. *Gene* 136, 87-94.
- Zambryski, P.C., 1992. Chronicles from the agrobacterium-plant cell-DNA transfer story. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 465-490.
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Vanmontagu, M., Schell, J., 1983. Ti-plasmid vector for the introduction of DNA into plant-cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- Zhang, B.Y., Chen, M., Zhang, X.F., Luan, H.H., Tian, Y.C., Su, X.H., 2011. Expression of Bt-Cry3A in transgenic *Populus alba* × *P. glandulosa* and its effects on target and non-target pests and the arthropod community. *Transgen. Res.* 20, 523-532.
- Zhang, W., Wu, R., 1988. Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. *Theor. Appl. Genet.* 76, 835-840.
- Zimmerli, B., Schlatter, J., 1991. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mutat. Res.* 259, 325-350.

Capítulo 1

* *Department of Nutrition and Food Science, Wayne State University, Detroit, Michigan, USA* †*Department of Nutrition and Food Studies, George Mason University, Fairfax, Virginia, USA* ***Department of Nutrition and Food Science, University of Maryland, College Park, Maryland, USA* ‡*Department of Human Nutritional Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada*

Capítulo 2

† *Department of Human Nutritional Sciences, Faculty of Human Ecology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada*
‡ *Swiss Federal Research Station, Switzerland*

Capítulo 3

‡ *Department of Human Nutritional Sciences, Faculty of Human Ecology, University of Manitoba, Winnipeg, Canada*
† *Department of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Canada*

Capítulo 4

§ *Department of Human Nutritional Sciences, Faculty of Human Ecology, University of Manitoba, Winnipeg, Canada*
† *University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada*

Capítulo 5

¶ *Department of Food Science, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada*

Capítulo 6

** *Department of Human Nutritional Sciences, Faculty of Human Ecology, University of Manitoba, Winnipeg, Canada*
† *Food Science Department, Cook College, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA*
** *Department of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland, Canada*

Capítulo 7

†† GGStewart Associates, 13 Heol Nant Castan, Rhiwbina, Cardiff, UK

Capítulo 8

‡‡ *Department of Food Science, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada

Capítulo 9

§§ *Department of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland, Canada

Capítulo 10

¶¶ *Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil*

Capítulo 11

*** Department of Food Science, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, EUA, †Department of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland, Canada, **Department of Human Nutritional Sciences, Faculty of Human Ecology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

Capítulo 12

††† *Department of Food Science and Technology, Oregon State University, Corvallis, Oregon, EUA, †CICATA-IPN Unidad Queretaro, Colonia Colinas del Cimatario, Queretaro, Mexico, **Department of Human Nutritional Sciences, Faculty of Human Ecology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada*

Capítulo 13

‡‡‡ *Department of Human Nutritional Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, Canada*