



**ENZIMAS E PROTEÍNAS COMERCIAIS,  
ORIUNDAS DE MICRORGANISMOS  
GENETICAMENTE MODIFICADOS,  
DESTINADAS À INDÚSTRIA  
ALIMENTÍCIA**

## INTRODUÇÃO

- Enzimas são muito utilizadas no processamento de alimentos e na produção de ingredientes alimentares;
- Muitas vezes, as enzimas são obtidas de **microrganismos não facilmente cultiváveis sob as condições industriais**, ou que produzem **subprodutos tóxicos**;
- A construção de **linhagens recombinantes** possibilita a produção eficiente de enzimas substancialmente livres de subprodutos ou outros metabólitos microbianos indesejáveis;
- 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, a engenharia genética tem contribuído para que esse objetivo seja alcançado**;
- As mesmas considerações de segurança são aplicáveis às enzimas provenientes de **microrganismos originais e recombinantes**.



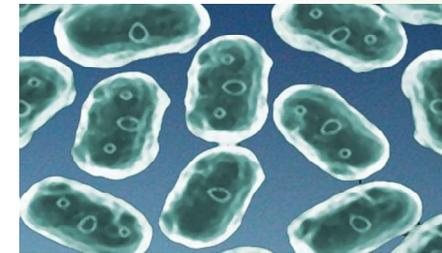
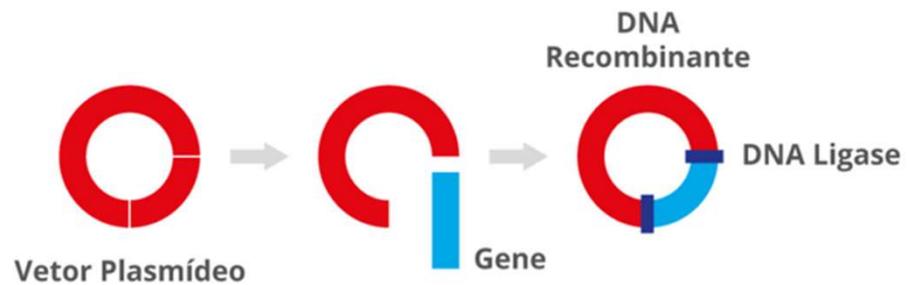
## OS PRINCÍPIOS DA CLONAGEM MOLECULAR: **DNA RECOMBINANTE**

- **A clonagem molecular é uma técnica da engenharia genética conhecida também por DNA recombinante**
- **Etapas da clonagem molecular**
  - 1. Cortar o DNA-alvo em locais precisos**



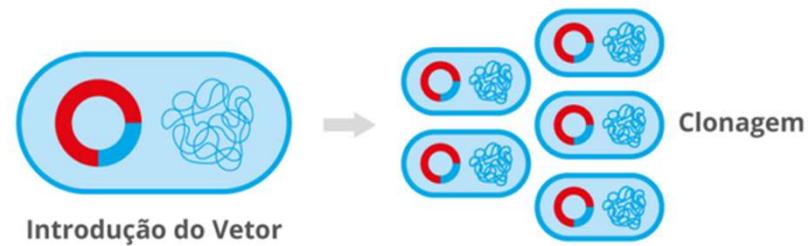
## 2. Juntar dois fragmentos de DNA de modo covalente (unir o gene ao vetor plasmidial)

Plasmídeos são pequenos pedaços circulares de DNA que se replicam independentemente do cromossomo da célula hospedeira, têm importante papel como vetores de clonagem e são amplamente utilizados na biologia molecular.



### 3. Transportar o DNA recombinante do tubo de ensaio para uma célula hospedeira que irá proporcionar maquinaria enzimática para a replicação do DNA.

Alguns exemplos de células hospedeiras são as bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



### 4. Multiplicação ou expressão do gene



## MICROORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS E PRODUTOS DERIVADOS DESTINADOS A USO ALIMENTAR

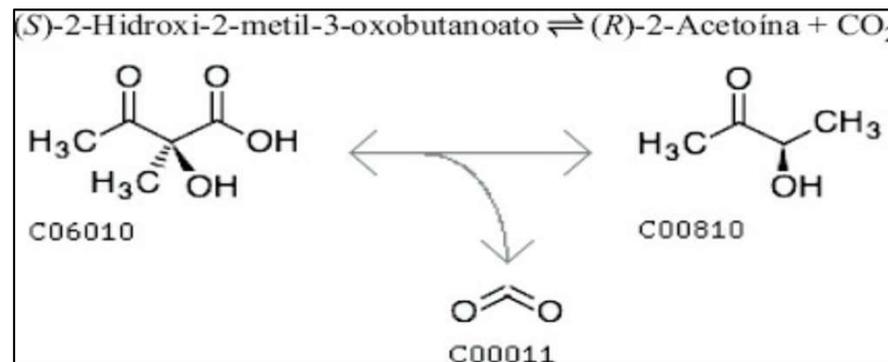
A Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA, 2011) define quatro categorias de **Microrganismos Geneticamente Modificados (MGMs)**:

- **Categoria 1:** Compostos purificados quimicamente e suas misturas, dos quais tanto MGMs quanto genes recém-introduzidos foram removidos (**por exemplo, aminoácidos, vitaminas**).
- **Categoria 2:** Produtos complexos, nos quais tanto os MGMs quanto genes recém-introduzidos não estão mais presentes (**por exemplo, extratos de células, a maioria das preparações enzimáticas**).
- **Categoria 3:** Produtos derivados de MGMs nos quais os MGMs capazes de multiplicação ou de transferência de genes não estão presentes, mas os genes recém-introduzidos ainda estão presentes (**por exemplo, culturas iniciadoras [starter] inativadas pelo calor**).
- **Categoria 4:** Produtos que consistem em MGMs ou que contêm MGMs capazes de multiplicação ou de transferência de genes (**por exemplo, culturas iniciadoras vivas para alimentos fermentados, destinados a humanos e animais**).

Vários microrganismos são utilizados, atualmente, como fonte de **enzimas recombinantes**.

## 1. Acetolactato descarboxilase

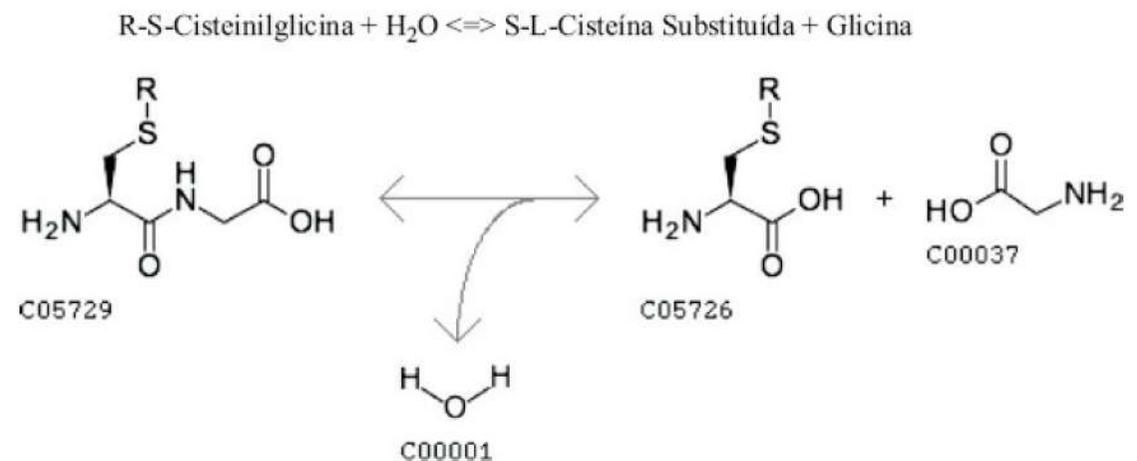
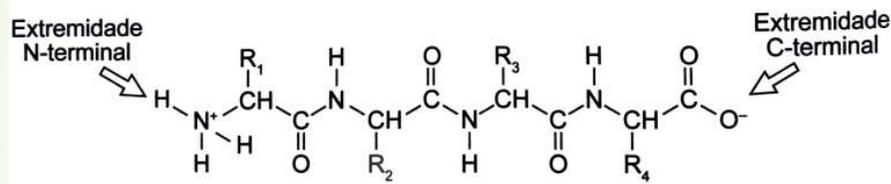
- A acetolactato descarboxilase (EC 4.1.1.5) diminui o aroma indesejável de **manteiga de diacetila**, que ocorre como um subproduto da fabricação da cerveja, pela conversão de diacetila (acetolactato) em **acetoína**, de sabor neutro;
- Durante o armazenamento da cerveja, o aroma de diacetila é **lentamente 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 acetolactato descarboxilase do *Bacillus brevis* (21 CFR 173.115).

## 2. Aminopeptidases

- As aminopeptidases clivam um único aminoácido da extremidade N-terminal de uma proteína ou peptídeo.



- 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.
- Entre as diversas peptidases recombinantes produzidas estão a **aminopeptidase (PepN)**, oriunda das linhagens *Lactobacillus rhamnosus* S93, *Lactococcus lactis* (FDA 21CFR184.1985) e *Aspergillus sojae* (Patente europeia 0967286).

### 3. Carboxipeptidases

As carboxipeptidases pertencem à subclasse das peptidases que hidrolisam as extremidades **C-terminal** de cadeias polipeptídicas. Também são chamadas de exopeptidases.

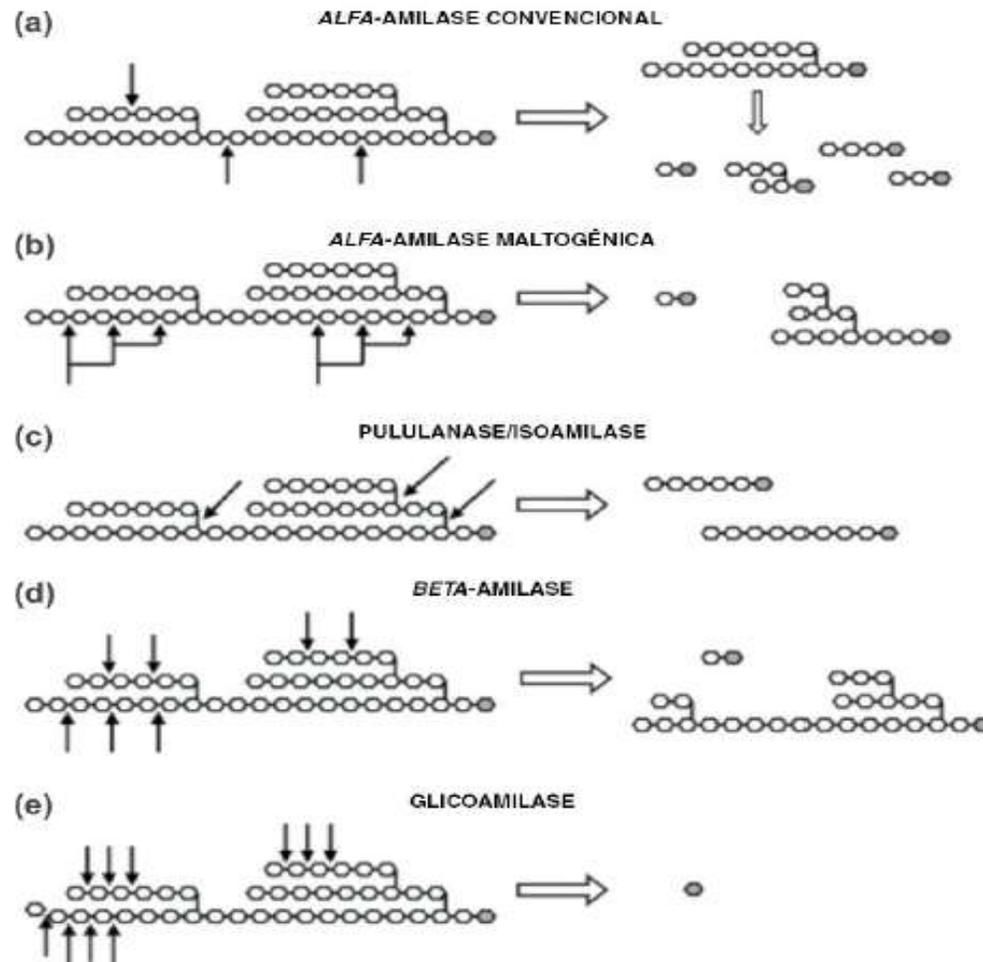
A preparação enzimática à base de carboxipeptidase comercializada com o nome **Accelerzyme CPG**, deriva de culturas geneticamente modificadas de *Aspergillus niger*.

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.

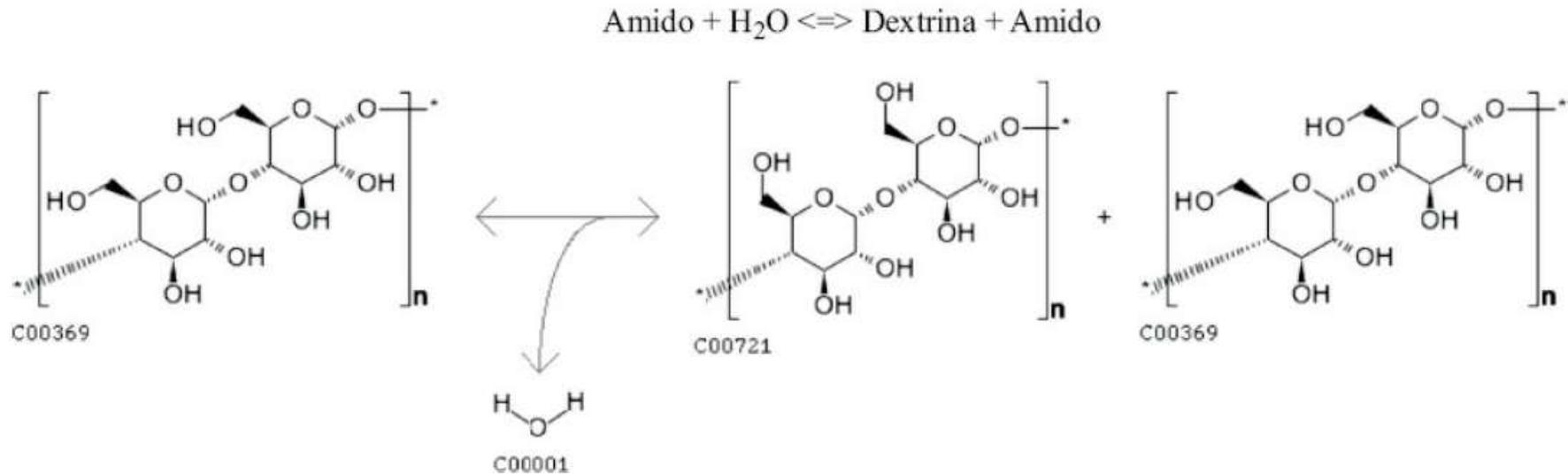


## 4. $\alpha$ -Amilases

- As amilases são enzimas amilolíticas que hidrolisam amido em açúcares e são encontradas em todo o reino animal, vegetal e em microrganismos.



- 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.

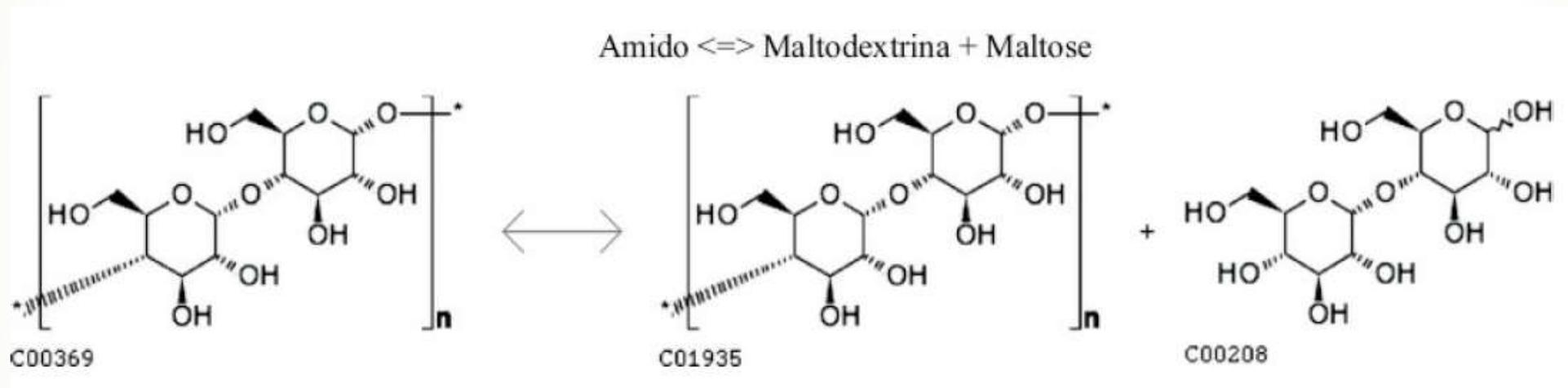


- Diversos mutantes recombinantes produtores de  $\alpha$ -amilase criados por engenharia genética para aplicações específicas são produzidos atualmente, utilizando-se *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Pseudomonas fluorescens*.
- O gene da  $\alpha$ -amilase (amyl) do *B. licheniformis* normalmente é utilizado como transgene e modelo para modificações.

- A **Termamyl SC** é uma preparação elaborada com a  $\alpha$ -amilase termoestável de *Bacillus stearothermophilus*, produzida por *B. licheniformis* (GRASP 0G0363, FDA-GRN 24).
- A **Termamyl LC** é uma preparação elaborada com a  $\alpha$ -amilase termoestável de *B. licheniformis*, produzida por *B. licheniformis* geneticamente modificada (FDA-GRN 22).
- A enzima  $\alpha$ -amilase do **Novozym 28035** apresenta substituições em mais quatro aminoácidos, quando comparada à precursora, a  $\alpha$ -amilase Termamyl LC, porém apresentam aplicações equivalentes (FDA-GRN 79).

## 5. $\beta$ -Amilases

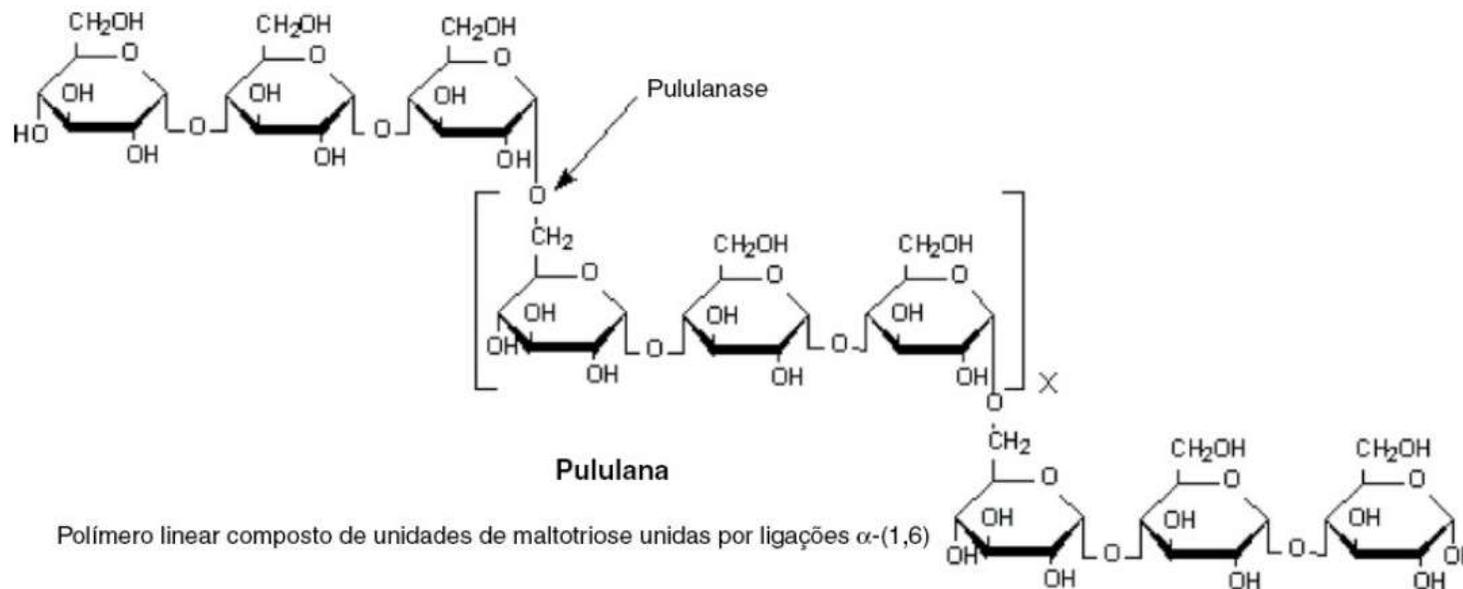
As  $\beta$ -amilases (EC 3.2.1.2) ou amilases maltogênicas atuam na extremidade não redutora do amido, glicogênio, e polissacarídeos e oligossacarídeos relacionados, formando  $\beta$ -maltose (duas unidades de glicose).



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 (FDA-GRASP 7G0326).

## 6. Pululanases

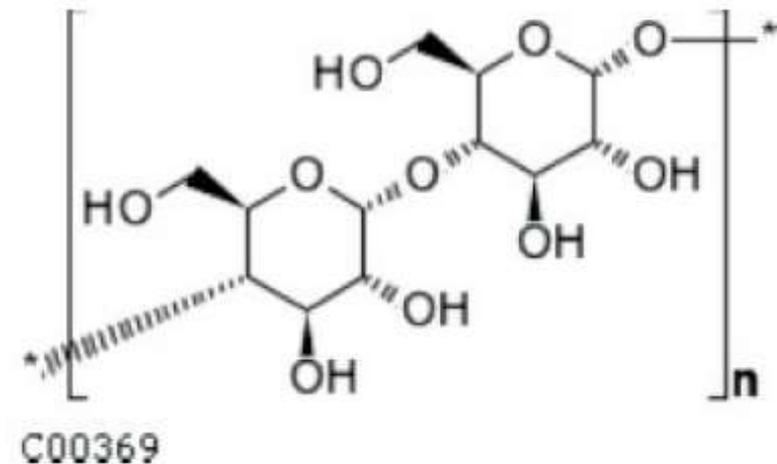
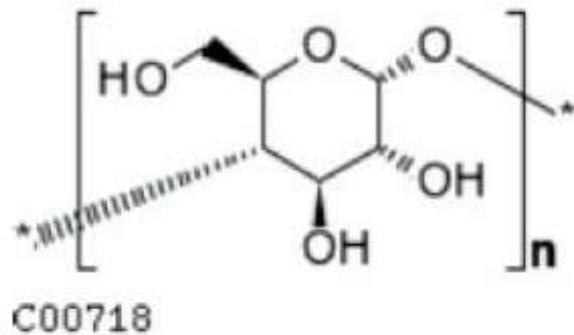
- As pululanases (EC 3.2.1.41) são exoenzimas amilolíticas, que degradam a pululana, a amilopectina, dextrinas limite da amilopectina;
- As pululanases clivam as ramificações das moléculas de amilopectina do Amido ( $\alpha$ -1,6), produzindo cadeias de amilose e, por isso, são denominadas enzimas desramificantes.



- **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).**

## 7. Glicosiltransferase ramificante

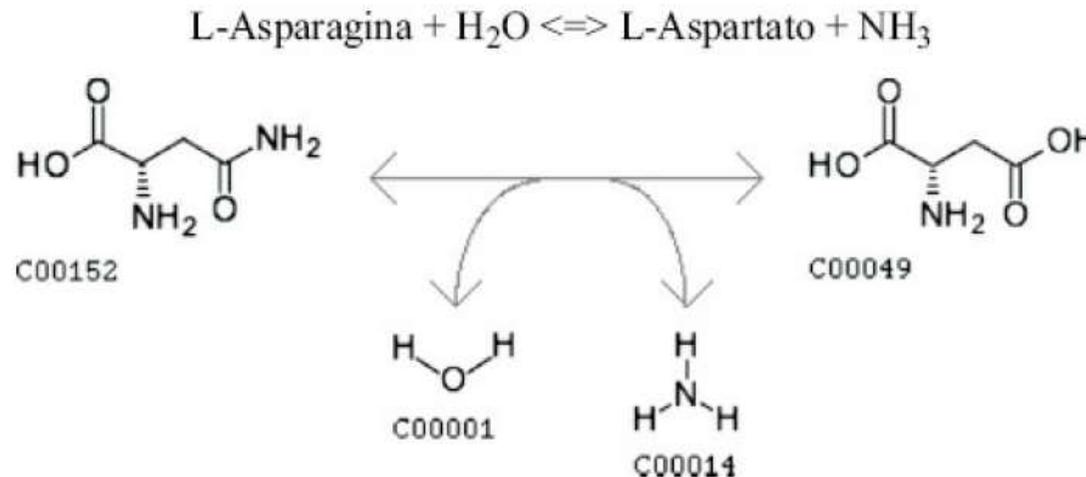
- A glicosiltransferase ramificante (EC 2.4.1.18) de *Rhodothermus obamensis* produzida pelo *B. subtilis* é utilizada como enzima na indústria do amido para obter dextrinas com propriedades físicas melhoradas, como solubilidade mais alta, viscosidade mais baixa e retrogradação reduzida (FDA-GRN 274);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



## 8. Asparaginase

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.

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



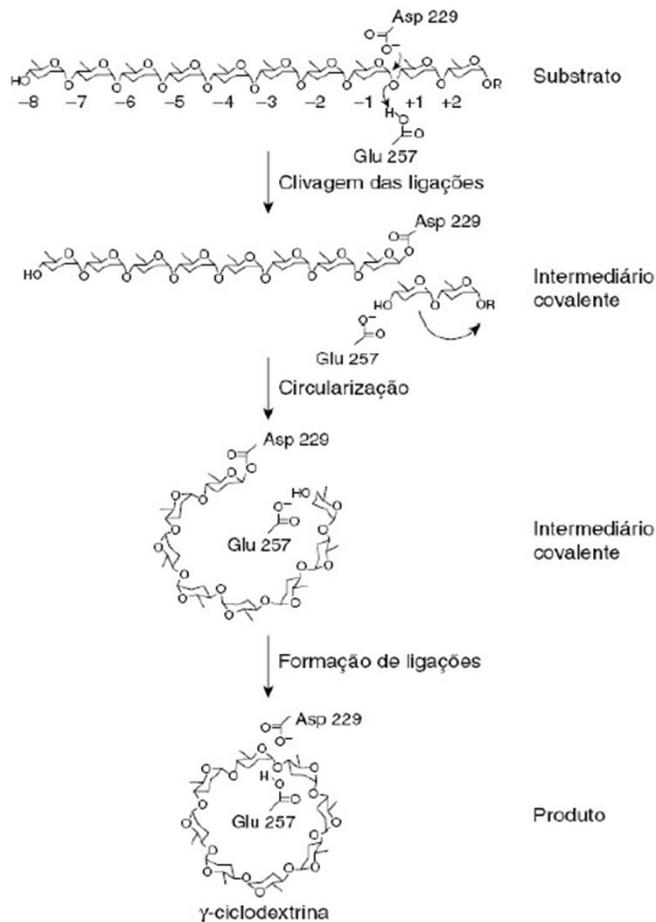
As preparações à base de asparaginase são comercializadas com os nomes **Acrylaway e PreventASe**. Essa última é fabricada com o auxílio do fungo geneticamente modificado *Aspergillus niger*.

## 8. Proteinase aspártica

- A proteinase aspártica clonada, oriunda de *Rhizomucor miehei*, e expressa 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"**.
- 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 **ela amacie excessivamente a carne** (FDA-GRN 34).

## 9. 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.



**Nos Estados Unidos, preparações dessas enzimas são elaboradas com a linhagem *E. coli* K12 recombinante, a qual expressa o gene que codifica a  $\alpha$ -CGTase da *Klebsiella oxytoca* (FDA-GRN 155). A enzima é totalmente removida da ciclodextrina final.**

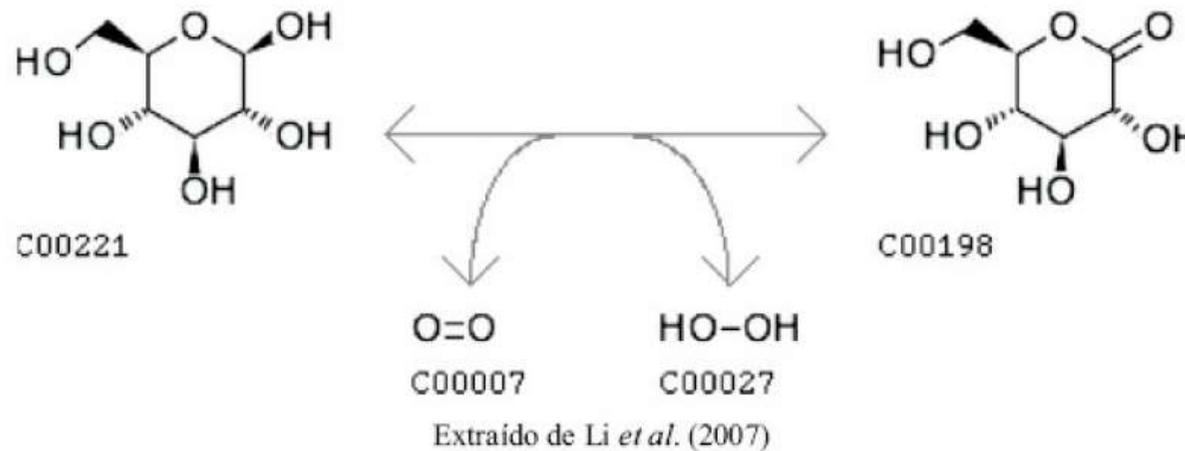
## 10. Quimosina

- 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 Phe<sup>105</sup>-Met<sup>106</sup> da k-caseína;
- 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 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 21CFR 184.1685).



## 11. Glicose oxidase

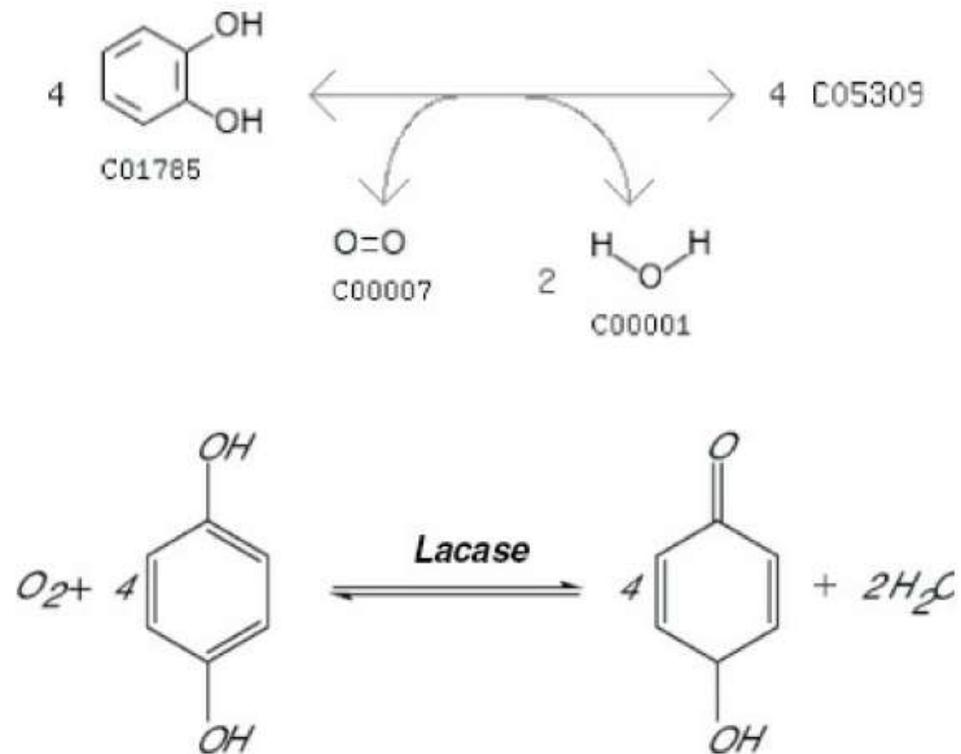
- A glicose oxidase (EC 1.1.3.4) é uma oxidorredutase que catalisa a oxidação da glicose em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e D-glucono-1,5-lactona.



- A glicose oxidase também é utilizada na remoção da d-glicose da clara do ovo, eliminar o oxigênio das embalagens de alimentos.
- A glicose oxidase recombinante é produzida pela linhagem *Aspergillus oryzae* BECh2 geneticamente modificada.

## 12. Lacase

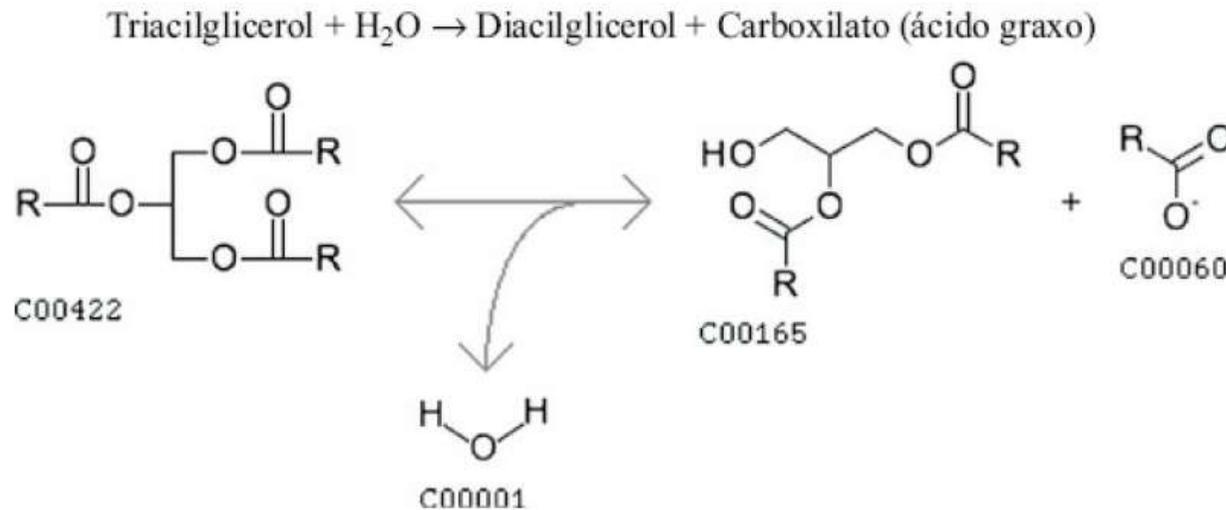
As lacases (EC 1.10.3.2) são um grupo de oxidorredutases que agem sobre *o*-quinóis e *p*-quinóis e, muitas vezes, também sobre os aminofenóis e a fenilenodiamina.



- 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**.
- Uma **lacase transgênica** foi produzida por fermentação submersa da linhagem *Aspergillus oryzae* How B711.

## 13. Lipases

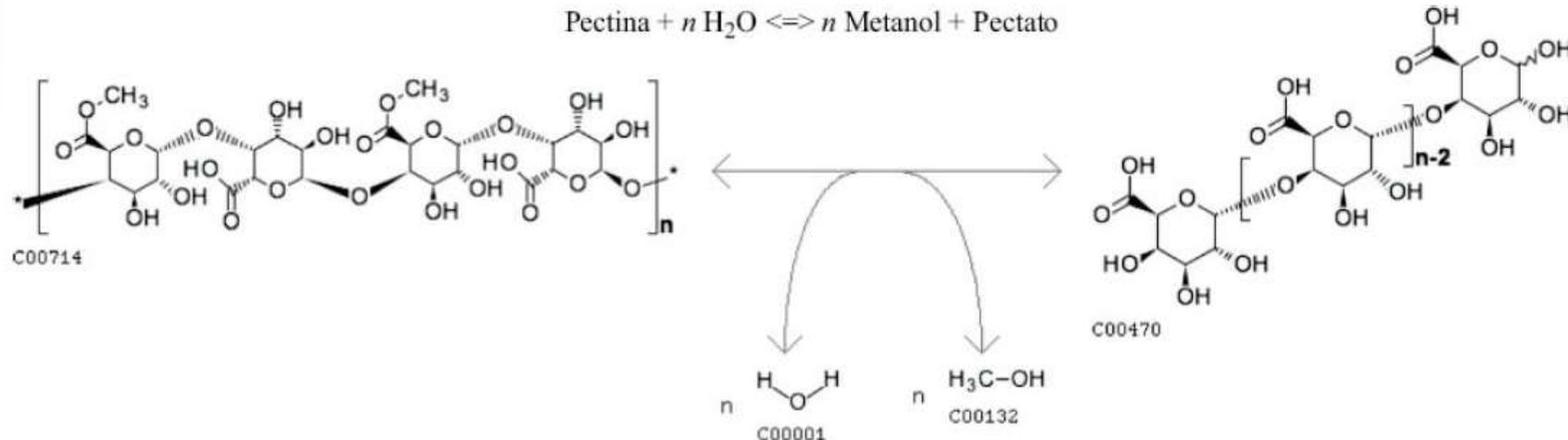
- As triacilglicerol lipases (EC 3.1.1.3) catalisam a hidrólise de triglicerídeos, bem como de fosfolipídeos e galactolipídeos, agindo sobre as ligações éster.



- 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.
- Culturas de *Aspergillus oryzae* são também utilizadas para produzir várias lipases transgênicas, oriundas dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Rhizomucor miehei* e *Thermomyces lanuginosus*.

## 14. Pectinesterase

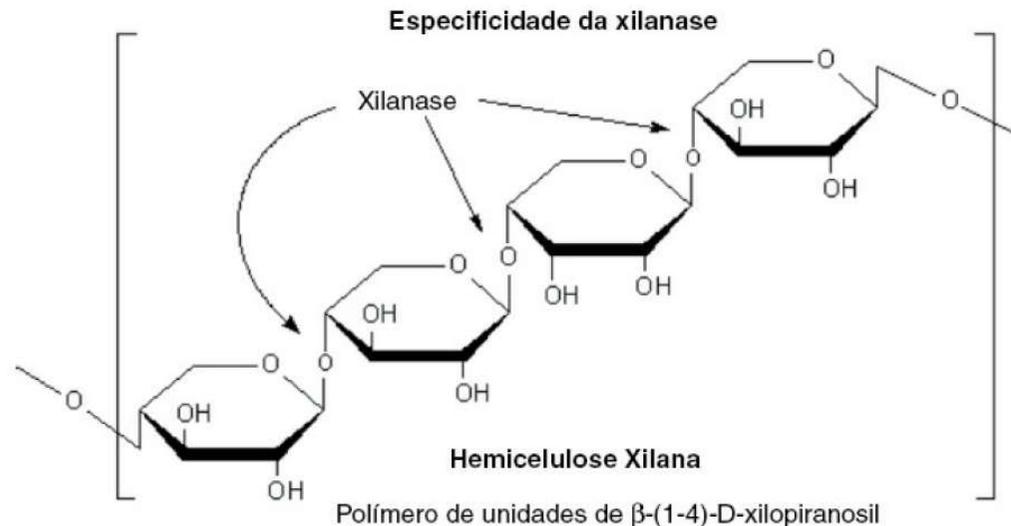
- As pectinesterases (EC 3.1.1.11) catalisam a desesterificação da pectina em pectato e metanol. Elas hidrolisam a ligação éster entre o metanol e o ácido galacturônico da pectina esterificada.



- 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.
- Uma pectina esterase heteróloga é produzida pela linhagem de *Aspergillus oryzae* IFO 4177

## 15. Xilanase

As xilanases (EC 3.2.1.8) hidrolisam as ligações  $\beta$ -1,4-d-xilosídicas do esqueleto da arabinoxilana.



As preparações enzimáticas à base de xilanase são **utilizadas na indústria alimentícia**. Como consequência, a elasticidade da malha de glúten aumenta, melhorando o manuseio da massa.

O gene da endo- $\beta$ -1,4-xilanase de *Thermomyces lanuginosus* foi transferido para uma linhagem selecionada de *Fusarium venenafum* (nome comercial NOVOZYM 899) e também de *Aspergillus oryzae* (FDA-GRN 54)

**Obrigado**