

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 97.110

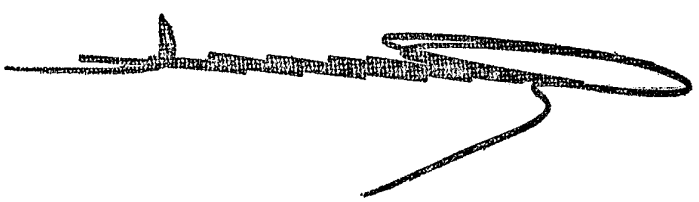
REQUERENTE: GIST-BROCADES N.V., holandesa, com sede em Wateringseweg 1, P.O. Box 1, 2600 MA Delft, Países Baixos e MOGEN International N.V., holandesa, com sede em Einsteinweg 97, 2333 CB LEIDEN, Países Baixos.

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA CATALISAR REACÇÕES ACELERAVEIS POR ENZIMAS, MEDIANTE ADIÇÃO AO MEIO REACCIONAL DE SEMENTES DE PLANTAS TRANSGÊNICAS E PARA OBTENÇÃO DAS REFERIDAS SEMENTES"

INVENTORES: JAN PEN, ANDREAS HOEKEMA, PETER CHRISTIAAN SIJMONS, ALBERT J.J. VAN OUYEN, KRIJN RIETVELD, TEUNIS CORNELIS VERWOERD e WIM QUAX.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, em 23 de Março de 1990, sob o número de série 498,561.

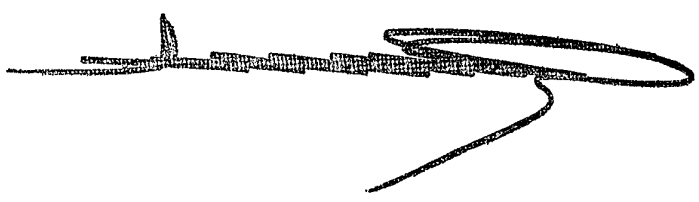


Descrição referente à patente de invenção de GIST-BROCADES N.V., holandesa, industrial e comercial, com sede em Wateringseweg 1, P.O. Box 1, 2600 MA Delft, Países Baixos e de MOGEN International N.V., holandesa, industrial e comercial, com sede em Einsteinweg 97, 2333 CB LEIDEN, Países Baixos, (inventores: Jan Pen, Andreas Hoekema, Peter Christiaan Sijmons, Albert J.J. van Ooyen, Krijn Rietveld, Teunis Cornelis Verwoerd e Wim Quax, residentes na Holanda) para "PROCESSO PARA CATALISAR REACÇÕES ACELERÁVEIS POR ENZIMAS, MEDIANTE ADIÇÃO AO MEIO REACCIONAL DE SEMENTES DE PLANTAS TRANSGÊNICAS E PARA OBTENÇÃO DAS REFERIDAS SEMENTES"

DESCRIÇÃO

Campo da Invenção

A presente invenção pertence ao campo da produção de enzimas de interesse nas sementes de plantas transgênicas e à utilização das sementes assim produzidas em processos industriais, sem necessidade de extração e/ou de isolamento das enzimas.



Enquadramento Geral da Invenção

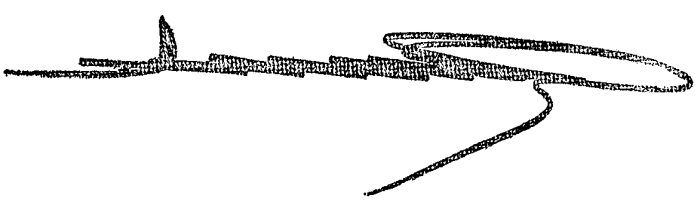
Certas indústrias utilizam actualmente enzimas nos seus processos. Essas indústrias incluem as indústrias de detergentes, têxteis, lacticínios, alimentares e de bebidas, alimentos para animais e outras indústrias.

Presentemente, as enzimas são produzidas à escala industrial por processos de fermentação ou são isoladas de fontes vegetais ou animais. As enzimas produzidas pela acção de micróbios incluem proteases, amilases, celulasas, pectinases, fitases e outras. A produção é muito eficiente e pode atingir-se níveis de produção maiores do que 10 gramas por litro de meio de cultura.

Já foi proposta a possibilidade de utilização de plantas transgénicas como sistema de produção de proteínas valiosas. Exemplos até ao presente são a produção de interferão em tabaco (Goodman e col., 1987), encefalinas em tabaco, Brassica napus e Arabidopsis thaliana (Vandekerckhove e col., 1989), anticorpos em tabaco (Hiatt e col., 1990) e albumina de soro humano em tabaco e em batata (Sijmons e col., 1990).

Na prática, a transformação de um número crescente de espécies vegetais, especialmente de espécies dicotiledóneas (por exemplo, tabaco, batata, tomate, Petúnia, Brassica), tornou-se um procedimento de rotina para os peritos no assunto (Klee e col., 1987; Gasser & Fraley, 1989). Estabeleceram-se estratégias para a expressão de genes estranhos em plantas (Gasser & Fraley, 1989). Identificaram-se sequências de regulação de genes de plantas que se utilizam para a construção de genes quiméricos que podem ser funcionalmente expressos em plantas e em células vegetais.

Para a introdução de construções de genes em plantas, dispõe-se de diversas tecnologias, tais como transformação com Agrobacterium tumefaciens ou Agrobacterium rhizogenes. Empregando esta estratégia, explorou-se uma larga variedade de tecidos vegetais, sendo a escolha principalmente

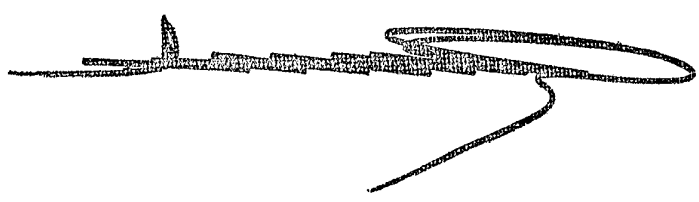


dependente da espécie da planta e da sua possibilidade de ser levada até à cultura do tecido. Exemplos que obtiveram êxito são a transformação de protoplastas, microsporos ou pólen e explantes, tais como folhas, caules, raízes, hipocótilos e côtilos. Além disso, utilizam-se métodos para a introdução directa de ADN em protoplastas e células ou tecidos vegetais, tais como micro-injecção, electroporação, bombardeamento com partículas e absorção directa de ADN (Gasser & Fraley, 1989).

Podem produzir-se proteínas em sementes de plantas utilizando uma variedade de sistemas de expressão. Por exemplo, a utilização de um promotor constitutivo como o promotor 35S do Vírus de Mosaico da Couve-flor (CaMV) (Guilley e col., 1982) tem como resultado a acumulação da proteína expressa na semente, entre outras, de plantas transgénicas. Como variante, podem utilizar-se promotores de genes que codificam proteínas de armazenagem nas sementes. As proteínas de armazenagem nas sementes são expressas de maneira altamente específica do tecido e específico do estágio de desenvolvimento (Higgins, 1984; Shotwell & Larkins, 1989), isto é, os genes são expressos apenas na semente e apenas durante o estágio de desenvolvimento da semente.

Uma proteína de armazenagem nas sementes (revista em Higgins, 1984; Shotwell & Larkins, 1989) é definida como qualquer proteína que se acumula em quantidades significativas (até 90% da proteína total da semente) na semente em desenvolvimento e que, por germinação, se hidrolisa para proporcionar uma fonte nutritiva para os estágios precoces de desenvolvimento da plantícula. As proteínas estão contidas num compartimento intracelular chamado "corpo de proteína" ou "vacúolo de armazenagem". Este corpo de proteína contém inibidores de protease e cria um ambiente isento de protease. As proteases que degradam as proteínas de armazenagem são actividades três a seis dias depois da germinação (Larkins, 1981).

Muitos genes de proteína de armazenagem em sementes foram isolados e caracterizados, assim



como as suas regiões de flanqueamento 5' e 3' (revisto por Casey & Domoney, 1987). São exemplos para as globulinas e albuminas os genes de glicinina e de conglicinina de soja (Fischer e Goldberg, 1982; Harada e col., 1989), os genes de legumina e de vicilina de ervilha (Lycett e col., 1984; Higgins e col., 1988), o gene de feijão do campo LLS (Baumlein e col., 1986), o gene da faseolina 7S de phaseolus (Doyle e col., 1986), os genes de cruciferina e de napina de Brassica (Ryan e col., 1989; Scofield e Crough, 1987; Radke e col., 1988), o gene de heliantina de girassol (Vonder Haar e col., 1988; Jordano e col., 1989) e os genes de albumina 2S e de cruciferina de Arabidopsis thaliana (Vandekerckhove e col., 1989; pang e col., 1988). Podem encontrar-se outros exemplos nos genes que codificam prolaminas e glutelinas (Casey e Domoney, 1987). Geralmente, as proteínas de armazenagem são codificadas por famílias de multigenes.

Os genes de proteínas de armazenagem na semente foram transferidos para tabaco, petúnia e semente de colza (Okamura e col., 1986; Beachy e col., 1984; Sengupta-Gopalan e col., 1985; Higgins e col., 1988; Ellis e col., 1988; Baker e col., 1988; Vandekerckhove e col., 1989; Altenbach e col., 1989). Utilizou-se a região de regulação 5' de montante da beta-faseolina da ervilha para dirigir a expressão de beta-glucurodinase (Bustos e col., 1989), fito-hemaglutinina (Voelker e col., 1989), luciferase (Riggs e col., 1989) e zeína (Hoffman e col., 1987) em tabaco. Utilizou-se o promotor do gene de albumina 2S de Arabidopsis thaliana para dirigir a expressão de uma albumina 2S modificada da mesma espécie em tabaco, Brassica napus e Arabidopsis thaliana (Vandekerckhove e col., 1989). Os genes acima mencionada foram expressos de uma maneira específica do tecido e regulada segundo o desenvolvimento, isto é, na semente, durante o desenvolvimento da semente. Os níveis de expressão em todos estes relatórios variaram, mas atingiram níveis tão elevados como 1,7% da proteína total da semente (Voelker e col., 1989). Descobriu-se que o cADN pode substituir o ADN genómico que contém intrões como base para se obter um mRNA funcional e estável na

expressão heteróloga (Chee e col., 1986). Estes resultados demonstram que qualquer técnico perito no assunto da biologia molecular vegetal pode conceber estratégias para expressão específica da semente de um dado gene numa espécie vegetal pretendida que seja conseguida por tecnologia de transformação.

Durante o desenvolvimento das sementes das plantas dicotiledóneas, grande parte da síntese da proteína total é dirigida para o vacúolo ou para os corpos de proteínas de células de parênquima de armazenagem. Para regular este processo, as proteínas são geralmente sintetizadas como precursores. As proteínas precursoras estão equipadas com péptidos de sinal hidrofóbico, geralmente na extremidade N, que são cortados em estágios específicos. Descreveu-se grande número de péptidos de sinal de armazenagem de proteína (Doyle e col., 1986; pang e col., 1988; Vonder Haar e col., 1988; Iturriaga e col., 1989; Dorel e col., 1989; Voelker e col., 1989; Hattori e col., 1985; Lycett e col., 1983; Smith e Raikher, 1989).

A aplicabilidade geral dos péptidos de sinal em sistemas de expressões heterólogas (por exemplo, Sijmons e col., 1990; Vitale e Bollini 1986; Slightom e col., 1986; Della-Cioppa e col., 1987) parece suportar a ideia de que se pode utilizar uma fusão de um péptido de sinal com uma "proteína passageira" heteróloga para transportar e processar a proteína passageira. As referências sugerem que grande variedade de "proteínas passageiras" potenciais é candidata a esse sistema de expressão.

No entanto, a despeito da atracção e da viabilidade do uso das plantas como bio-reactores, o sistema, até ao presente, não é isento de dificuldades. Para os exemplos acima descritos, a planta é usada como bio-reactor e a proteína de interesse é em seguida isolada do material transgénico da planta, isto é, os tecidos que contém os níveis mais altos da proteína de interesse. O isolamento da proteína de interesse das sementes em que é produzida inerentemente introduz complicações, assim como custos adicionais (Krebbers e Vandekerckhove, 1990).



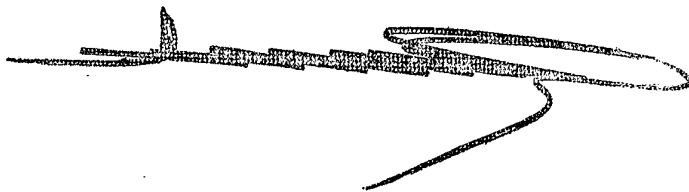
Uma solução possível para resolver este problema pode ser evitar a necessidade de extrair a proteína expressa do material vegetal. A Patente de Invenção da Alemanha Oriental DD 275 704 descreve um construto para a expressão de uma beta-glucanase estável ao calor em sementes não germinadas de plantas de cevada transformadas e a utilização das sementes nos processos de fabricação de cerveja. No entanto, um problema persistente na manipulação de culturas de cereais de pequenos grãos tem sido não só a transformação dos protoplastas das plantas transformadas que não são permitidas na memória descritiva da patente. Assim, não seria possível obter sementes contendo enzimas utilizando o processo que se descreve nessa publicação.

Sumário da Invenção

De acordo com a presente invenção, proporcionam-se sementes que contém, pelo menos, uma enzima de interesse, que podem ser utilizadas em vários processos industriais ou na fabricação de alimentos e de produtos alimentares como catalisadores de reacções digestivas, sem necessidade de primeiro extrair e/ou de isolar as referidas enzimas.

Proporcionam-se construtos de ADN para a transformação de plantas que, por sua vez, são capazes de expressar uma grande variedade de enzimas de interesse nas sementes. Os construtos empregam sequências de sinal operavelmente ligadas a uma sequência de ADN que codifica a enzima que se pretende expressar. Esses construtos estão sob o controlo da sequência de regulação capaz de dirigir a expressão das enzimas pretendidas nas sementes.

A presente invenção também proporciona a utilização das sementes de plantas transgênicas com uma forma de armazenagem estável e manipulável de enzimas. As enzimas são mantidas em ambiente seco que tem uma pequena actividade de protease e assim, ficam protegidas contra a



degradação.

Além disso, a utilização de sementes para a armazenagem de enzimas proporciona um veículo estável que é facilmente embalado e transportado e facilmente manipulado durante a utilização real.

A presente invenção proporciona ainda uma solução viável para o processo dispendioso e problemático da extração de enzimas de interesse de sementes em que elas são produzidas. As enzimas mantêm-se estáveis dentro da semente e, portanto, podem ser utilizadas como substituição das enzimas puras. Este benefício, acoplado com o baixo custo do desenvolvimento de plantas que produzem sementes, proporciona uma fonte econômica dessas enzimas. Assim, a presente invenção permite a redução dos custos associados com a produção, armazenagem e utilização de uma larga variedade de enzimas.

Descrição das Figuras

- Figura 1 - Estratégia para a clonagem de cADN de fitase.
- Figura 2 - Vector binário pMOG23.
- Figura 3 - Sequência genômica do gene da proteína de armazenagem em sementes de cruciferina de Brassica napus.
- Figura 4 - Duplexes de oligonucleótidos sintéticos usados em várias construções.
- Figura 5 - Plasmídio pMOG429. Vector binário pMOG23 contendo a parte de cADN de fitase que codifica a enzima madura a jusante da sequência de ADN que codifica o péptido de sinal da cruciferina.
- Figura 6 - Efeitos da adição de sementes moídas contendo fitase sobre a libertação de fósforo inorgânico a partir de fitato.
- Figura 7 - Sequência genômica do gene de alfa-amilase de Bacillus lecheniformis tal como está presente no vector pPROM54.



Figura 8 - Plasmídeo pMOG29. Plasmídeo pUC18 que contém uma cassete de expressão para expressão constitutiva em plantas e uma sequência que codifica um péptido de sinal de tabaco.

Figura 9 - Plasmídeo pMOG227. Vector binário que contém a parte do gene de alfa-amilase que codifica a enzima madura a jusante de uma sequência de tabaco que codifica um péptido de sinal numa cassete de expressão para expressão constitutiva.

Figura 10 - Relação dose-resposta de fitase de Aspergillus num modelo de digestão in vitro.

Figura 11 - Relação dose-resposta de fitase de Aspergillus e de fitase contida em sementes de tabaco num modelo de digestão in vitro.

Figura 12 - Comparação dos modelos de oligossacáridos obtidos por hidrólise de amido de batata, usando A) sementes de tabaco transformadas com o gene que codifica alfa-amilase de Bacillus licheniformis; B) alfa-amilase de Bacillus licheniformis; e C) alfa-amilase de Bacillus amyloliquefaciens.

Figura 13 - Comparação de modelos de oligossacáridos obtidos a partir de hidrólise de amido de milho usando A) sementes de tabaco transformadas com o gene que codifica alfa-amilase Bacillus licheniformis; B) alfa-amilase de Bacillus licheniformis; e C) alfa-amilase de Bacillus amyloliquefaciens.

Descrição Pormenorizada de Formas de Realização Preferidas

As enzimas de interesse que podem ser produzidas pelo processo de acordo com a presente invenção incluem quaisquer enzimas que sejam capazes de utilização num processo industrial.

As enzimas de interesse incluem enzimas que são heterólogas para a planta (isto é, não são naturais na espécie vegetal) em que são produzidas. Também



estão incluídas as enzimas, homólogas das plantas (isto é, naturais nas espécies vegetais) em que são produzidas, caso sejam sobre-expressas por intermédio de técnicas de ADN recombinante.

Estas enzimas são escolhidas de hidrolases, tais como proteases, celulasas, hemicelulasas, fosfatases, lipases, pectinases, amilases, lisótimas, pululanases e quitinases; liases, tal como pectinilase; e isomerases, tal como glucose-isomerase.

As enzimas preferidas são fitase, alfa-amilase, celobio-hidrolase, endoglucanase, endoxilanase, endogalactanase, alfa-galactosidase, arabinanase, serina-proteases, quimosina, papaína, lipases gástricas, pectina-liase e glucose-isomerase.

No que respeita aos processos industriais, pretende-se processos em que as enzimas extraídas e/ou isoladas são normalmente incluídas numa mistura reaccional, quer in vivo quer in vitro, contendo pelo menos um substrato, em que as enzimas são capazes de catalisar essa reacção do substrato ou substratos de maneira a produzir os efeitos ou produtos pretendidos.

Exemplos desses processos industriais incluem - mas não se limitam a - processos in vitro, tais como a utilização de fitases no processamento de soja ou em processos industriais tais como moagem em húmido ou para a produção de inositol ou fosfatos de inositol a partir de fitato. As hemicelulasas e celulasas podem também ser utilizadas como enzimas de degradação da parede das células, em geral. Igualmente, as alfa-amilases podem ser utilizadas na indústria de panificação para melhorar a consistência dos produtos de panificação; a alfa-amilase, a amiloglucosidase, as xilanasas e/ou a glucose-isomerase podem ser utilizadas na liquefação de amido; as ligninasas e/ou as xilanasas podem ser utilizadas na indústria de papel; as glucanasas, pectinases e/ou as celulasas podem ser utilizadas na indústria alimentar e de bebidas, em processos de fermentação ou de fabricação de cerveja, por exemplo.



A parte a acção acima mencionada das enzimas nos processos in vitro, as enzimas armazenadas em sementes podem ser utilizadas para catalisar reacções digestivas in vivo. Desta maneira, as enzimas facilitam a libertação de nutrientes de géneros alimentares, que, de outra forma, não seriam facilmente disponíveis para o animal que os ingere.

As enzimas a utilizar nestes processos in vivo incluem - mas não se limitam a - fitases, celulasas, hemicelulasas, pectinases e amilases. As enzimas provocam também uma melhor digestão dos produtos alimentares. As enzimas como auxiliares digestivos podem também ser utilizadas em seres humanos, por exemplo, em pacientes que sofrem de fibrose cística ou outras causas de insuficiência pancreática. As lipases, proteases e celulasas contidas nas sementes podem ser utilizadas como agentes aditivos terapêuticos para aliviar problemas digestivos associados a essas doenças.

De acordo com a presente invenção, a enzima pretendida é produzida nas sementes de plantas transgénicas. As sementes assim produzidas são, por sua vez, utilizadas num processo industrial que necessita da enzima nelas contida, sem necessidade de extraí-la e/ou de isolá-la primeiramente.

é facilmente compreendida pelos peritos no assunto que as sementes que contém enzimas para utilização industrial podem ser directamente usadas nestes processos ou podem primeiramente ser preparadas para essa utilização por moagem até à consistência pretendida. Em qualquer dos casos, as sementes inteiras ou moídas podem ser alimentadas tal como se encontram ao processo pretendido sem necessidade de posterior extracção e/ou de isolamento da enzima e também sem perda de actividade das enzima.

As plantas transgénicas, tal como se definem no contexto da presente invenção, incluem plantas ou a sua progénie que foram geneticamente modificadas de modo a provocar ou a melhorar a produção de pelo menos uma enzima de



interesse nas suas sementes. A produção das enzimas de interesse é assim aumentada em relação ao nível que se encontra na variedade da planta do tipo natural.

No contexto da presente invenção, a expressão "sementes contendo uma quantidade reforçada de enzimas" refere-se especificamente a um número estatisticamente significativo de sementes que, em média, contém uma quantidade estatisticamente significativa maior de uma enzima em comparação com a quantidade média de enzimas num número igual de sementes não modificadas.

Os géneros de plantas capazes de produzir enzimas de interesse nas suas sementes através da prática da presente invenção incluem - mas não se limitam a - Nicotiana (por exemplo, tabacum), Brassica (por exemplo, napus e oleracea), Arabidopsis, Glycine (por exemplo, max), Zea (por exemplo, mays), Amaranthus, Hordeum (por exemplo, vulgarum) e Pisum (por exemplo, sativum), Juglans (por exemplo, regia), Arachis (por exemplo, hypogaeae), Medicago (por exemplo, sativa), Phaseolus (por exemplo, vulgaris). Pisum (por exemplo, sativum), Triticum (por exemplo, aestivum), Panicum L., Helianthus (por exemplo, annus), Avena (por exemplo, sativa) e Oryza (por exemplo, sativa).

Preferivelmente, a espécie escolhida deve ter uma grande produção de sementes por planta e por ano e as propriedades químicas e físicas da semente devem ser compatíveis com o processo industrial para o qual a enzima é produzida. Por exemplo, em alguns casos, quando estas sementes (depois da transformação da planta parente) devem ser incluídas em substâncias alimentícias, pode escolher-se uma espécie vegetal que produza sementes com pequenos níveis de taninos ou de outros factores antinutricionais. Em outros casos, a capacidade das sementes transgénicas para poderem ser moídas até à consistência pretendida pode ser o critério de escolha quando as sementes são utilizadas como aditivos, por exemplo, em farinhas. Ainda de acordo com uma outra forma de realização, as sementes que contém as enzimas de interesse podem ser aplicadas directamente ao processo pretendido (por exemplo, em



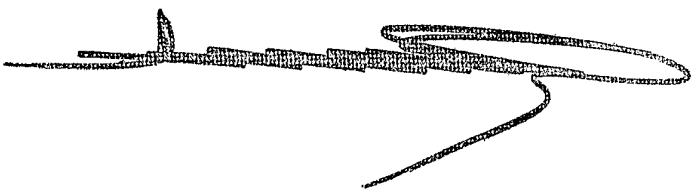
substâncias alimentares), per se, opcionalmente precedidas pelo descasque e/ou secagem depois da colheita.

A escolha da espécie vegetal mais apropriada pode basear-se em experiências de reconstituição. A enzima de interesse pode ser adicionada conjuntamente com sementes de tipo natural ao processo industrial para o qual as sementes transgénicas são eventualmente produzidas.

A modificação genética das plantas que produzem sementes acima descritas tem como objectivo introduzir um construto de expressão contendo um gene que codifica uma enzima de interesse na planta pretendida. Este construto de expressão pode incluir um gene, heterólogo em relação à planta, que fica sob o controlo do promotor e das regiões de interrupção capazes de regular a expressão do gene que codifica a enzima de interesse nas sementes da planta. Também se pretende incluir um gene, homólogo para a planta que se encontra sob o controlo de uma região de regulação capaz de efectuar a sobreprodução da enzima de interesse. Por "sobreprodução", entende-se a produção da enzima de interesse a níveis acima dos quais se encontra na variedade da planta de tipo natural.

Dispõe-se de diversas técnicas para a introdução do construto de expressão contendo uma sequência de ADN que codifica uma enzima de interesse em plantas que se pretende modificar. Essas técnicas incluem - mas não se limitam - a transformação de protoplastas usando o método do cálcio/polietilenoglicol, electroporação e micro-injecção ou bombardeamento de partículas (revestidas) (Potrykus, 1990).

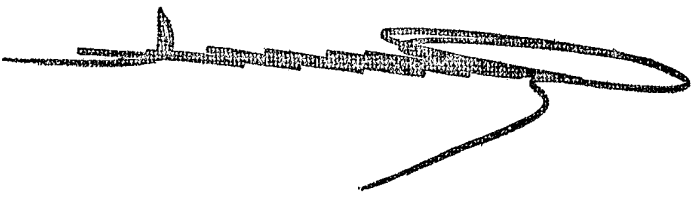
Em adição aos assim chamados métodos directos de transformação de ADN, os sistemas de transformação que envolvem vectores estão largamente disponíveis, tais como vectores de vírus (por exemplo, do Vírus do Mosaico da Couve-flor (CaMV)) e vectores bacterianos (por exemplo, do género Agrobacterium) (Potrykus, 1990). Depois da escolha e/ou da selecção, os protoplastas, células ou partes de plantas que foram transformadas podem ser regenerados de modo a obterem-se plantas completas, usando métodos conhecidos na técnica (R. B.



Horsch e col., 1985). A escolha das técnicas de transformação e/ou de regeneração não é crítica para a presente invenção.

Para as plantas dicotiledóneas, uma forma de realização preferida da presente invenção utiliza o princípio do sistema de vector binário (Hoekema e col., 1983; Schilperoort e col., 1984), em que se utilizam estirpes de Agrobacterium que contém um plasmídeo vir com genes de virulência e um plasmídeo compatível contendo o construto do gene e ser transferido. Este vector pode replicar-se tanto em E. coli como em Agrobacterium e é derivado do vector binário Bin19 (Bevan, 1984), que é alterado em pormenores que não são relevantes para a presente invenção. Os vectores binários como se utilizam neste exemplo contém, entre as sequências da margem esquerda e da margem direita do T-ADN, um gene NPTII idêntico que codifica a resistência à canamicina (Bevan, 1984) e um sítio de clonação múltipla para clonar nos construtos dos genes pretendidos.

A transformação e a regeneração de culturas monocotiledóneas não é um procedimento estandardizado. No entanto, o progresso científico recente mostra que, em princípio, as plantas monocotiledóneas podem ser levadas à transformação e que se podem regenerar plantas transgénicas férteis a partir de células transformadas. O desenvolvimento de sistemas de cultura de tecidos reprodutíveis destas culturas, em conjunto com os métodos poderosos para a introdução de material genético em células de plantas facilitou a transformação. Presentemente, os métodos de escolha para a transformação de plantas monocotiledóneas são o bombardeamento com micro-projecteis de explantes ou células em suspensão e a absorção directa de ADN ou a electroporação dos protoplastas. Por exemplo, obtiveram-se com êxito plantas de arroz transgénicas usando o gene bacteriano hph, que codifica a resistência à higromicina como marcador de selecção. O gene foi introduzido por electroporação (Shimamoto e col., 1989). Obtiveram-se plantas de milho transgénicas por introdução do gene bar de Streptomyces hygroscopicus, que codifica fosfinotricina-acetil-transferase (enzima que inactiva o



herbicida fosfinotricina) em células embriogénicas de uma cultura em suspensão de milho por bombardeamento de micropartículas (Gordon-Kamm e col., 1990). A introdução de material genético em protoplastas aleurónicos de outras culturas monocotiledóneas, tais como trigo e cevada, foi também descrita (Lee e col., 1989). Regeneraram-se plantas de trigo a partir de cultura em suspensão embriogénica escolhendo apenas os tecidos compactos envelhecidos e de calo embriogénico nodular para estabelecimentos das culturas em suspensão embriogénica (Vasil e col., 1990). A combinação com sistemas de transformação para estas culturas permite a aplicação da presente invenção às plantas monocotiledóneas. Estes métodos podem também ser aplicados na transformação e na regeneração de plantas dicotiledóneas.

A expressão de genes recombinantes em plantas envolve pormenores tais como a transcrição do gene por polimerases vegetais, a translação de mRNA, etc., que são conhecidos pelos peritos nas técnicas de ADN recombinante. Apenas os pormenores relevantes para a compreensão clara da presente invenção serão referidos mais abaixo.

As sequências regulatórias que são conhecidas ou que se sabe provocarem suficientemente uma elevada expressão (para a finalidade da aplicação específica como se refere mais adiante) do ADN recombinante em sementes podem ser utilizadas de acordo com a presente invenção. Essas sequências regulatórias podem ser obtidas a partir de plantas ou de vírus de plantas ou sintetizadas quimicamente. Estas sequências de regulação são promotores activos para dirigirem a transcrição em sementes. Incluem - mas não se limitam a - promotores de genes específicos das sementes, especialmente os de genes de proteínas de armazenagem, tais como o promotor *cruA* de *Brassica napus* (Ryan e col., 1989) ou os promotores de genes constitutivamente expressados, tais como o promotor 35S de CaMV (Vírus de Mosaico da Couve-flor) (Guilley e col., 1982). Outras sequências de regulação são sequências terminadoras e sinal de poli-adenilação, incluindo todas as sequências que funcionam como tal em plantas; são exemplos a região de flanqueamento 3'

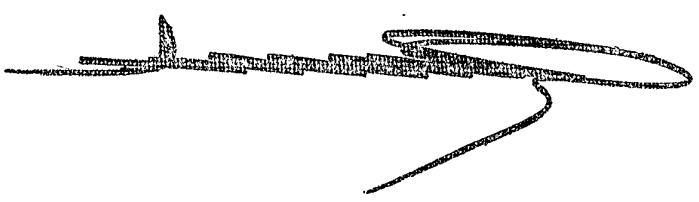


do gene da nopalina-sintase de Agrobacterium tumefaciens ou a região de flaqueamento 3' do gene cruA de Brassica napus. As sequências regulatórias podem também incluir sequências reforçadoras, tais como as que se encontram no promotor 35S de CaMV e as sequências estabilizadoras de mRNA, tais como a sequência líder do Vírus de Mosaico da Alfalfa (AIMV), ARN4 (Brederode e col., 1980) ou quaisquer outras sequências que funcionem como tal.

A proteína de interesse deve encontrar-se num ambiente que permita a estabilidade óptima da proteína durante a maturação da semente. A escolha de compartimentos celulares, tais como citosol, retículo endoplasmático, vacúolo, corpo da proteína ou espaço periplasmático, pode ser utilizada na presente invenção para criar esse ambiente estável, dependendo dos parâmetros biofísicos da proteína de interesse. Esses parâmetros incluem - mas não se limitam - pH óptimo, sensibilidade a proteases ou sensibilidade a molaridade do compartimento preferido. Muito embora as sequências de sinal homólogas sejam preferidas, as sequências de sinais heterólogos podem ser igualmente utilizadas. São especialmente preferidos as sequências de sinal obtidas a partir de proteínas de armazenagem de sementes.

As proteínas de armazenagem de sementes podem dividir-se em quatro classes principais baseadas nas suas características de solubilidade:

1. Albuminas - solúveis em água e subdivididas em duas classes principais (12S e 2S). A classe 12S inclui lectinas isoladas de ervilha e vários feijões, por exemplo, albuminas 2S de Brassica napus, Arabidopsis thaliana, Ricinus communis (semente de rícino), Bertholletia excelsa (castanha-do-maranhão), ervilha, rabanete e girassol.
2. Globulina - solúveis em soluções salinas e que podem ser da classe 7-8S, como as fassolinas de Phaseolus, as vicilinas da ervilha, as conglicininas da



soja, as vicilinas de aveia e as globulinas 7S de outras espécies ou da classe 11-14S, como as leguminas da ervilha, as glicininas da soja, as heliantinas do girassol, as cruciferinas da colza ou as proteínas 11-14S de outras espécies, tais como Arabidopsis e feijão.

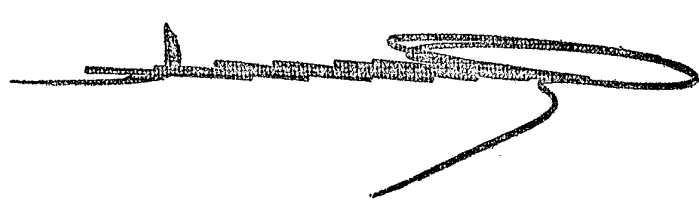
3. Prolaminas - solúveis em álcool aquoso, por exemplo, zeínas do milho, as hordeínas da cevada, as gliadinas isoladas do trigo e as carifinas do sorgo.
4. Glutelinas - solúveis em soluções ácidas ou alcalinas e que podem ser isoladas de trigo.

Muito embora haja excepções, as proteínas mais importantes de armazenagem na semente de plantas dicotiledóneas são as globulinas e as das plantas monocotiledóneas são as prolaminas e as glutelinas.

Todas as partes relevante dos construtos de ADN (promotores; sequências de regulação, de estabilização, de sinal ou terminadoras) de acordo com a presente invenção podem ser modificadas, caso assim se pretenda, para efectuar-lhes as características de controlo, utilizando métodos conhecidos pelos peritos no assunto. A quantidade de proteína recombinante (o "nível de expressão") necessária na semente deve ser suficientemente elevada para usar a semente transgénica como aditivo mínimo (em volume, em peso ou em custo) em todas as formas de realização preferidas da presente invenção.

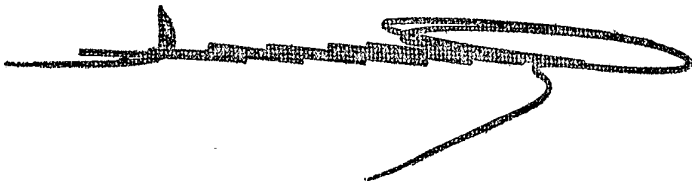
Pode empregar-se um certo número de métodos para se obterem plantas transgénicas cujas sementes contêm mais do que uma enzima de interesse. Eles incluem, mas não se limitam a:

- a. Fertilização cruzada de plantas transgénicas que expressam uma ou mais enzimas de interesse.

- 
- b. Transformação de plantas com um fragmento de ADN ou com um plasmídeo que contém genes múltiplos que codificam as enzimas de interesse, usando as sequências de regulação necessárias.
 - c. Transformação de plantas com diferentes fragmentos de ADN ou plasmídios simultaneamente, contendo cada um um gene para uma enzima de interesse, usando as sequências de regulação necessárias.
 - d. Transformação sucessiva de plantas, usando de cada vez um fragmento de ADN ou um plasmídeo que codifica uma enzima de interesse diferente sob o controlo das sequências de regulação necessárias.
 - e. Combinação dos métodos acima mencionados.

O método realmente utilizado para obter sementes contendo mais do que uma enzima de interesse não é crítico relativamente aos objectivos da presente invenção.

Assinale-se que as sementes que contêm maiores quantidades de enzimas se podiam obter por processos conhecidos pelos peritos no assunto, diferentes dos processos recombinantes acima mencionados, desde que esses processos tenham como resultado a obtenção de sementes com quantidades reforçadas de enzimas em comparação com as sementes de tipo natural. Por exemplo, pode ser possível obter essas sementes por meio de técnicas de variação somoclinal. Além disso, estas técnicas também poderiam ser utilizadas em si próprias ou em combinação com técnicas de cultivo que empregam o conceito de esterilidade masculina citoplásmica (Cms) ou esterilidade masculina nuclear (Nms) (Mariani e col., 1990). Técnicas tais como a variação somoclinal e o cultivo cruzado que envolvem a utilização de Cms ou de Nms poderiam também ser utilizadas em combinação com as tecnologias recombinantes acima mencionadas a fim de aumentar ainda mais as quantidades relativas de enzimas presentes nas sementes. No que diz



respeito às técnicas não recombinantes que poderiam ser utilizadas para aumentar a quantidade de enzimas presentes nas sementes, faz-se referência à Patente de Invenção Norte-Americana Número 4 378 655, concedida em 7 de Abril de 1983, que se incorpora na presente descrição como referência para mencionar essas técnicas. Chama-se a atenção para o facto de existirem numerosas publicações que descrevem as técnicas de cultivo que envolvem a esterilidade masculina citoplásmica, que foi descoberta por P. LeClercq em 1986 e os correspondentes genes de restauração da fertilidade (Rf), que foram descobertos por M. L. Kinmar e col. em 1970. Recentemente, a utilização da esterilidade masculina nuclear foi descrita por Mariani e col. em 1990. Descrição mais generalizada que se referem ao cultivo de plantas são referidas por James R. Welsh em "Fundamentals of Plant Genetics and Breeding", 1981, assim como por J.M. Poehlman em "Breeding Field Crops", 1959.

Numa forma de realização da presente invenção, prepara-se um cADN de duplo cordão que codifica fitase a partir de mARN isolado de Aspergillus ficuum (Van Gorcom e col., 1991). O construto de ADN é colocado sob o controlo de sequências regulatórias da cruciferina de armazenagem de proteínas 12S a partir de Brassica napus. O construto é seguidamente subclonado num vector binário, tal como pMO623 (na estirpe DH5alfa de E.coli K-12, depositado no Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holanda, em 29 de Janeiro de 1990, sob o número de acesso CBS 102.90). Este vector é introduzido em Agrobacterium tumefaciens, que contém um plasmídeo Ti desarmado. Cocultivaram-se células de bactérias que contém este construto com tecidos de tabaco ou de plantas de Brassica e escolheram-se as células das plantas transformadas por meios nutrientes que contêm antibióticos e são induzidas a regenerarem-se em plantas diferenciadas com esses meios. As plantas resultantes produzem sementes que contêm e expressam o construto de ADN.

Numa outra forma de realização da presente invenção, o construto de ADN que codifica fitase é colocado sob o controlo de sequências de regulação do promotor



35S do Vírus de Mosaico da Couve-flor (CaMV). O construto é seguidamente subclonado num vector binário. Este vector é em seguida introduzido em Agrobacterium tumefaciens que contém o plasmídeo Ti desarmado. As células de bactérias que contém este construto são cocultivadas com tecidos de plantas de tabaco ou de Brassica e escolhem-se as células das plantas transformadas por meios nutrientes que contém antibióticos e que são induzidas a regenerarem-se em plantas diferenciadas sobre esses meios. As plantas resultantes contém e expressam o construto ADN constitutivamente.

A actividade de enzima de fitase das sementes transgénicas pode ser determinado por uma variedade de métodos, não críticos para a presente invenção, tais como o ensaio de ELISA, de manchamento de Western ou os ensaios directos de enzimas usando técnicas colorimétricas ou ensaios em gel natural.

As sementes que contém a fitase assim produzida podem ser utilizadas em processos industriais, tais como em aditivos de alimentos para não ruminantes, no processamento de soja ou na produção de inositol ou de fosfatos de inositol a partir de fitato. Caso isso seja necessário ou pretendido, as sementes podem ser primeiramente moídas até à consistência pretendida antes de serem utilizadas, dependendo da natureza do processo industrial, sem necessidade de posterior extracção e/ou de isolamento da fitase. Qualquer perito no assunto poderá determinar se essas operações preparatórias são necessárias.

A fitase produzida nas sementes pode também ser utilizada num processo para a maceração de milho ou de sogro. As sementes podem ser moídas antes de se adicionarem ao milho de maceração. A fitase libertada das sementes pode actuar sobre a fitina, que está presente em muitas preparações à base de milho. A degradação da fitina na maceração do milho é benéfica para o valor comercial adicionado do líquido de maceração do milho, que é utilizado como alimento para animais ou como nutriente em fermentações microbianas. Além disso, a degradação da fitina pode evitar problemas relacionados com a



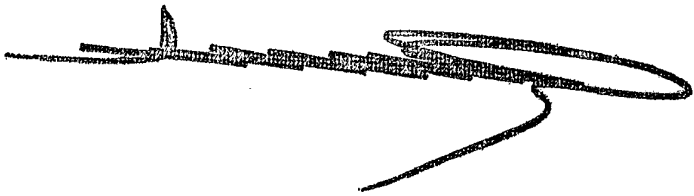
acumulação dos depósitos em filtros, tubagens, vasos de reacção, etc., durante a concentração, transporte e armazenagem do líquido de maceração do milho (Vaara e col., 1989). A acção da fitase pode também acelerar o processo de maceração e os processos de separação envolvidos na moagem de milho em húmido.

De acordo ainda com uma outra forma de realização da presente invenção, coloca-se um fragmento de ADN genómico que codifica alfa-amilase a partir de Bacillus licheniformis sob o controlo do promotor CaMV 35S e sequências de reforço. A sequência líder de estabilização de mARN de RNA4 de AlMV encontra-se incluída, assim como as sequências de sinal de terminação e de poli-adenilação do gene de nopalina-sintase de Agrobacterium tumefaciens. O construto inteiro é seguidamente subclonado num vector binário. Este vector é introduzido em Agrobacterium tumefaciens, que contém o plasmídeo Ti desarmado. Cocultivaram-se células bacterianas que contém este construto com tecidos de planta de tabaco e escolhem-se células das plantas transformadas por meios nutrientes que contêm antibióticos e são induzidas a regenerarem-se em plantas diferenciadas nesses meios. As plantas resultantes produzem sementes que contêm e expressam o construto de ADN.

A actividade da enzima alfa-amilase das sementes transgénicas é determinada por métodos não críticos para a presente invenção, tais como ensaios directos de enzimas usando técnicas colorimétricas ou ensaios com gel natural.

As sementes podem ser utilizadas como fonte da alfa-amilase, que pode ser directamente usada em processos industriais, tais como preparação de xaropes de amido. Preferivelmente, as sementes são primeiramente moídas e a mistura inteira (moída) pode ser usada no processo, como pode ser determinado por qualquer perito no assunto, com conhecimentos correntes.

Os exemplos seguintes são apresentados de modo a proporcionar aos peritos no assunto uma descrição completa e uma referência completa da maneira como



fazer e utilizar a presente invenção e não se destinam a limitar o âmbito daquilo que os inventores consideram como a sua invenção. Fizeram-se esforços no sentido de garantir a exactidão relativamente aos números utilizados (por exemplo, quantidades, temperaturas, pH, etc.), mas pode haver alguns erros experimentais e desvios. A não ser que se indique outra unidade, a temperatura é expressa em graus Celsius e a pressão é a atmosférica ou próxima da pressão atmosférica.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Isolamento de Poli A+ ARN de Aspergillus ficuum

Desenvolveu-se a estirpe NRRL 3135 de Aspergillus ficuum num meio que contém 22,72 gramas /litro de farinha de milho (tratada com amilase a pH 7, a 85°C, durante quinze minutos), 9,36 gramas/litro de glucose, 2,9 gramas/litro de KNO_3 , 0,142 grama/litro de KCl , 0,142 grama/litro de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 56,8 miligramas/litro de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Depois de decorridos seis dias, faz-se a colheita do micélio.

Congela-se o micélio seco (0,5 grama) com azoto líquido e mói-se. Subsequentemente, o material é homogeneizado num misturador Ultra Turrax (velocidade máxima; um minuto) a 0° C em LiCl 3M e ureia 6M e mantém-se durante a noite a 4° C, como é descrito por Auffray e Rougeon (1980).

Obtém-se ARN celular total depois de centrifugação a 16.000 x g, seguida de duas extracções sucessivas com fenol: clorofórmio: álcool iso-amílico (50:48:2). Precipita-se o ARN com etanol e redissolve-se em 1 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), 0,5 SDS para a selecção de poli A+, aquece-se a mistura total de ARN durante cinco minutos a



65° C , ajusta-se a NaCl 0,5 M e depois aplica-se a uma coluna de oligo (dt)-celulose. Depois de várias lavagens com uma solução contendo Tris 10 mM de pH 7,0, EDTA 1 mM e NaCl 0,1 mM, colecta-se o poli-A+ ARN por eluição com Tris 10 mM de pH 7,0 e EDTA 1 mM.

Exemplo 2

Preparação e Clonagem de um cADN que Codifica Fitase

Para a síntese do primeiro cordão do cADN, dissolvem-se 5 microgramas de poli-A+ ARN, isolado de acordo com o exemplo 1, em 16,5 microlitros de H₂O e adiciona-se os seguintes componentes: 2,5 microlitros de RNasina (30 U/microlitro), 10 microlitros de tampão que contém 50 mM de Tris-HCl de pH 7,6, 6 mM de MgCl₂ e 40 mM de KCl, 2 microlitros de KCl 1M, 5 microlitros de DTT 0,1 M, 0,5 microlitro de oligo (dT)₁₂₋₁₈ (2,5 mg/ml), 5 microlitros de dNTP-mix 8 mM, 5 microlitros de BSA (1 mg/ml) e 2,5 microlitros de transcriptase inversa MLV Moloney (200 U/microlitros). Incuba-se a mistura durante trinta minutos a 37°C e interrompe-se a reacção por adição de 10 microlitros de EDTA 0,2 M e de 50 microlitros de H₂O. Realiza-se uma extracção utilizando 110 microlitros de clorofórmio e, depois da centrifugação durante cinco minutos, adiciona-se NH₄Ac 5 M e 440 microlitros de etanol absoluto (-20° C) à fase aquosa. Realiza-se a precipitação numa solução de gelo seco/etanol durante trinta minutos. Depois de centrifugação (dez minutos a 0° C), lava-se o pelete de cADN/mARN com etanol frio e gelo a 70%. Seca-se o pelete e dissolve-se em 20 microlitros de H₂O.

O isolamento do cADN que codifica fitase efectua-se com a reacção em cadeia com polimerase (PCR) em dois fragmentos. Combinam-se os dois fragmentos utilizando o sitio de BamHI dentro do gene para criar um cADN completo. A estratégia para realizar a clonagem do cADN da fitase está representada na figura 1



O sequenciamento do gene da fitase (Van Gorcom e col., 1971) revela a presença de um sítio de BamHI a aproximadamente 800 pares de base do codão de iniciação. A sequência de nucleótidos em volta deste sítio de BamHI, assim como a sequência de nucleótidos que precede o codão de iniciação e a sequência de nucleótidos depois do codão de interrupção do gene de fitase são utilizados para conceber oligonucleótidos para a PCR

A reação em cadeia de polimerase realiza-se de acordo com o fornecedor de Taq-polimerase (Cetus), usando 1,5 microlitros de solução que contém o produto da reação da síntese do primeiro cordão e 0,5 microgramas de cada um dos oligonucleótidos. A amplificação realiza-se num amplificador de ADN da firma Perkins Elmer/Cetus. Depois de 25 ciclos de dois minutos a 94°C, dois minutos a 55°C e três minutos a 72°C, desproteíniza-se a mistura reaccional por extracções subsequentes com fenol e clorofórmio. Precipita-se o ADN e dissolve-se num tampão que contém Tris 10 mM, pH 7, e EDTA 0,1 mM e, subsequentemente, digere-se com enzimas de restrição apropriadas.

Para a amplificação do fragmento que codifica a parte da extremidade N da proteína, usam-se os dois oligonucleótidos seguintes:

Oligo 1: 5' GGGTAGAATTCAAAAATGGGCGTCTCTGCTGTTCTA 3'

OLIGO 2: 5' AGTGACGAATTCGTGCTGGTGGAGATGGTGTCC 3'

Digere-se com EcoRI o fragmento amplificado e clona-se no sítio de EcoRI de pTZ18R (adquirido em Pharmacia). O mapeamento do sítio de restrição e o sequenciamento dos nucleótidos demonstra a autenticidade do fragmento. O plasmídeo resultante é designado pGB925.

Para amplificar o segundo fragmento, utiliza-se os dois oligonucleótidos seguintes:

Oligo 3: 5' GAGCACCAAGCTGAAGGATCC 3'

Oligo 4: 5' AAAGTGCAGGCGTTGAGTGTGATTGTTAAAGGG 3'



O fragmento amplificado é digerido com BamHI e PstI e subsequentemente clonado em pTZ18R, que foi digerido com BamHI e PstI. O mapeamento dos sítios de restrição e o sequenciamento dos nucleótidos mostra que se isola o fragmento correcto. O plasmídeo resultante é designado pGB926.

A fim de isolar um cADN de comprimento completo, digere-se pGB925 com EcoRI e BamHI e isola-se o fragmento que contém o ADN que codifica a fitase. Este fragmento é clonado no plasmídeo pGB926, que foi digerido com EcoRI e BamHI, obtendo-se como resultado o plasmídeo pGB927. Este plasmídeo contém um cADN de comprimento completo que codifica fitase, com o tamanho aproximado de 1,8 kbp.

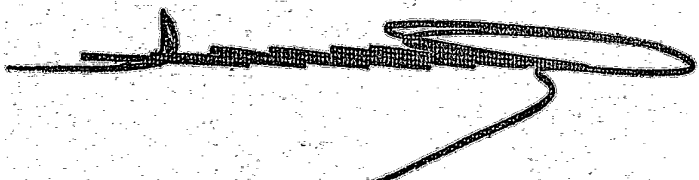
Exemplo 3

Construção do Vector Binário pMOG23

Neste Exemplo, descreve-se a construção do vector binário pMOG23 (em E. coli K-12 DHalfa, depositado no Centraal Bureau voor Schimmelcultures, em 29 de Janeiro de 1990, sob o número de acesso CBS 102.90).

O vector binário pMOG23 (Figura 2) é um derivado do vector Bin19 M.Bevan, 1984). Para se obter o pMOG23, o vector Bin19 é modificado de uma maneira não essencial para a presente invenção, utilizando técnicas familiares aos peritos em biologia molecular.

Em primeiro lugar, as posições do rebordo esquerdo (LB) e do rebordo direito (RB) são comutadas com referência ao gene II (gene NPTII) da neomicina-fosfotransferase. Em segundo lugar, inverte-se a orientação do gene NPTII dando transcrição no sentido de LB. Finalmente, substitui-se o poli-ligador de Bin19 por um poli-ligador com os seguintes sítios de reconhecimento por enzimas de restrição: EcoRI, KpnI, SmaI, BamHI, XbaI, SacI, XhoI e HindIII.



Exemplo 4

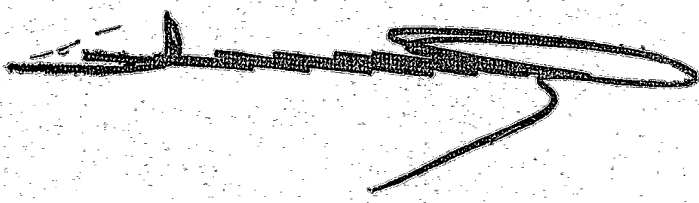
Clonagem de cADN de Fitase de Aspergillus ficuum num Construto de Expressão para Expressão Constitutiva em Plantas

Talha-se o gene de fitase de Aspergillus ficuum e clona-se num construto de expressão para expressão constitutiva a jusante do promotor 35S do Vírus de Mosaico da Couve-flor. O construto de expressão contém também a informação de codificação para uma sequência de péptidos de sinal de origem vegetal.

O cADN de fitase é clonado no construto de expressão como se encontra presente no plasmídeo pMOB29 (descrito sob a)). Subsequentemente, introduz-se o construto inteiro no vector binário pMOB29 e transfere-se para Agrobacterium tumefaciens, estirpe LBA4404.

a) Construção do Vector de Expressão pMOB29

Clona-se o construto de expressão de ROK1 (Baulcombe e col., 1986) como um fragmento de EcoRI/HindIII em pUC18. Este construto contém o promotor 35S do Vírus de Mosaico da Couve-flor (CaMV) num fragmento de EcoRI/BamHI e o terminador de transcrição de nopalina-sintase (nos) num fragmento de BamHI/HindIII. O fragmento promotor consiste na sequência desde -800 a +1 do promotor 35S de CaMV. A posição +1, que é incluída, é o sítio de iniciação da transcrição (Guilley e col., 1982). A sequência a montante do sítio de NcoI na posição -512 é suprimida e este sítio é transformado num sítio de EcoRI. Isto faz-se cortando o construto de expressão presente em pUC18 com NcoI, preenchendo nas extremidades de cordão único com polimerase de Klenow e ligação de um ligador EcoRI. O plasmídeo resultante é cortado com EcoRI, obtendo-se como resultado a supressão do fragmento de EcoRI, que contém as sequências do promotor 35S a montante do sítio original de NcoI. O fragmento de BamHI/HindIII, contendo o nos terminador, é substituído por um fragmento de



ADN (oligonucleótido duplex A, Figura 4) que contém a sequência líder de ARN4 do Virus de Mosaico da Alfalfa (AIMV) (Braderode e col., 1980). Isto faz-se por clivagem com BamHI, seguida de clivagem com HindIII e ligação do fragmento de ADN sintético. O sítio de BamHI e os três nucleótidos a montante são suprimidos por mutagénese dirigida ao sítio. No plasmídeo resultante, o fragmento de BamHI/HindIII que contém a sequência nos terminadora, é reintroduzido. O gene que codifica beta-glucoronidase (proveniente do plasmídeo pRAJ275; Jefferson, 1987) foi ligado como fragmento de NcoI/BamHI, resultando no plasmídeo pMOG14. A partir da literatura, sabe-se que a duplicação da sequência entre -343 e -90 aumenta a actividade do promotor 35S (Kay e col., 1987). Para se obter um fragmento promotor com uma sequência dupla chamada reforçador, realizam-se as seguintes operações, conhecidas pelos peritos no assunto:

A partir do plasmídeo pMOG14, isola-se o fragmento reforçador num fragmento de AccI/EcoRI e subsequentemente insensibilizam-se as extremidades com polimerase de Klenow. O fragmento obtido é introduzido em pMOG14 cortado com EcoRI e com as extremidades insensibilizadas, para que a margem compreendida entre os sítios de EcoRI e AccI de margens insensibilizadas origine um novo sítio de EcoRI. O plasmídeo resultante (pMOG18) contém o promotor 35S com uma sequência reforçadora dupla, a sequência líder de ARN4 a partir de AIMV e o terminador nos num construto de expressão ainda presente num fragmento de EcoRI/HindIII. Finalmente, o fragmento de NcoI/BamHI que codifica beta-glucuronidase é substituído por um fragmento de ADN sintético B (Figura 4), derivado do cADN PROB12 (Cornelissen e col., 1986). Este fragmento B codifica a proteína PR do péptido de sinal PR-S da sequência do tabaco Samsun NN. Cria-se um sítio de SphI no péptido de sinal que codifica a sequência de ADN modificando um nucleótido. Esta modificação não altera a sequência de aminoácidos do péptido de sinal PR-S codificado. O plasmídeo resultante é designado pMOG29 (Figura 8).

b) Clonagem do Gene de Fitase de Aspergillus ficuum no Vector Binário

O oligonucleótido duplex C (Figura 4) é clonado no plasmídeo pMOG29, e digere-se com SphI e BamHI, obtendo-se como resultado o plasmídeo pMOG407. O duplex de oligonucleótidos contém a informação que codifica os dois aminoácidos finais do péptido de sinal PR-S, seguido dos primeiros seis aminoácidos da fitase madura.

O plasmídeo pGB927, que contém o cADN da fitase de comprimento completo, é digerido com XhoI (parcialmente) e com PstI. O fragmento de XhoI/PstI, que compreende as sequências de ADN que codificam a fitase madura a partir do aminoácido 6 para diante, é clonado no plasmídeo pMOG407 linearizado com XhoI e PstI, obtendo-se como resultado o plasmídeo pMOG417. O construto completo, que contém o gene de fitase quimérico, é inserido como um fragmento de EcoRI/HindIII no vector binário pMOG23, linearizado com EcoRI e HindIII. O plasmídeo binário resultante, pMOG413, é mobilizado, num acasalamento triparental, com a estirpe RK2013 (Ditta e col., 1980), na estirpe LBA4404 de Agrobacterium tumefaciens que contém um plasmídeo com genes de virulência necessários à transferência de T-ADN para a planta.

Exemplo 5

Expressão transiente de um Gene de Fitase Quimérico em Protoplastas de Tabaco

Transformam-se protoplastas de tabaco com plasmídeo ADN que transporta o gene de fitase quimérico sob regulação do promotor 35S do CaMV constitutivo. Depois de setenta e duas horas, os protoplastas tratados são ensaiados relativamente à expressão transiente do gene de fitase introduzido usando o ensaio da actividade de fitase.

Preparam-se protoplastas a partir de



plantas de tabaco desenvolvidas axenicamente com a idade de um a dois meses (Nicotiana tabacum SR1). A maneira de proceder completa é descrita por Rodenburg e col., (1989). Para a transformação, electropora-se um número de $5 \cdot 10^5$ protoplastas com 40 microgramas de ADN do plasmídeo pMO6417. Depois da electroporação, os protoplastas são ressuspensos em 3 ml de meio K3G. Para o ensaio da actividade de fitase, os protoplastas são peletizados e dialisam-se os 3 ml de sobrenadante durante a noite contra um excesso de água. Seca-se por congelação o produto da diálise e ressuspende-se em 300 microlitros de acetato de sódio 25 mM de pH 5,5. Realiza-se então o ensaio como se descreve pormenorizadamente no Exemplo 10, com a única excepção de que, em vez do tampão de glicina-HCl 250 mM de pH 2,5, se usar um tampão de acetato de sódio 25 mM de pH 5,5.

Nestas experiências, 1 unidade de fitase define-se como fosfato 1 micromolar libertado de uma solução de fitato de sódio 1,5 mM por minuto a 37°C e pH 5,5.

Nos protoplastas não tratados, não se encontra qualquer actividade detectável. Os protoplastas electroporados com plasmídeo pMO6417 mostram uma actividade de 0.26 PTU (unidades de fitase, veja-se o Exemplo 10) por miligrama de proteína no sobrenadante.

Exemplo 6

Expressão Estável de um Gene de Fitase Quimérico em Plantas de Tabaco, sob Controlo do Promotor 35S do CaMV

Transforma-se tabaco por cocultivação de tecido de plantas com a estirpe LBA4404 de Agrobacterium tumefaciens contendo o vector binário pMO6413, com o gene de fitase quimérico sob regulação do promotor 35S do CaMV. A transformação realiza-se utilizando a cocultivação de discos de folhas de tabaco (Nicotiana tabacum SR1), de acordo com Horsch e col. (1985).



Regeneram-se as plantas transgênicas a partir de rebentos desenvolvidos em meio de selecção (100 mg/litro de canamicina), enraizam-se e transferem-se para o solo. Ensaia-se as plantas de terra idade relativamente à actividade de NPTII (resistência à canamicina), desenvolvem-se até à maturidade e deixam-se autopolinizar e formar sementes.

Para determinar a actividade de fitase encontrada nas plantas transgênicas, faz-se uma amostra com 50 miligramas e homogeneiza-se com um pilão em almofariz arrefecido com gelo em 1 ml de tampão de acetato de sódio e 25 mM de pH 5,5. De pois da centrifugação, ensaia-se o sobrenadante como se descreveu nos ensaios transientes. Em trinta e duas plantas de tabaco independentemente transformadas, observou-se um nível máximo de expressão de fitase igual a 0,4% da proteína total solúvel das sementes. Não foi possível detectar qualquer actividade de fitase nas plantas não transformadas.

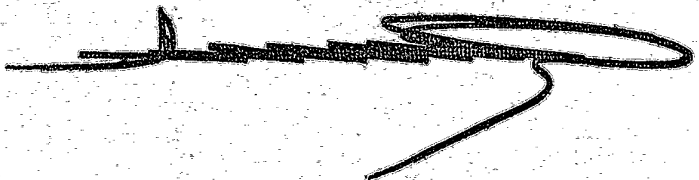
Escolheram-se duas linhas de plantas transgênicas, 413.25 e 413.32, com base nos seus elevados níveis de expressão de fitase (aproximadamente 0,4%) em sementes.

Exemplo 7

Clonagem de cADN de Fitase de Aspergillus ficuum num Construto de Expressão Específico das Sementes

Obtem-se um construto de expressão de tal maneira que se consiga a expressão específica nas sementes, usando sequências de cruciferina do gene de proteína na armazenagem de 12S de Brassica napus (cruA; Ryan e col., 1989). Estas sequências podem ser substituídas pelas dos genes específicos das sementes semelhantes para se conseguir o mesmo objectivo que se pretende com a presente invenção.

Clona-se o cADN da fitase no construto de expressão. Finalmente o construto inteiro é



introduzido em Agrobacterium tumefaciens, utilizado para realizar a transformação. No caso de qualquer outra proteína de interesse, efectua-se a clonagem do gene ou do cADN essencialmente da mesma maneira como se descreve na presente descrição para cADN da fitase.

Para todas as transformações de E. coli neste Exemplo, utiliza-se a estirpe DH5alfa de E. coli K-12.

a) Construção do Construto de Expressão

Para construir o construto de expressão para expressão específica de sementes, sintetizam-se as sequências promotora e terminadora do gene da cruciferina A (cruA) de Brassica napus cv. Jet Neuf, usando a tecnologia de PCR com o ADN genómico isolado (I. J. Mettler, 1987) como modelo. Este gene apresenta expressão específica das sementes e as suas sequências de codificação e de flanqueamento foram determinadas (Ryan e col., 1989).

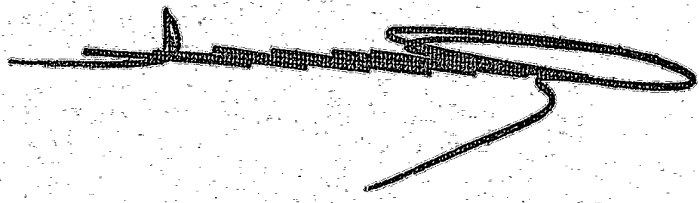
Sintetizam-se dois conjuntos de oligonucleóyidos. Um deles serve para permitir a amplificação da região de flanqueamento 5' de cruA e parte da sequência que codifica o péptido de sinal como fragmento de EcoRI/NcoI:

5' GTTCGGAATTCGGGTTCCGG 3' e 5' AACTGTTGAGCTGTAGAGCC 3'.

A outra serve para a amplificação da sequência de flanqueamento 3' como um fragmento de BglII/HindIII:

5' CTTAAGATCTAACCAGTGA 3' e 5' CGAGAAAGCTTGCATCTCCT 3'

Os oligonucleótidos são concebidos de maneira a conter sítios de restrição apropriados nas suas extremidades para permitir a constituição do construto de expressão depois de digestão dos fragmentos com as enzimas de restrição.



O fragmento 5' do gene de *cruA*, que inclui cinquenta e quatro nucleótidos da sequência que codifica o péptido de sinal é clonado no vector pMO6445 (oligonucleótido duplex E (Figura 4), clonado no vector pUC18, linearizado com SstI e EcoRI), cortado com EcoRI e NcoI, resultando no vector pMO6424. O oligonucleótido duplex D sintético (Figura 4), compreendendo os tripletos de codificação finais 5 para a sequência de sinal da cruciferina de Brassica napus, a sequência que codifica os aminoácidos 1 a 6 da fitase madura e um sítio de clonagem múltipla é clonado no vector pMO6424 e cortado com NcoI e HindIII. O vector resultante é designado pMO6425. O fragmento 3' de *cruA* PCR é clonado como um fragmento de BglIII/HindIII em pMO6425 digerido com BglIII e HindIII, obtendo-se como resultado pMO6426.

b) Clonagem do Gene de Fitase de *Aspergillus ficuum* no Vector Binário

O plasmídio pGB927, contendo a sequência de codificação de comprimento completo da fitase de *Aspergillus ficuum*, é digerido com XhoI (parcialmente) e com PstI. O fragmento de XhoI/PstI, compreendendo as sequências de ADN que codificam fitase madura do aminoácido 6 em diante, é clonado no vector pMO6426, cortado com XhoI e PstI. Do vector pMO6428 resultante, o construto completo contendo o gene de fitase quimérico, é inserido como um fragmento de EcoRI/HindIII no vector binário pMO623 linearizado com EcoRI e HindIII. O vector binário resultante pMO6429 (Figura 5) é mobilizado, num ajustamento triparental, com a estirpe RK2013 de *E. coli* K-12 (contendo o plasmídio pRK2013) (Ditta e col., supra), para a estirpe LBA4404 de *Agrobacterium* (Hoekema e col., 1983, supra), que contém o plasmídio com os genes de virulência necessários à transferência de T-ADN para a planta.

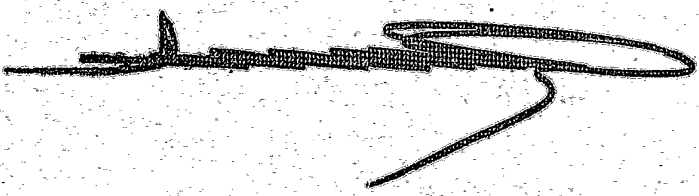


Exemplo 8

Expressão Específica das Sementes Estável de Fitase em Sementes de Tabaco sob o Controlo de um Promotor de Cruciferina

A estirpe LBA4404 de Agrobacterium, contendo o vector binário pMOG429 com o CADN de fitase sob o controlo do promotor de cruciferina, é utilizado para as experiências de transformação. Realiza-se a transformação de tabaco (Nicotiana tabacum SR1) utilizando a cocultivação de discos da folha de acordo com a maneira de proceder descrita por Horsch e col. (1985). As plantas transgénicas são regeneradas a partir de rebentos que se desenvolvem em meio de selecção (100 mg/litro de canamicina). As plantas de tenra idade são ensaiadas relativamente à actividade de NPTII (resistência à canamicina), desenvolvidas até à maturidade e deixadas autopolinizar-se e desenvolver sementes. Reúnem-se as sementes de transformantes individuais e ensaia-se parte da amostra de sementes relativamente à presença da fitase. A partir dos clones com os mais elevados níveis de expressão em comparação com as sementes de controlo não transformadas, germinam-se as sementes restantes em canamicina (200 mg/litro) (também transgénicas para a fitase) e seleccionam-se e utilizam-se na propagação em massa de plantas capazes de produzir as quantidades máximas de fitase nas suas sementes. Estas podem então ser utilizadas, por exemplo, para experiências de digestão.

Para determinar a actividade de fitase encontrada nas sementes transgénicas, toma-se uma amostra de cerca de 50 mg de sementes e homogeneiza-se com um pilão num almofariz arrefecido com gelo em 1 ml de tampão de acetato de sódio 25 mM de pH 5,5. Depois da centrifugação ensaia-se o sobrenadante como se descreveu nos ensaios transientes. Em cinquenta e cinco plantas de tabaco transformadas independentemente, observou-se um nível de expressão máximo de fitase igual a 0,15% da proteína total da semente solúvel. Não se detectou actividade de fitase nos



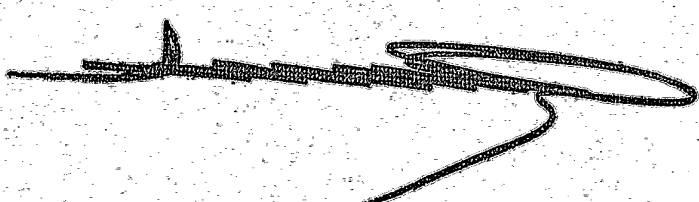
caules, raízes e folhas das plantas transgênicas. Não foi possível detectar actividade de fitase nas plantas não transformadas.

Exemplo 9

Transformação de Semente de Colza

Neste Exemplo, descreve-se a transformação de semente de colza por cocultivação de tecido da planta com Agrobacterium tumefaciens, contendo um vector binário com o gene quimérico da fitase. As plantas transgênicas podem ser escolhidas com base na resistência a antibióticos. As plantas transgênicas podem qser ensaiadas relativamente à actividade de fitase. Podem analisar-se os expressores elevados mais cuidadosamente e estes serem usados em experiências posteriores.

Mobiliza-se o mesmo construto de fitase quimérico num vector binário (pMO6429) na estirpe LBA4404 de Agrobacterium tumefaciens, de maneira semelhante à que se descreveu no Exemplo 7. Esta estirpe pode ser utilizada para transformar sementes de colza (Brassica napus cv. Westar). Para esse fim, segmentos do caule com a superfície esterilizada são retirados de plantas com a idade de cinco a seis semanas, precisamente antes da floração, são pré-condicionadas durante vinte e quatro horas em meio MS (Fry e col., 1987) com 1 mg/l de BAP e, em seguida, são cocultivadas durante quarenta e oito horas com Agrobacterium em chapas frescas com o mesmo meio. As plântulas transgênicas pode ser regeneradas a partir de rebentos, que se desenvolvem em meio de selecção (500 mg/l de carbenicilina, 40 mg/l de paromomicina) e depois analisadas como se descreveu no Exemplo 8 para o tabaco.



Exemplo 10

Ensaio de Actividade de Fitase

Moi-se um total de 25 miligramas de sementes da linha de plantas 413.25 de Nicotiana tabacum, que contém na totalidade aproximadamente 0,25 PTU. (PTU = unidades de fitase; define-se uma unidade de fitase como a quantidade de enzima que liberta fósforo inorgânico de fitato de sódio 1,5 mM com a velocidade de 1 micromole/minuto a 37°C e a pH 2,5).

Incubam-se as sementes moídas num volume total de 50 ml de tampão de glicina/HCL 250 mM de pH 2,5, contendo 0,86 grama de fitato de sódio $\cdot 11H_2O$. Muito embora a fitase de Aspergillus expresse a um pH ótimo igual a 2,5, assim como a 5,5, escolhe-se o valor de pH menor para excluir a actividade de fitase da planta.

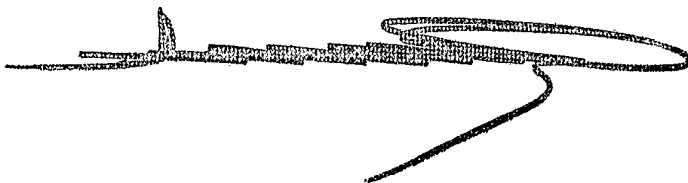
Incuba-se a mistura resultante durante quinze e sessenta minutos a 37°C. Interrompe-se a reacção por adição de 5 ml do incubado em 5 ml de TCA (ácido tricloro-acético) a 10%. Em seguida, adicionam-se 10 ml de reagente indicador (3,66 gramas de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ em 50 ml de solução de molibdato de amónio (2,5 gramas de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ e 8 ml de H_2SO_4 concentrado, diluído até perfazer 250 ml com água desmineralizada)) à solução de enzimas interrompida. A intensidade da cor azul é medida espectrofotometricamente a 700 nm.

O teor de fosfato inorgânico presente a T = 0 serve como ensaio em branco.

As determinações são indicativas da quantidade de fosfato libertado em relação com uma curva de calibração de fosfato na gama de 0 a 1 mM.

Exemplo 11

Incubação de Sementes de Nicotiana tabacum Moídas com Substâncias Alimentares



Numa experiência típica, incuba-se 0,25 gramas de farinha de soja extraída com dissolventes com 25 mg de sementes de Nicotina tabacum (linha de plantas 413.25) contendo aproximadamente 0,25 PTU, como se descreveu acima, com a exceção de não se ter feito a adição de fitato de sódio. Neste caso, o agente de incubação adicionado consiste numa mistura de 410 ml de tampão e 90 ml de água.

A libertação de fosfato a partir de fitato na farinha de soja extraída com dissolvente está representada graficamente na Figura 6. Sem sementes moídas adicionadas, não se observa qualquer actividade.

Numa experiência virtualmente idêntica, obtêm-se resultados semelhantes usando glúten de milho alimentado como substrato. Os resultados obtidos estão representados graficamente na Figura 6.

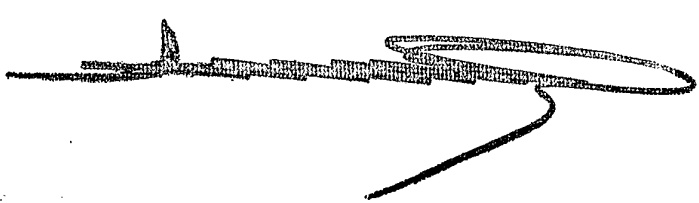
Não se observa actividade na ausência de sementes moídas ou quando se adicionam sementes moídas que não contêm actividade fitase.

Exemplo 12

Ensaio In Vitro de Sementes Transgênicas que Contêm Fitase, sob Condições que Simulam o Canal Digestivos de Frangos

Para se avaliar a eficácia da fitase produzida em sementes de tabaco transgénico, determina-se a actividade de fitase de Aspergillus num modelo que imita as condições que se encontram no tubo digestivo de frangos.

Incuba-se primeiramente uma amostra de alimentação normalizada para frangos a 1 g/15 ml de água durante sessenta minutos a 39°C para simular as condições de desenvolvimento dos animais. Subsequentemente, adicionam-se 5 ml de uma solução de pepsina (Merk; 5,28 gramas/litro ph 3,0 - ajustada com HCl), ajusta-se a ph igual a 3,0 com HCl e continua-se a incubação durante mais noventa minutos à mesma temperatura, para simular as condições existentes no estômago.



Durante o período de incubação, retiram-se amostras a fim de determinar a quantidade de fosfato libertada a partir do fitato presente na alimentação.

A acção da fitase de fungos é evidente a partir da Figura 10. Aumentando a dosagem de fitase de 250 para 1.000 PTU/Kg de alimento, obtém-se como resultado uma libertação aumentada de fosfato a partir da amostra do alimento.

Quando se adiciona uma amostra de sementes de tabaco transgénico (linhas 413.32; de fungos, obtém-se um aumento de libertação de fosfato semelhante (Figura 11). As sementes de tabaco de controlo, que não contêm fitase, foram também ensaiadas. Não se observou a libertação de fosfato em comparação com o controlo de ensaio em branco.

A comparação dos resultados com 50 gramas de sementes de tabaco transgénico/quilograma de alimentação com os obtidos com 500 e 750 PTU/Kg de alimentação indica que 1 grama de sementes de tabaco é aproximadamente igual a 12 PTU neste modelo de digestão de frangos in vitro

Exemplo 13

Ensaio em animais

Realizaram-se ensaios com frangos para mostrar a eficácia da fitase expressada em sementes de plantas, bem assim como a ausência de quaisquer efeitos negativos das sementes de tabaco sobre os resultados zootécnicos.

Colhem-se sementes de tabaco que expressam fitase e sementes de controlo. Moem-se as sementes em quantidades de 100 gramas com um peneiro (Retch-mill ZM1) que tem poros de 500 micrómetros, tendo o cuidado de conservar as sementes arrefecidas.

Alojam-se pintos com a idade de um dia (Hybro) em gaiolas de criação com dois tabuleiros (0,45

m²). Mantém-se a temperatura ambiente igual a 32°C durante os primeiros dois dias e depois diminui-se de 4°C na primeira semana. Em cada semana seguinte, a temperatura é diminuída de 2°C. Os frangos são criados num regime de uma hora de luz e três horas de escuridão.

As aves são vacinadas contra a doença de New Castle quando têm um dia de idade, usando a vacina Clone 30. Durante as experiências, os frangos são alimentados com dietas experimentais, todas com a forma de pasta e à vontade. Determina-se o crescimento e as proporções alimento/ganho de peso durante os períodos experimentais. Mede-se a disponibilidade aparente de fósforo total num período de três dias, durante o qual se mede o consumo de alimentos como entrada de matéria seca e colectam-se os excrementos quantitativamente.

A disponibilidade aparente de fósforo é definida como a diferença entre a entrada de fósforo e a excreção de fósforo com os excrementos.

Utilizam-se as seguintes dietas de controlo sem adição de fitase:

Dieta	Ca (%)	P total (%)	P de fitato (%)
1	0,60	0,45	0,30
2	0,75	0,60	0,30
3	0,90	0,75	0,30

Não se adiciona fosfato ao alimento na dieta 1 (dieta de base). As dietas 2 e 3 são suplementadas com cálcio e fósforo provenientes de uma mistura de fosfato dicálcico anidro e de fosfato de mono-amónio (proporção = 5:1). Todas as dietas experimentais são obtidas por adições à dieta de base (veja-se a Tabela 1).

A dieta experimental 4 contém fitase de origem microbiana com a concentração de 400PTU/quilograma de



alimento, preparada como é descrito por Van Gorcom e col., (1991).

A dieta experimental 5 é semelhante à dieta 4, mas adicionam-se sementes moídas de tabaco não transgênico à mistura de alimentação para se obter uma proporção final igual a 3 kg/90 g de alimento.

A dieta experimental 6 é também semelhante à dieta 4, mas adicionam-se 3 quilogramas de sementes de tabaco transgênico moídas (linha 413.25) a uma mistura de 90 quilogramas de alimento, para se obter uma concentração final de 400PTU/kg de alimento.

A experiência é realizada com cento e setenta e seis frangos em dezasseis gaiolas de alojamento (onze por gaiola), até atingirem a idade de vinte e quatro dias. Os tratamentos (dietas) são repetidos duas vezes e são atribuídos ao acaso aos animais que se encontram dentro da cada gaiola.

A disponibilidade de fósforo é medida a partir de vinte e um a vinte e quatro dias de idade.

Os resultados relativamente à disponibilidade de fósforo e ao crescimento dos animais a que se forneceram as dietas 4,5 e 6 mostram o efeito positivo da adição de fitase (Tabela 2). A comparação das dietas 4,5 e 6 também demonstra que a inclusão das sementes de tabaco no alimento é compatível com a ação de fitase microbiana no canal gastrintestinal dos animais domésticos, tais como frangos, e não mostra quaisquer efeitos negativos sobre os resultados zootécnicos.

TABELA 1

Composição da Dieta de Base em Experiências com Frangos

<u>Ingredientes</u>	<u>Teores (g/Kg)</u>
Milho amarelo	280,0
Sorgo (baixo teor de Tanino)	200,0
Farinha de semente de girassol	
(extraída com dissolvente)	80,0
Farinha de semente de soja (extraída	
com dissolvente, 48,8% proteína	350,0
óleo de semente de soja	58,5
Vitaminas	5,0
Matéria mineral	15,0
Calcário	1,0
Metronina sintética	1,0
Cr ₂ O ₃	0,5
	1001,0
ME (MJ/Kg)	13,1
Lisina	12,9
Metionina + cistina	9,1
Cálcio	6,0 (6,0 - 6,6)**
Fósforo total	4,5 (4,7 - 4,7)**
Fósforo orgânico fítico	3,0 (3,1 - 3,1)**

* Quantidade fornecida por kg de dieta: 12000 UI de vitamina A; 2000 UI de vitamina D₃; 5 UI de vitamina E; 1,5 mg de vitamina K₃; 1 mg de tiamina; 5 mg de riboflavina; 1 mg de piridoxina; 30 mg de ácido nicotínico; 7,5 mg de ácido D-pantoténico; 0,015 mg de vitamina B₁₂; 0,5 mg de ácido fólico; 350 mg de cloreto de colina; 75 mg de etoxiquina; 9,5 g de CaCO₃; 2,5 g de NaCl; 0,25 g de FeSO₄; 0,24 g de MnSO₄; 445 mg de CuSO₄; 60 mg de ZnSO₄; 105 mg de mistura de KI.

** Analisado para as experiências 1 e 2, respectivamente.

TABELA 2

Efeito da Fitase sobre a
Disponibilidade Aparente de P Total e de Ca, Teor de P
do Esterco e Comportamento dos Pintos

Dieta	Ca/P (g/Kg)	Fitase adicionada (units/Kg)	Assimilabilidade (%)		Quantidade de P no esterco por Kg de matéria seca de alimento ingerido (g)		Crescimento 0-24 d (g)
			P	Ca	P	Ca	
1	6/4,5	0	49,8	47,2	2,7		338
2	7,5/6	0	45,6	48,9	3,8		592
3	9/7,5	0	44,6	46,9	4,9		683
4	as 1	400	60,5	58,6	2,1		620
5	as 1	0	48,5	48,0	2,7		340
6	as 1	400	60,2	59,3	2,1		615



Exemplo 14

Clonagem do Gene de Alfa-Amilase de Bacillus licheniformis numa Cassete de Expressão para Expressão Constitutiva

Neste Exemplo, talha-se o gene de alfa-amilase de Bacillus licheniformis e clona-se numa cassete de expressão para a expressão constitutiva que também contém a informação do código para uma sequência de péptido de sinal de origem vegetal. Como operação final, clona-se o construto inteiro num vector binário, transfere-se para a estirpe LBA4404 de Agrobacterium tumefaciens, que é utilizada para transformar a planta de interesse. Pode clonar-se qualquer outro gene ou cADN de maneira semelhante à que se descreve na presente descrição relativamente ao gene de alfa-amilase.

Todas as transformações deste Exemplo são realizadas na estirpe DH5-alfa de E. coli K-12.

a) Talhe do Gene de Alfa-Amilase de Bacillus licheniformis

Digere-se o gene de alfa-amilase de Bacillus licheniformis (Figura 7) presente no vector pPROM54 (depositado no Centraal Bureau voor Schimmelcultures em 5 de Novembro de 1985 sob o número de acesso CBS 696.85) com XbaI e BclI. Clona-se o fragmento de XbaI/BclI no plasmídeo pOC18 linearizado com XbaI e BamHI, obtendo-se em resultado o plasmídeo pMOG318. Sintetiza-se um fragmento de SalI/BamHI utilizando a tecnologia de PCR com pMOG318 como modelo que cria o sítio de BamHI por utilização de um primário de incompatibilidade (representado na Figura 7). Clona-se o fragmento de SalI/BamHI obtido por PCR no plasmídeo pIC-19R (Marsch e col., 1984) e digere-se com SalI e BamHI, obtendo-se como resultado o plasmídeo pMOG319. O fragmento de SalI, que contém a extremidade 5' do gene de alfa-amilase, de pMOG318 (usando o sítio de SalI presente em pUC18) é clonado em pMOG319, linearizado com SalI. Obtém-se como resultado o plasmídeo pMOG320, que contém o gene de alfa-amilase completo.

b) Construção do Vector pMOG29

Constrói-se o vector pMOG29 como se descreveu no Exemplo 4 (a).

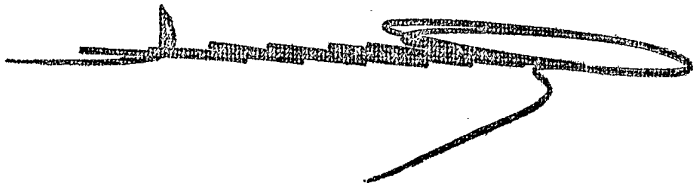
c) Clonagem do Gene de Alfa-Amilase de Bacillus licheniformis no Vector Binário

Digere-se o plasmídeo pMOG320 com HgaI e BamHI. Clona-se o fragmento HgaI/BamHI, que codifica alfa-amilase madura do aminoácido 9 para diante, numa ligação de três vias com o oligonucleótido duplex sintético F (Figura 4) em pMOG29, linearizado com SphI e BamHI, obtendo-se como resultado o plasmídeo pMOG321. O oligonucleótido duplex tem informação que codifica os dois aminoácidos finais do péptido de sinal PR-8 e os primeiros nove aminoácidos de alfa-amilase madura. O construto completo, contendo o gene de alfa-amilase quimérico, é inserido como um fragmento de EcoRI/HindIII. O plasmídeo binário resultante pMOG227 (Figura 9) é mobilizado, num ajustamento triparental, com a estirpe RK2013 de *E. coli* K-12 (contendo o plasmídeo pRK2013) (Ditta e col., 1980), na estirpe LBA4404 de *Agrobacterium* que contém um plasmídeo com os genes de virulência necessários à transferência de T-ADN para a planta.

Exemplo 15

Expressão Estável de Alfa-Amilase de Bacillus licheniformis em Tabaco

Neste Exemplo, transforma-se tabaco por cocultivação do tecido da planta com *Agrobacterium tumefaciens* contendo um vector binário com o gene de alfa-amilase quimérico. Seleccionam-se as plantas transgênicas com base na resistência a antibióticos. Ensaia-se as sementes das plantas transgênicas relativamente à actividade de alfa-



-amilase. Analisam-se os expressores elevados mais cuidadosamente e utilizam-se em experiências posteriores.

Para as experiências de transformação, utiliza-se a estirpe LBA4404 (pMOG227) de Agrobacterium. Realiza-se a transformação de tabaco Nicotiana tabacum SR1) usando a cocultivação de discos de folhas de acordo com a maneira de proceder de Horsch e col. (1985). As plantas transgênicas são regeneradas a partir de rebentos que se desenvolvem em meio de selecção (100 mg/litro de canamicina). Ensaia-se as plantas de tenra idade relativamente à actividade de NPTII, desenvolvem-se até à maturidade e deixam-se autopolinizar e fornecer sementes. Reunem-se as sementes de transformantes individuais e ensaia-se parte da amostra de sementes relativamente à presença da alfa-amilase.

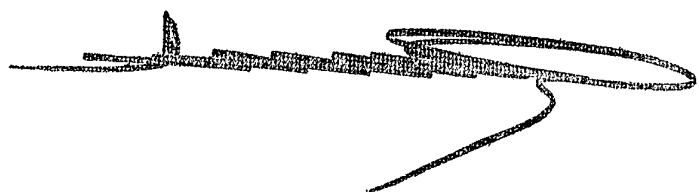
Dos clones com os níveis de expressão mais elevados, em comparação com sementes de controlo não transformadas, as sementes restantes são germinadas em canamicina (200mg/litro) (também transgênicas para alfa-amilase) e seleccionam-se e utilizam-se para a propagação em massa de plantas capazes de produzir sementes que contém as quantidades máximas de alfa-amilase. Observou-se um nível de expressão máximo de alfa-amilase de 0,4% da proteína total solúvel das sementes. Estas sementes podem então ser utilizadas, por exemplo, para experiências de digestão.

Exemplo 16

Aplicação de Alfa-Amilase Formulada em Sementes para a Liquefação de Amido

Aplicou-se na liquefação de amido alfa-amilase de Bacillus licheniformis, expressada em sementes de tabaco, procedendo da seguinte maneira:

Colhem-se 100 gramas de sementes de tabaco que expressam alfa-amilase e sementes de controlo. Moem-se as sementes com um moinho dotado de um peneiro (Retch-



-mill ZM1) tendo poros de 250 micrómetros, tendo o cuidado de manter as sementes arrefecidas. Para determinar o seu teor de alfa-amilase, as sementes moídas foram extraídas com 10 volumes de tampão 0,5 M de glicina, pH 9,0, com CaCl_2 10 mM, durante trinta minutos a 0°C. Utilizou-se o líquido sobrenadante para a determinação de alfa-amilase pelo método de Phadebas (Pharmacia Diagnostics). As unidades são referidas como TAU (unidades de alfa-amilase termostável).

Realizaram-se ensaios de liquefação procedendo da seguinte maneira:

Suspensão de amido (composição: 3,3 quilogramas de amido de milho ou de batata, D.S. (substância seca) 88% (2,904 quilogramas de amido); 5,45 litros de H_2O ; D.S. da suspensão fica igual a 33%; corrigiu-se o pH para 6,5 com ácido sulfurónico 1 N ou com NaOH 1 N.

Adicionaram-se ou sementes moídas ou alfa-amilase microbiana numa quantidade equivalente a 4,4 TAU/g de D.S.) e aquece-se a 100°C o mais rapidamente possível e mantém-se a esta temperatura durante dez minutos. Em seguida, aquece-se a suspensão até 95°C e mantém-se a esta temperatura durante duas horas. Em seguida, acidulam-se as amostras com H_2SO_4 para se obter um pH igual a 3,5 e colocam-se num banho de água à ebulição durante dez minutos a fim de interromper a actividade enzimática antes de se determinar a DE (equivalente de dextrose) e o modelo de hidrólise foi determinado por HPLC. Utilizou-se uma coluna Biorad HPX-42A para a análise de HPLC com água desmineralizada como eluente.

Obteve-se o modelo de oligossacárido a partir de amido de batata e de milho usando sementes de plantas transformadas A); B) Maxamyl[®] (alfa-amilase de Bacillus licheniformis fornecida por Gist-Brocades N. V. Delft, Holanda); e C) Dexlo[®]CL (alfa-amilase de Bacillus amyloliquefaciens fornecida por Gist-Brocades) e compararam-se (Figuras 12 e 13). O modelo de oligossacárido obtidos a partir de sementes de plantas transformadas e de Maxamyl[®] são idênticas, muito embora ambas difiram da obtida com Dexlo[®], confirmando que a alfa-amilase de Bacillus licheniformis é

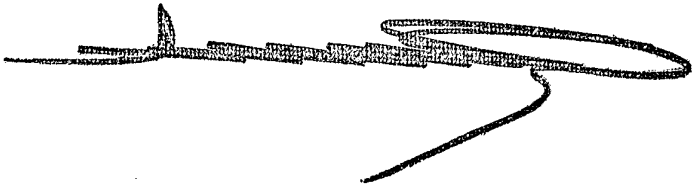
produzida pelas sementes das plantas. Os valores de DE obtidos com as sementes das plantas (Tabela 3) estão dentro da gama comercialmente aceitável ($DE \geq 12$, preferivelmente $DE \geq 16$) (Reilley, 1985).

TABELA 3

Valores Equivalentes de Dextrose (DE) Obtidos por Hidrólise de Amido de Milho e de Batata

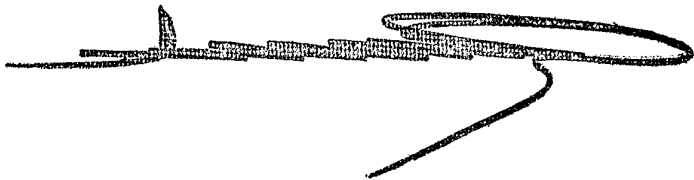
	Amido de Batata DE	Amido de Milho DE
Maxamyl [®] WL7000	18	16
Sementes de tabaco não transformadas	16	13
Sementes de tabaco transformadas	0	0
Dexlo [®] CL	15	18

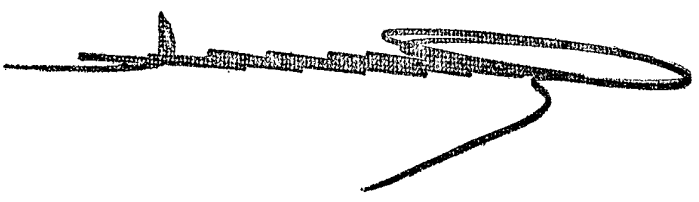
Muito embora a presente invenção tenha sido descrita com referência a formas de realização específicas, os peritos no assunto sabem que podem fazer-se várias modificações e podem ser substituídos vários equivalentes sem afastamento do real espírito e âmbito da invenção. Além disso, podem fazer-se muitas modificações de maneira a adaptar-se o processo a uma situação particular, material, planta, semente, processo, operação de processo ou operações, ao objecto, espírito e âmbito da invenção. Todas essas modificações se pretende que fiquem incluídas dentro do âmbito das reivindicações seguintes.



REFERÊNCIAS

- S.B. Altenbach, K.W. Pearson, G. Meeker, L.C. Staraci & S.S.M. Sun (1989) *Plant Mol. Biol.* 13, 513.
- Auffray & Rougeon (1980) *Eur. J. Biochem.* 107, 303-314.
- S.J. Barker, J.J. Harada & R.B. Goldberg, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 458.
- D.C. Baulcombe, G.R. Saunders, M.W. Bevan, M.A. Mayo & B.D. Harrison (1986) *Nature* 321, 446.
- H. Bäumlein, U. Wobus, J. Pastell, & F.C. Kafatos (1986) *Nucl. Acids Res.* 14, 2707.
- R.N. Beachy, Z.-L. Chen, R.B. Horsch, S.G. Rogerz, N.J. Hoffmann, & R.T. Fraley (1985) *EMBO J.* 4, 3047.
- M. Bevan, (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 8711.
- F.T. Brederode, E.C. Koper-Zwarthoff & J.F. Bol (1980) *Nucl. Acids Res.* 8, 2213.
- M.M. Bustos, M.J. Gultinan, J. Jordano, D. Begun, F.A. Kalkan & T.C. Hall (1989) *Plant Cell* 1, 839.
- R. Casey & C. Domoney (1987) *Plant Mol. Biol. Reporter* 5, 261.
- B.B. Chee, R.C. klassy & J.L. Slightom (1986) *Gene* 41, 47.
- B.J.C. Cornelissen, R.A.M. Hooft van Huijnsduijnen & J.F. Bol (1986) *Nature* 321, 531.
- G. Della-Cioppa, G.M. Kishore, R.N. Beachy & R.T. Fraley (1987) *Plant Physiol.* 84, 965.
- G. Ditta, S. Stanfield, D. Corbin & D.R. Helinski (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7347.
- C. Dorel, T.A. Voelker, E.M. Herman & M.J. Chrispeels (1989) *J. Cell Biol.* 108, 327.
- J.J. Doyle, M.A. Schuler W.D. Godette, V. Zenger, R.N. Beachy, & J.L. Slightom (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9228.
- J.R. Ellis, A.H. Shirsat, A. Hopher, J.N. Yarwood, J.A. Gatehouse, R.R.D. Croy & D. Boulter (1988) *Plant Mol. Biol.* 10, 203.
- R.L. Fischer & R.B. Goldberg (1982) *Cell* 29, 651.
- J. Fry & A. Barnason, & R.B. Horsch, (1987) *Plant Cell Reports* 6, 321.

- 
- C.S. Gasser & R.T. Fraley, (1989) *Science* 244, 1293.
- R.M. Goodman, V.C. Knauf, C.M. Houck & L. Comai, (1987) PCT/WO 87/00865.
- W.J. Gordon-Kamm, T.M. Spencer, M.L. Mangano, T.R. Adams, R.J. Daines, W.G. Start, J.V. O'Brien, S.A. Chambers, W.R. Adams Jr., N.G. Willets, T.B. Rice, C.J. Mackey, R.W. Krueger, A.P. Krausch & P.G. Lemaux (1990) *The Plant Cell* 2, 603.
- H. Guilley, R.K. Dudley, G. Jonard, E. Balazs & K.E. Richards, (1982) *Cell* 30, 763.
- J.J. Harada, S.J. Barker, & R.B. Goldberg (1989) *Plant Cell* 1, 415.
- T. Hattori, T. Nakagawa, M. Maeshima, K. Nakamura & T. Asahi, (1985) *Plant Mol. Biol.* 5, 313.
- A. Hiatt, R. Cafferkey & K. Boedish (1989) *Nature* 342, 76.
- T.J.V. Higgins, (1984) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 191.
- T.J.V. Higgins, E.J. Newbigin, D. Spencer D.J. Llewellyn & S. Craig, (1988) *Plant Mol. Biol.* 11, 683.
- A. Hoekema, P.R. Hirsch, P.J.J. Hooykaas & R.A. Schilperoort, (1983) *Nature* 303, 179.
- L.M. Hoffman, D.D. Donaldson, R. Bookland, K. Rashna & E.M. Herman, (1987) *EMBO J.* 6, 3213.
- R.B. Horsch, J.E. Fry, N.L. Hoffman, D. Eichholtz, S.G. Rogers & R.T. Fraley (1985) *Science* 227, 1229.
- G. Iturriaga, R.A. Jefferson & M.W. Bevan, (1989) *Plant Cell* 1, 381.
- R.A. Jefferson (1987) *Plant Mol. Biol. Reporter* 5, 387.
- J. Jordano, C. Almoguera & T.L. Thomas (1989) *Plant Cell* 1, 855.
- R. Kay, A. Chan, M. Dayly & J. McPherson, (1987) *Science* 236, 1299.
- H. Klee, R. Horsch & S. Rogers, (1987) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38, 467.
- E. Krebbers & J. Vandekerckhove, (1990) *TIBTECH*, 8, 1.
- M.A. Larkins (1981) em: *The biochemistry of plants* Vol. 6 (Academic Press, San Diego: P.K. Stumpf & E.E. Conn, eds.) Capitulo 11. P. 471.
- B. Lee, K. Murdoch, J. Topping M. Kreis & M.G.K. Jones



(1989) Plant Mol. Biol. 13, 21.

G.W. Lycett, A.J. Delauney, J.A. Gatehouse, J. Gilroy, R.R.D. Croy & D. Boulter (1983) Nucl. Acids Res. 11, 2367.

G.W. Lycett R.R.D. Croy, A.H. Shirsat & D. Boulter (1984) Nucl. Acids Res. 12, 4493.

C. Mariani, M. de Beuckeleer, J. Truettner, J. Leemans & R.B. Goldberg, (1990) Nature 347, 737.

J.L. Marsh, M. Erfle & E.J. Wykes (1984) Gene 32, 481.

I.J. Mettler, (1987) Plant Mol. Biol. Rep. 5, 346.

J.K. Okamura, K.D. Jokufu & R.B. Goldberg (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8240.

P.P. Pang, R.E. Pruitt, & E.M. Meyerowitz, (1988) Plant Mol. Biol. 11, 805.

I. Potrykus, (1990) Bio/Technol. 8, 535.

S.E. Radke, B.M. Andrews, M.M. Moloney, M.L. Crough, J.C. Kridl, & V.C. Knauf (1988) Theor. Appl. Genet. 75, 685.

P.J. Reilly, (1985) em: Starch Conversion Technology (Marcel Dekker, Inc., New York: G.M.A. Van Beynum & J.A. Roels, eds.), Capitulo 5, p. 101.

C.D. Riggs, D.C. Hunt, J. Lin & M.J. Chrispeels (1989) Plant Sci. 63, 47.

K.W. Rodenburg, M.J.A. DeGroot, R.A. Schilperoort & P.J.J. Hooykaas, (1989) Plant Mol. Biol., 13, 711.

A.J. Ryan, C.L. Royal, J. Hutchinson & C.H. Shaw (1989) Nucl. Acids Res. 17, 3584.

S.R. Scofield, & M.L. Crouch (1987) J. Biol. Chem. 262, 12202.

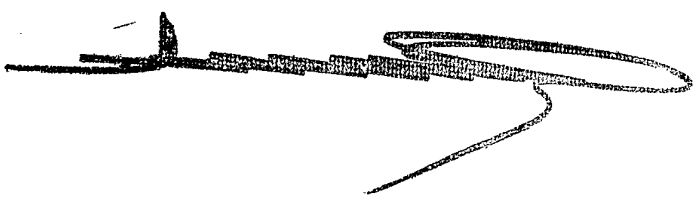
R.A. Schilperoort, A. Hoekema, & P.J.J. Hooykaas (1984) Pedido de Patente Europeia N^o. 0 120 516.

C. Sengupta-Gopalan, N.A. Reichert, R.F. Barker, T.C. Hall & J.D. Kemp, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3320.

K. Shimamoto, R. Terada, T. Izawa & H. Fujimoto, (1989) Nature 338, 274.

M.A. Shotwell & B.A. Larkins (1989) em: The biochemistry of plants Vol. 15 (Academic Press, San Diego: P.K. Stumpf & E.E. Conn, eds.) Capitulo 7. p. 297.

P.C. Sijmons, B.M.M. Dekker, B. Schrammeijer, T.C.



Verwoerd, P.J.M. van den Elzen & A. Hoekema, (1990) Bio/Technol. 8, 217.

J.L. Slightom, M.D. Schaber & R.A. Kramer (1986) em: Molecular biology of seed storage proteins and lectins (Waverley Press, Baltimore: L.M. Shannon & M.J. Chrispeels, eds.) Am. Soc. Plant Physiol. p. 183.

J.J. Smith & N.V. Raikhel (1989) Plant Mol.Biol. 13, 601.

T. Vaara, M. Vaara, M. Simell, A. Lehmussaari & A. Caransa, (1989) Pedido de Patente Europeia O 321 004.

J. Vandekerckhove, J. VanDamme, M. VanLijsebettens, J. Botterman, M. DeBlock, A. DeClerq, J. Leemans, M. Van Montagu & E. Krebbers (1989) Bio/Technol. 7, 929.

R.F.M. van Gorcom, W. van Hartingsveldt, P.A. van Paridon, A.E. Veenstr, R.G.M. Luiten, G.C.M. Selten (1991), Pedido de Patente Europeia B9202436.5, Publicação Nº. O 420 358, depositado em 27 de Setembro de 1989.

V. Vasil, F. Redway & I.K. Vasil (1990) Bio/Technol. 8, 429.

A. Vitale, & R. Bollini (1986) em: Molecular biology of seed storage proteins and lectins (Waverley Press, Baltimore: L.M. Shannon & M.J. Chrispeels, eds.) Am. Soc. Plant Physiol. p. 175.

T.A. Voelker, E.M. Herman & M.J. Chrispeels, (1989) Plant Cell 1, 95.

R.A. Vonder Haar, R.D. Allen, E.A. Cohen, C.L. Nessler & T.L. Thomas (1988) Gene 74, 433.



REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

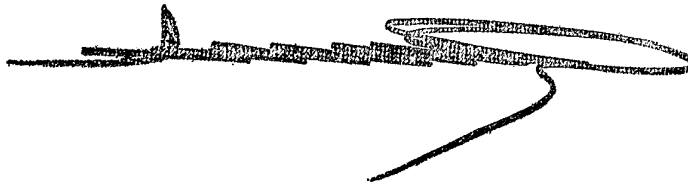
Processo para catalisar reacções aceleráveis por enzimas, mediante adição ao meio reaccional de sementes de plantas transgénicas, caracterizado por, a um meio reaccional que contém um substrato em que a enzima de interesse é capaz de catalisar uma reacção enzimática do referido substrato na mistura reaccional, se adicionar as sementes obtidas a partir de plantas transgénicas as quais contém uma quantidade reforçada da enzima de interesse.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a mencionada enzima ser uma enzima heteróloga em relação a uma fonte não transgénica do tipo brávia da planta.

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se moerem as sementes antes de serem adicionadas à mistura reaccional.



- 4a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a moagem se realizar depois da adição das sementes à mistura reaccional.

- 5a -

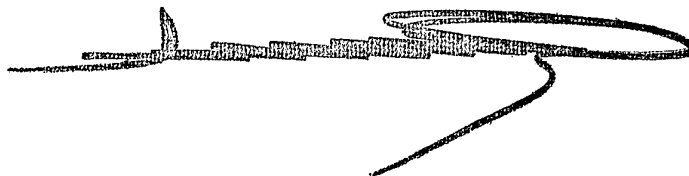
Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a enzima ser uma enzima da classe das hidrolases.

- 6a -

Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de a mencionada enzima da classe das hidrolases ser escolhida do grupo que consiste em proteases, celulasas, hemicelulasas, fosfatases, lipases, pectinases, amilases, lisózymas, pelulanases e quitinases.

- 7a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a enzima ser uma liase.



- 8a -

Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de a liase ser pectinilase.

- 9a -

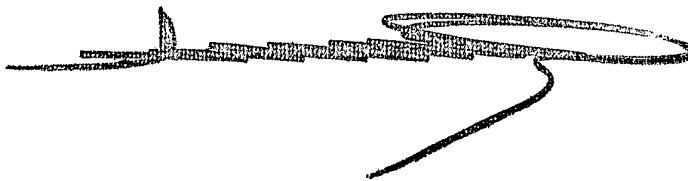
Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a enzima ser uma isomerase.

- 10a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a isomerase ser gluco-isomerase.

- 11a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se escolher a enzima do grupo que consiste em fitase, -amilase, celobio-hidrolase, endoglucanase, endoxilanase, endogalactanase, -galactosidade, arabinase, serinoproteases, quimosina, lipases gástricas, pectina-lisases e glucose-isomerases.



- 12a -

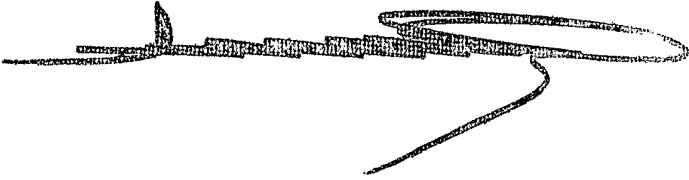
Processo para provocar o aumento da absorção dos componentes nutritivos de um determinado alimento ou produto alimentar por um animal, caracterizado por se combinar com o referido alimento ou produto alimentar as sementes obtidas a partir de plantas transgênicas contendo uma quantidade reforçada de uma enzima de interesse a qual é capaz de catalisar as reacções de digestão do alimento ou do produto alimentar, obtendo-se como resultado o aumento da absorção dos componentes nutritivos presentes no alimento pelo animal que ingere o alimento ou o produto alimentar.

- 13a -

Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por se escolher a enzima do grupo que consiste em fitase, celulasas, hemicelulasas, pectinases e amilases.

- 14a -

Processo para o tratamento de um animal que sofre de perturbações de funcionamento do aparelho digestivo, caracterizado por se administrar ao referido animal uma quantidade suficiente de sementes obtidas a partir de plantas transgênicas as quais contêm uma quantidade aumentada de uma enzima de interesse que é capaz de catalisar as reacções da digestão.



- 15a -

Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por se moerem as sementes antes de se efectuar a sua administração ao animal.

- 16a -

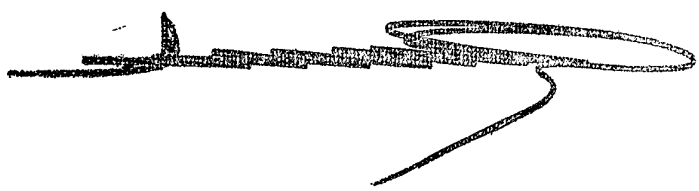
Processo para catalisar reacções in vitro, caracterizado por se adicionar a uma mistura reaccional que contém um substrato ou os substratos a ser catalisados, sementes obtidas a partir de plantas transgénicas as quais contém uma quantidade reforçada de pelo menos uma enzima de interesse, sendo a enzima ou as enzimas de interesse capazes de catalisar a reacção do substrato ou dos substratos presentes na mistura reaccional.

- 17a -

Processo para a preparação de composições, caracterizado por se incorporar na composição sementes obtidas a partir de plantas transgénicas as quais contém uma quantidade reforçada duma enzima de interesse, directamente sem se efectuar a extracção nem a purificação da enzima de interesse.

- 18a -

• Processo de acordo com a
• reivindicação 17, caracterizado por se moerem as sementes
- incorporadas na sua formulação.



- 19a -

Processo para a obtenção de uma variedade de plantas transgênica que produz sementes em que expressam uma quantidade reforçada de uma enzima que interessa para utilização directamente num processo industrial, caracterizado por se transformar a planta com plasmídeo pMOG413.

- 20a -

Processo para a obtenção duma variedade de plantas transgênica, caracterizado por se transformar a planta com plasmídeo pMOG429.

- 21a -

Processo para a obtenção duma variedade de plantas transgênica, caracterizado por se transformar a planta com plasmídeo pMOG227.

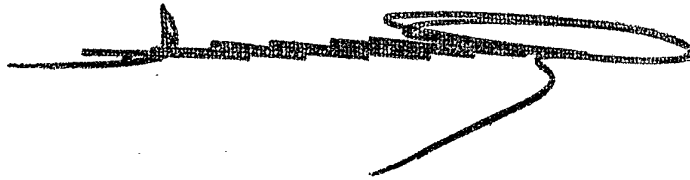
- 22a -

Plasmídios prara transformação de plantas hospedeiras e obtenção de plantas transgênicas que expressam maiores proporções de enzimas de interesse nas sementes, designados respectivamente, pMOG413, pMOG429 e pMOG227.

A requerente reivindica a prioridade do pedido de patente norte-americano apresentado em 23 de Março de 1970, sob o número de série 498.561.

Lisboa, 22 de Março de 1991.
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.



R E S U M O

"PROCESSO PARA CATALISAR REACÇÕES ACELERÁVEIS POR ENZIMAS,
MEDIANTE ADIÇÃO AO MEIO REACCIONAL DE SEMENTES DE PLANTAS
TRANSGÊNICAS E PARA OBTENÇÃO DAS REFERIDAS SEMENTES"

A invenção refere-se a um processo para a catalisar reacções aceleráveis por enzimas; mediante adição ao meio reaccional de sementes de plantas transgênicas, que compreende, a um meio reaccional que contém um substrato em que a enzima de interesse é capaz de catalisar uma reacção enzimática do referido substrato na mistura reaccional, adicionar-se as sementes obtidas a partir de plantas transgênicas as quais contém uma quantidade reforçada da enzima de interesse.

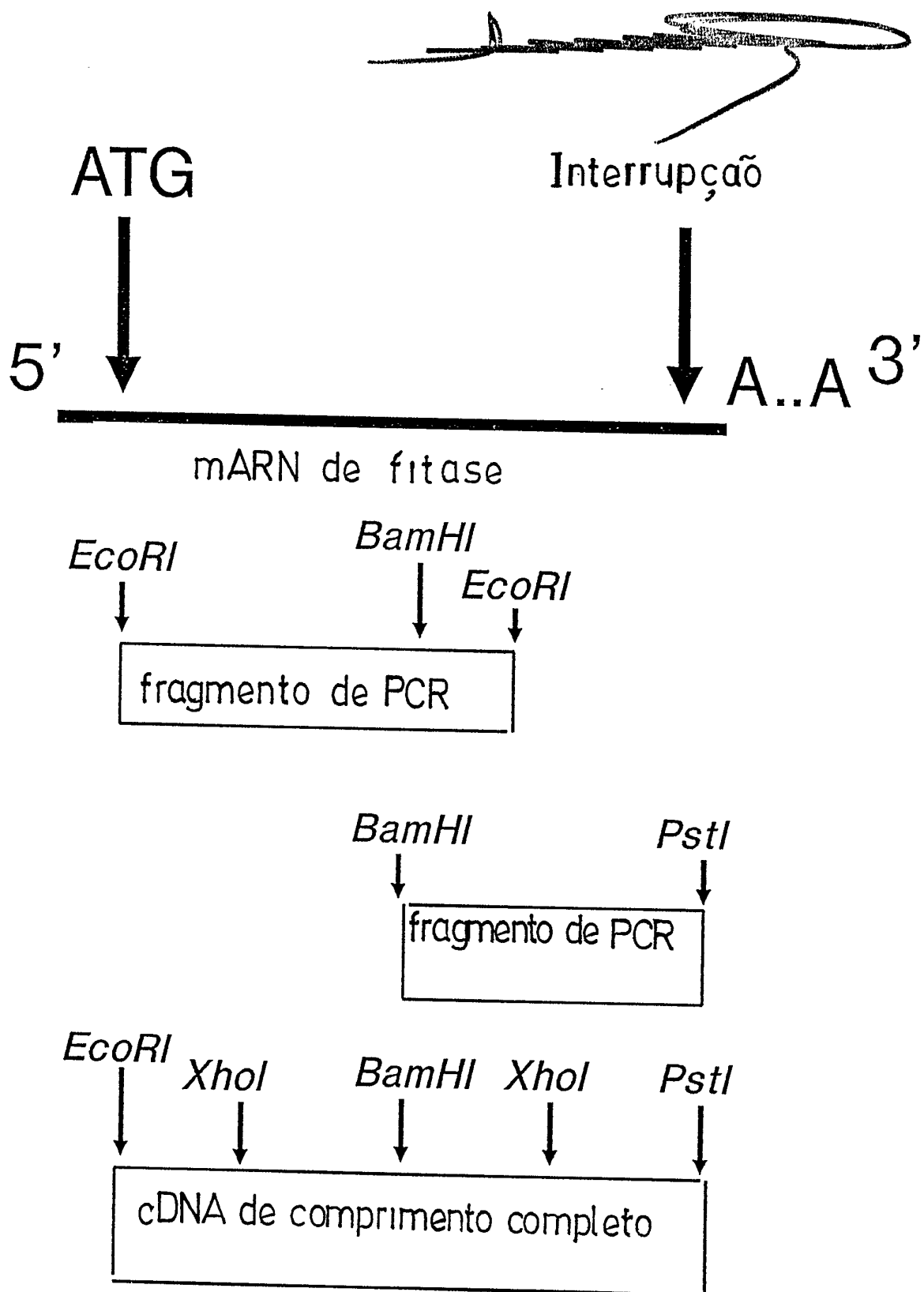
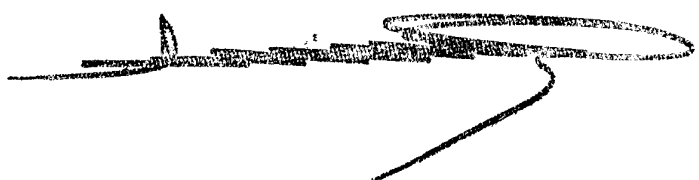


FIG. 1



5' GGAATTCTGGTACCTCCCGGAGGATCCATCTAGAGCTCGAGTAAGCTTC 3'

FIG. 2

FIG. 3 (FOLHA 1 de 3)

ECORI

TATTTACGTT CGTCCGGATA ACGGACGGGT TTTCAGTTCCG GGTTCGGTTC GGATTCGGG
 TTCCGGATTT ATATGGCCCT AGCCTAAATT CGAGTGTGAC CGTTAATCCG TTATACTACG
 ATCTAATCAA AACATGTCTA GATCAAAATTT GCAATCTTAT TGCATATTTT TTTGTCTAAC
 AATATTACTA GAAATCTTTG TTTATTACCA ACATTAGTAA AACTATATCT TAACCAAAGT
 TGCAGGAGCA GTTCGTTTCA AACGTAATTG CTATAGTGAT GTTATTGTAA ATTTGTTATA
 CTGATCAAAAT GTAAAGAATA ATACAATTTT ATATATATCT GACAAACAAA TCAGTATATA
 TATACAAGAA ATATATATTT TGTCCCTATTA CATATGCCTA TCTCAAAGTT GATGTGTAAA
 GACATGCAGT TCAATAAGCC ATGCAAAATTG AGATGTGTCA AACTCCCTTC GTTAATATGT
 GTTTCTTAC AATGTGAAGC CAAATTAAAT TTTCAGAAGA AGACATAAAG ATAGCAACTC
 AAATGAAGTG TAGATTGTAC ATAGTCGACT CTATATACCT GGTTCCTTATC TCATTCAATT
 TATCCTCAAA AAAATTTATC AACATCTATA CAAATAAGTT CACTATAAAT AGCTTCATCT

*

AACTCAGCTG TAAGACCAGA AAAACCACAA CAACTAAGTA AAGAGAAAAAT GGCTCGGCTC

NCOI

TCATCTCTTC TCTCTTTTTC CTTAGCACIT TTGACTTTTC TCCATGGCTC TACAGCTCAA
 CAGTTTCCAA ACGAGTGTCA GCTAGACCAG CTCAATGCAC TGGAGCCGTC ACACGTACTT
 AAGGCTGAGG CTGGTCGCAT CGAGGTGTGG GACCACCACG CTCCTCAGCT ACGTTGCTCT
 GGTGTCCTCT TTGTACGTTA CATCATCGAG TCTAAGGGTC TCTACTTGCC CTCTTCTCTT
 AGCACCGCGA GGCTCTCCTT CGTGGCTAAA GGTACGTGAA TCTGATTTTG ATACTATATG

FIG 3 (FOLHA 2 de 3)

AGTATCGAGA TTCAAATTCG TGATCTTTAA GGTTCAGTCT TTTGAGAAAA GTGTTGTAGT
AAGTATATCA CTATACACGT GCTAAGGTTT TGATCAATAA CATTATAATA TTTTTTTTGT
TAAATTTATAA CCTAAATATA TGGTCGATGT TCACAGAACT GCGCACTAAA TTTTTTTTTT
TTGGTTTGTT ACATTATAGG AGAAGGTCTT ATGGGGGAGAG TGGTCCTGTG CGCCGAGACA
TTCCAGGACT CATCAGTGT TCAACCAAGC GGTGGTAGCC CCTTCGGAGA AGTTCAGGGC
CAAGGACAAC AAGTCAGGG CCAAGGCCAC CAAGGTCAAG GCCAAGGACA ACAGGGCCAA
CAAGGTCAGC AAGGACAACA GAGTCAAGGC CAGGGTTTCC GTGATATGCA CCAGAAAAGTG
GAGCACATAA GGA CTGGGA CACCATCGCT ACACATCCCG GTGTAGCCCA ATGGTTCTAC
AACGACGGAA ACCAACCACT TGTCATCGTT TCCGTCTCTG ATTTAGCCAG CCACCAGAAT
CAGCTCGACC GCAACCCAAAG GGTATATAA TAAACAAAAA CCTCAAAAAGC AATCAAGGGC
AAATCTCCTT TTTAGCATAT TTCTAAATTT ATATCACAAA AATAGCAATC AAAAACTAAA
ATGACCAAAA TCATACTTTT CTAAAGTTTAT CCTTTGAAA TTTTAAATTT TTTATTTTTC
AAATTTGAAT CTATACGCC AAACCTCAT TCTCAACCCCT AAACCATAAC CCTAATCTAA
ACCTTAAACC CTAAACCCCA AACCTTAAAC CCTAAACCCCT AAATCCTAAA CCCACGCCCT
AAACTCTAAA CCTAAACCC TAAGTTTGTG ACTTTTGATA AAACATTAAAG TGCTATTTTG
TGACTTTGAC CTGGGTGCTA GTTTGAGAAC ATAAACTTGA TTTAGTGCTA TTTTGTCTT
TTTCTCATCA TATAACTTCT TTTATAATTA CAGAAATATCA AAAATATGGT TTTCTGTTTT
ATCTGTAGCC ATTTTACTTA GCCGGAACA ACCCACAGG CCAAGTATGG ATAGAAGGAC
GCGAGCAACA GCCACAAAAG AACATCCTTA ATGGCTTCAC ACCAGAGGTT CTTCGCTAAAG
CTTTCAGAT CGATGTTAGG ACAGCGCAAC AACTTCAGAA CCAGCAAGAC AACCGTGGAA
ACATTATCCG AGTCCAAAGC CCATTCAGTG TCATTAGGCC GCCTTTGAGG AGTCAGAGAC
CGCAGGAGGA AGTTAACGGT TTAGAAGAGA CCATATGCAG CGCGAGGTGC ACCGATAAAC

FIG.3 (FOLHA 3 de 3)

TCGATGACCC ATCTAATGCT GACGTATACA AGCCACAGCT CGGTTACATC AGCACTCTGA
ACAGCTATGA TCTCCCCATC CTTCGCTTCC TTTCGTCTCTC AGCCCTCCGT GGATCTATCC
GTCAAAAACGC GATGGTGCTT CCACAGTGA ACGCAAACGC AAACGCGGTT CTCTACGTGA
CAGACGGGA AGCCCATGTG CAGTGGTTA ACGACAAACG TGACAGAGTG TTCGACGGAC
AAGTCTCTCA AGACAGCTA CTTCCTATAC CACAAGGTTT CTCCGTGGTG AAACGCGCAA
CAAAGCGAACA GTTCCGGTGG ATCGAGTTCA AGACAAACGC AAACGCACAG ATCAACACAC
TTGCTGGACG AACCTCGGTC TTGAGAGGTT TACCATTAGA GGTCATATCC AATGGGTACC
AAATCTCACT CGAAGAAGCA AGAAGGGTTA AGTTCAACAC GATCGAGACC ACTTTGACGC

BglII

ACAGCAGTGG CCCAGCTAGC TACGGAGGSC CAAGGAAGGC TGATGCTTAA GAGCTTACCC
AGTGAACCTC TACTGTAAAA GGAAGTTAAA TAGTAATAAA AAGAGTAATA ATAATGTACG
CAAAATGTGAC TGGTTTTGTA GAGGTTTTAG AATGTTACTC CTTTCTCTGAA TAAAATAACT
CTTTTCTATC AAGGTTTAGC TAGCTGGGCT AATCTATCAA CTTTCATTTTT CGACTACGTC

HindIII

TACACATACG TATACGAGAT GCAGGCTTCT CCGAGGATAT AGTGACAGTA TCT

FIG. 4 (FOLHA 1 de 2)

Oligonucleotido duplex A

5'GGGTTTATTATTAAATTTCTTCAAAATACTCCACCATGGGTAAACGGATCCA 3'
 3'CCCAAAATAAAATTAAGAAAGTTTATGAAGGTGGTACCCATTGCCCTAGGTTCGA 5'

NcoI BamHI HindIII

Oligonucleotido duplex B

5'CATGAAACTTCCTCAAAAGCTTCCCCTTTTATGCCCTTCCCTTGTGTTTGGCCAATACTTTGTAGCTGTACGCATGCTCGAG 3'
 3' TTTGAAGGAGTTTTCGAAGGGGAAATACGGAAGGAAACAAACCGGTTATGAAACATCGACAATGCGTACGAGCTCCTAG 5'

SphI XhoI BamHI

Oligonucleotido duplex C

5' CT CTGGCAGTCCCCCGCCTCGAGCCCCCTGCAG 3'
 3' GTACGA GACCGTCAGGGCGGAGCTCGGGGACGTCCTAG 5'

SphI XhoI PstI BamHI

PROB12 Mature phytase
 signal
 peptide

FIG. 4 (FOLHA 2 de 2)

Oligonucleótido duplex D

		<u>NcoI</u>		<u>BglII</u>		<u>XhoI</u>		<u>EcoRV</u>		<u>PstI</u>		<u>HindIII</u>	
		HisGlySerThrAla		LeuAlaValProAlaSer									
5'	CATGGCTCTACAGCT	CTGGCAGTCCCGCCTCGAGGATATCCTGCAGATCTCCCA	3'										
3'	CGAGATGTCGA	GACCGTCAGGGCGGAGCTCCTATAGGACGCTAGAGGGGTTCCA	5'										
Crua péptido		Frase madura		Sítio de clonagem múltipla									
de sinal													

Oligonucleótido duplex E

5'	AATTCAGATCTCCATGGATCGATGAGCT	3'
3'	GTCTAGAGGTACCTAGCTAC	5'

Oligonucleótido duplex F

HgaI SÍTIO DE
α-AMILASE

		<u>SphI</u>		<u>HgaI</u>	
		CT		GCAAATCTTAATGGACGCTGATG	
5'	GTACGA	3'	CGTTTGAATTACCCTGCGACTACGTCAT	5'	
3'	PROB12	5'	α- Amilase		
péptido		de sinal			

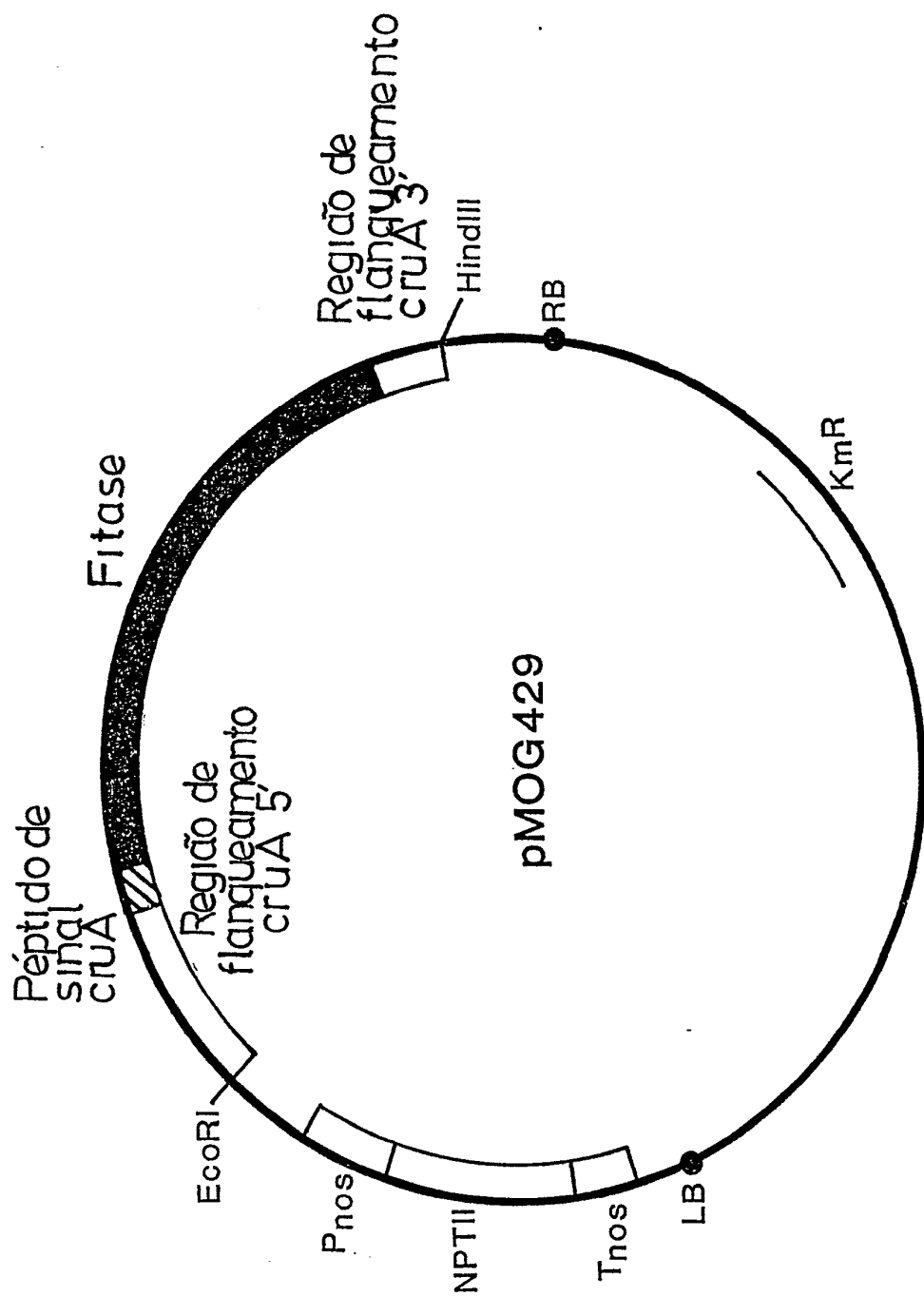


FIG. 5

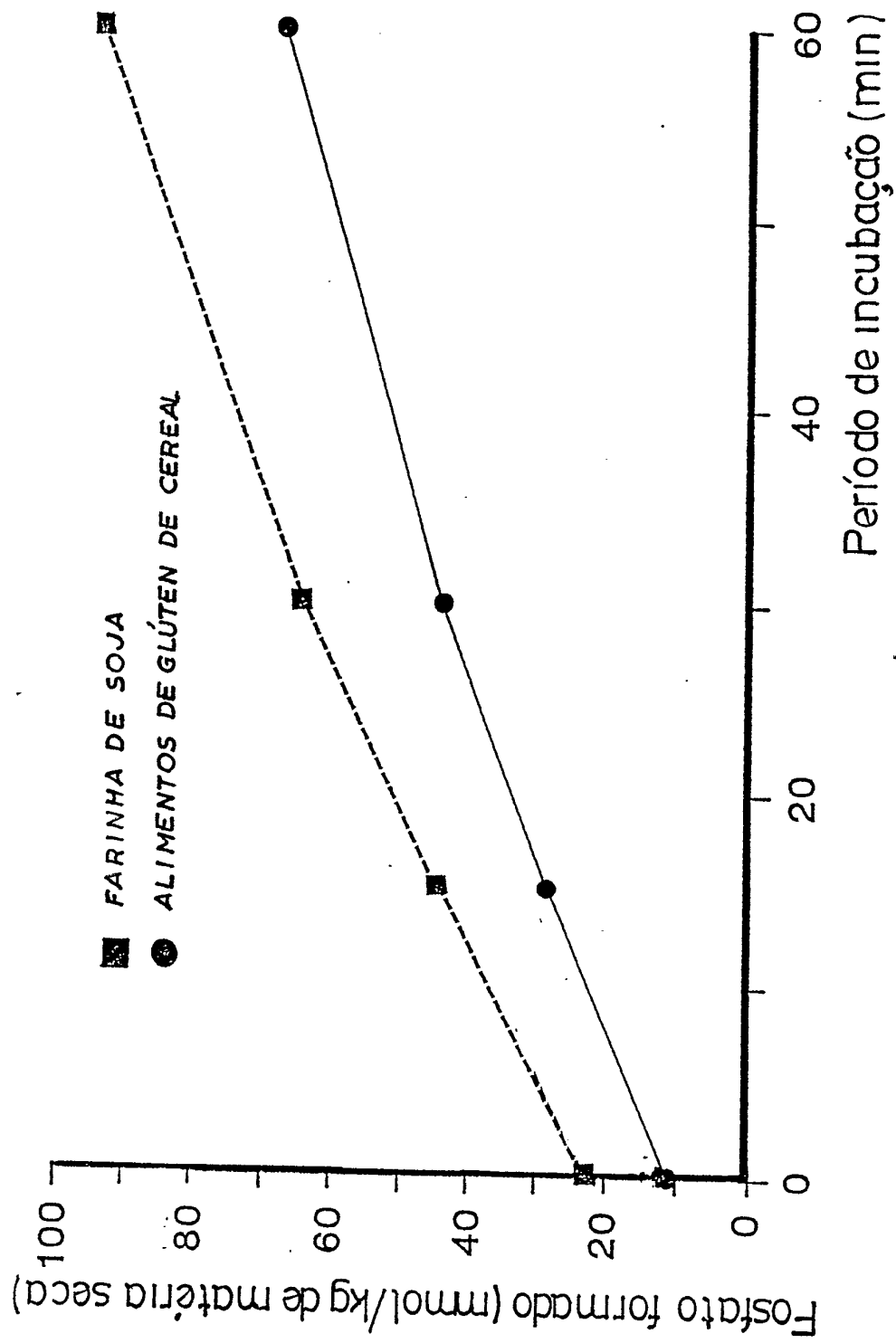


FIG. 6

FIG.7 (FOLHA 1 de 2)

<u>XbaI</u>	*	<u>HqaI</u>
<u>TCTAGAGTC</u>	ATGAAACAAC	AAAAACGGCT
	<u>PstI</u>	TTACGCCCGA
		TTGCTGACGC
		<u>HqaI</u>
		TGTTATTGTC
GCTCATCTTC	TTGCTGCCTC	ATTCTGCAGC
		AGCGCGGCA
		AATCTTAATG
		<u>GGACGCTGAT</u>
GCAGTATTTT	GAATGGTACA	TGCCCAATGA
		CGGCCAACAT
		TGGAAGCGTT
		TGCAAAACGA
CTCGGCATAT	TTGGCTGAAC	ACGGTATTAC
		TGCCGTCTGG
		ATTCCCCCGG
		CATATAAGGG
AACGAGCCAA	CGGGATGTGG	GCTACGGTGC
		TTACGACCTT
		TATGATTTAG
		GGGAGTTTCA
TCAAAAAGGG	ACGGTTTCGA	CAAAGTACGG
		CACAAAAGGA
		GAGCTGCAAT
		CTGCGATCAA
AAGTCTTCAT	TCCCGCGACA	TTAACGTTTA
		CGGGGATGTG
		GTCATCAACC
		ACAAAAGCGG
CGCTGATGG	ACCGAAGATG	TAACCGCGGT
		TGAAGTCGAT
		CCCGCTGACC
		GCAACCGCGT
AATTCAGGA	GAACACCTAA	TTAAAGCCTG
		GACACATTTT
		CATTTTCCGG
		GGCGCGGCAG
CACATACAGC	GATTTTAAAT	GGCATGGTA
		CCATTTTGAC
		GGAACCGATT
		GGGACGAGTC
CCGAAAAGCTG	AACCGCATCT	ATAAGTTTCA
		AGGAAAAGGCT
		TGGGATTGGG
		AAGTTTCCAA
TGAAAACGGC	AACTATGATT	ATTGATGTA
		TGCCGACATC
		GATTATGACC
		ATCCTGATGT
CGCAGCAGAA	ATTAAGAGAT	GGGGCACTTG
		GTATGCCAAT
		GAACTGCAAT
		TGGACGGTTT
CCGTCTTGAT	GCTGTCAAAC	ACATTAATAAT
		TTCTTTTTTG
		CGGGATTGGG
		TTAATCATGT
CAGGGA AAAA	ACGGGGAAGG	AAATGTTTAC
		GGTAGCTGAA
		TATTGGCAGA
		ATGACTTGGG

FIG. 7 (FOLHA 2 de 2)

CGCGCTGGAA AACTATTGGA AAAAAACAAA TTTTAATCAT TCAGTGTTTG ACGTGCCGCT
TCATTATCAG TTCCATGCTG CATCGACACA GGGAGGCGGC TATGATATGA GGAATTTGCT
GAACGGTACG GTCGTTTCCA AGCATCCGTT GAAATCGGTT ACATTGTGCG ATAACCATGA
SalI

TACACAGCCG GGGCAATCGC TTGAGTCGAC TGTCCAAACA TGGTTAAGC CGCTTGCTTA
CGCTTTTATT CTCACAAAGG AATCTGGATA CCTCAGGTT TTCTACGGGG ATATGTACGG
GACGAAAGGA GACTCCCAGC GCGAAATTCC TGCCTTGAAA CACAAAATTG AACGATCTT
AAAAGCGAGA AACAGTATG CGTACGGAGC ACAGCATGAT TATTTCGACC ACCATGACAT
TGTCGGCTGG ACAAGGGAAG GCGACAGCTC GGTGCAAT TCAGGTTTGG CGGCATTAAT
AACAGACGGA CCGGTGGGG CAAAGCGAAT GTATGTCGGC CGGCAAAACG CCGGTGAGAC
ATGGCATGAC ATTACCGGAA ACCGTTCCGA GCGGTTGTC ATCAATTCCG AAGGCTGGGG
AGAGTTTCAC GTAAACGGCG GGTGCGTTTC AATTATGTT CAAAGATAGA AGAGCAGAGA

BamHI

GGACGGATTT CCTGAAGGAA ATCCGTTTTT TTATTTTGCC CGTCTTATAA ATTTCTTTGA
TTACATTTTA TAATTAAATT TAACAAAGTG TCATCAGCCC TCAGGAAGGA CTTGCTGACA
GTTTGAATCG CATAGGTAAG GCGGGGATGA AATGGCAACG TTATCTGATG TAGCAAAGAA
BclI
AGCAAATGTG TCGAAAATGA CGGTATCGCG GGTGATCA

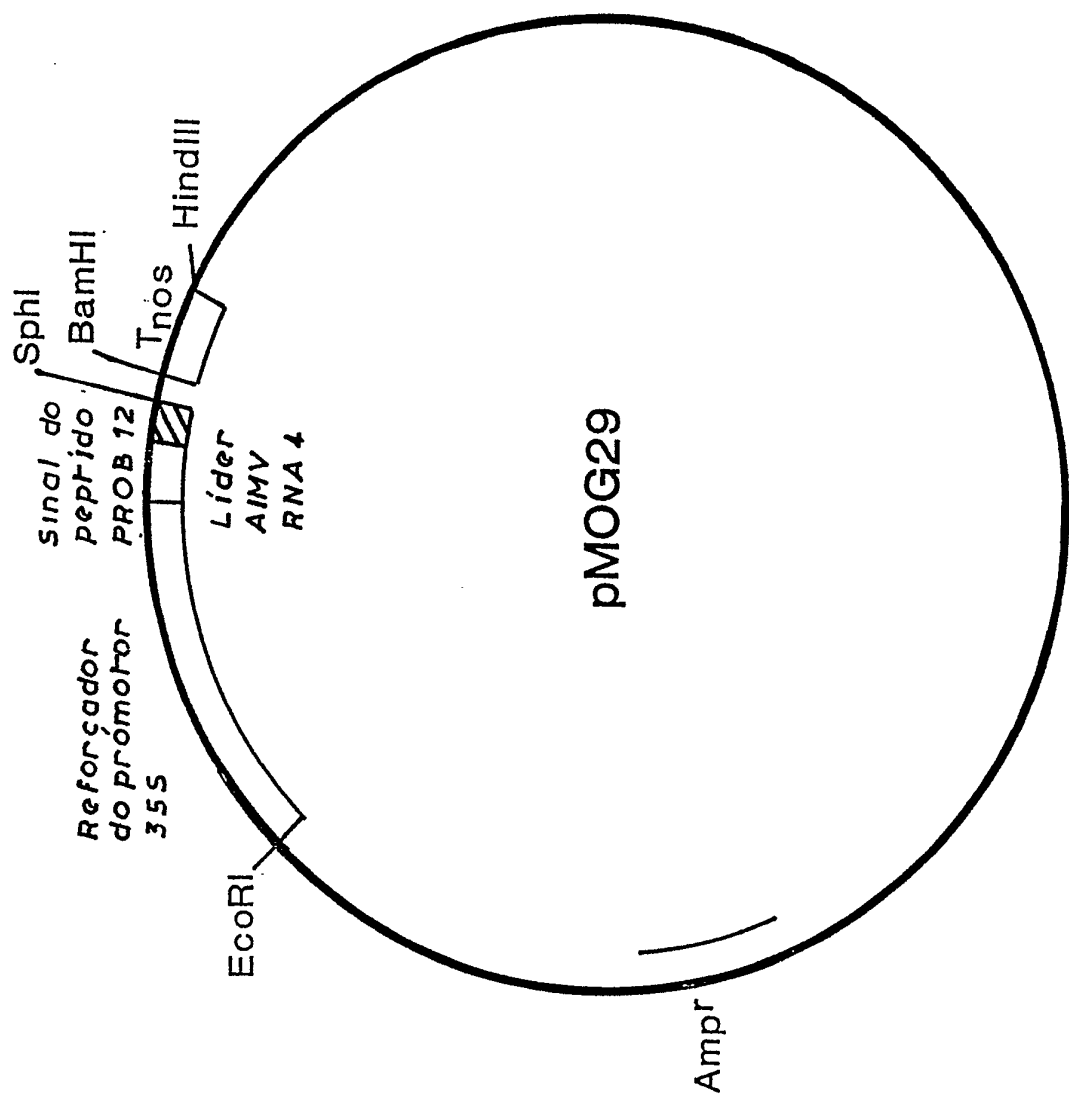


FIG. 8

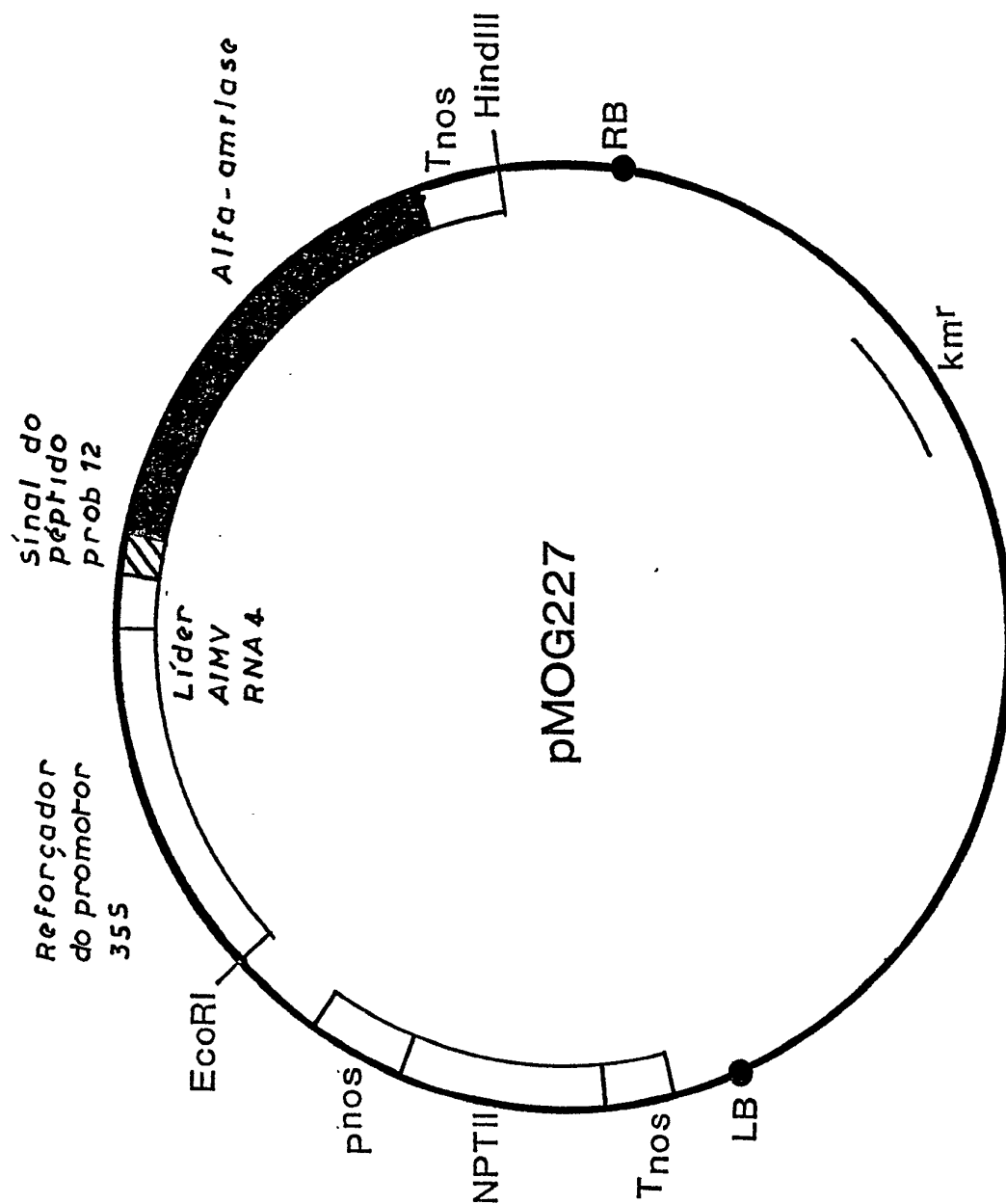


FIG. 9

MODELO DE DIGERIBILIDADE "IN VITRO" RELAÇÃO DOSE RESPOSTA DE FITASE DE ASPERGILLUS

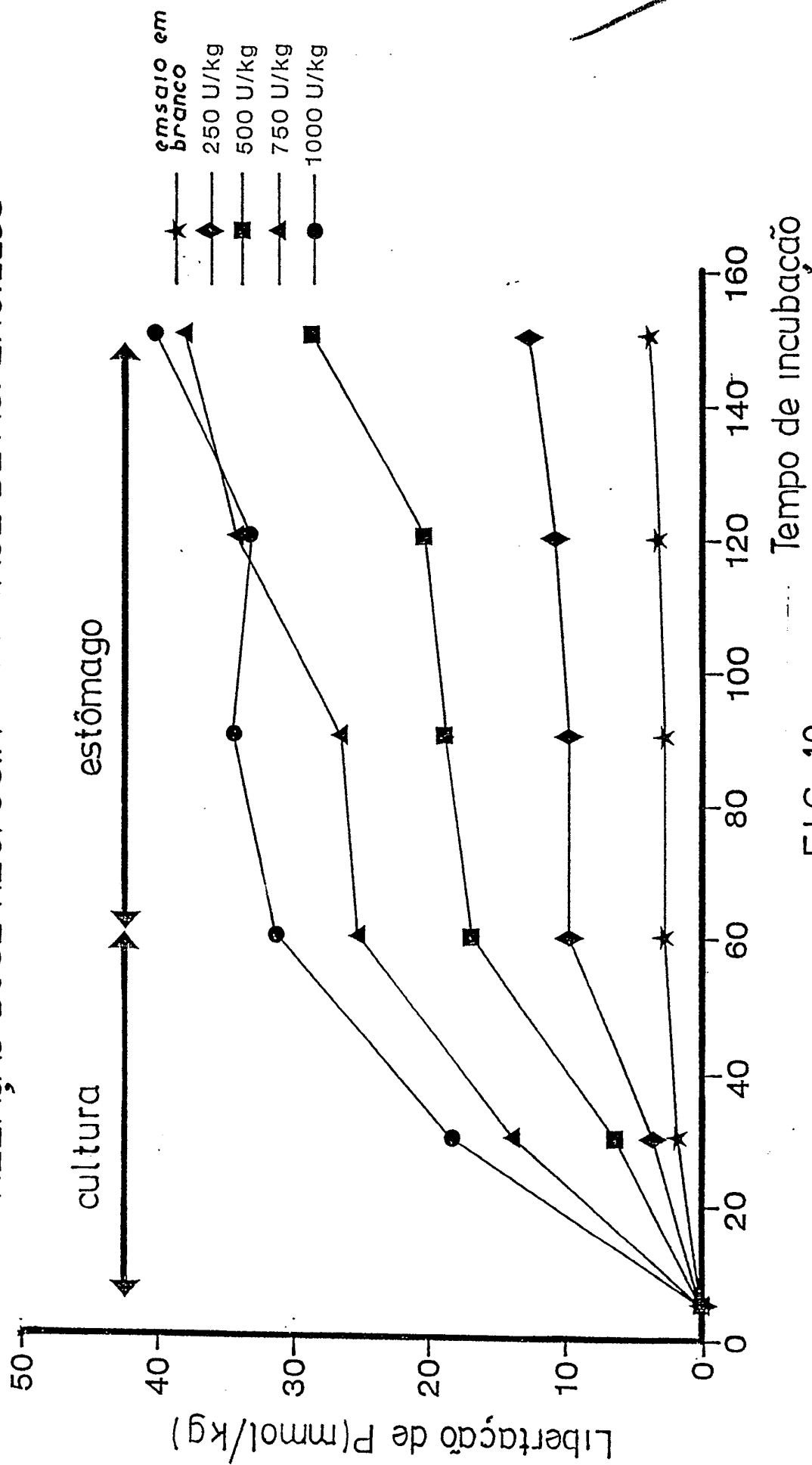


FIG.10

MODELO DE DIGERIBILIDADE "IN VITRO"
FITASE DE ASPERGILLUS E DE SEMENTE DE TABACO

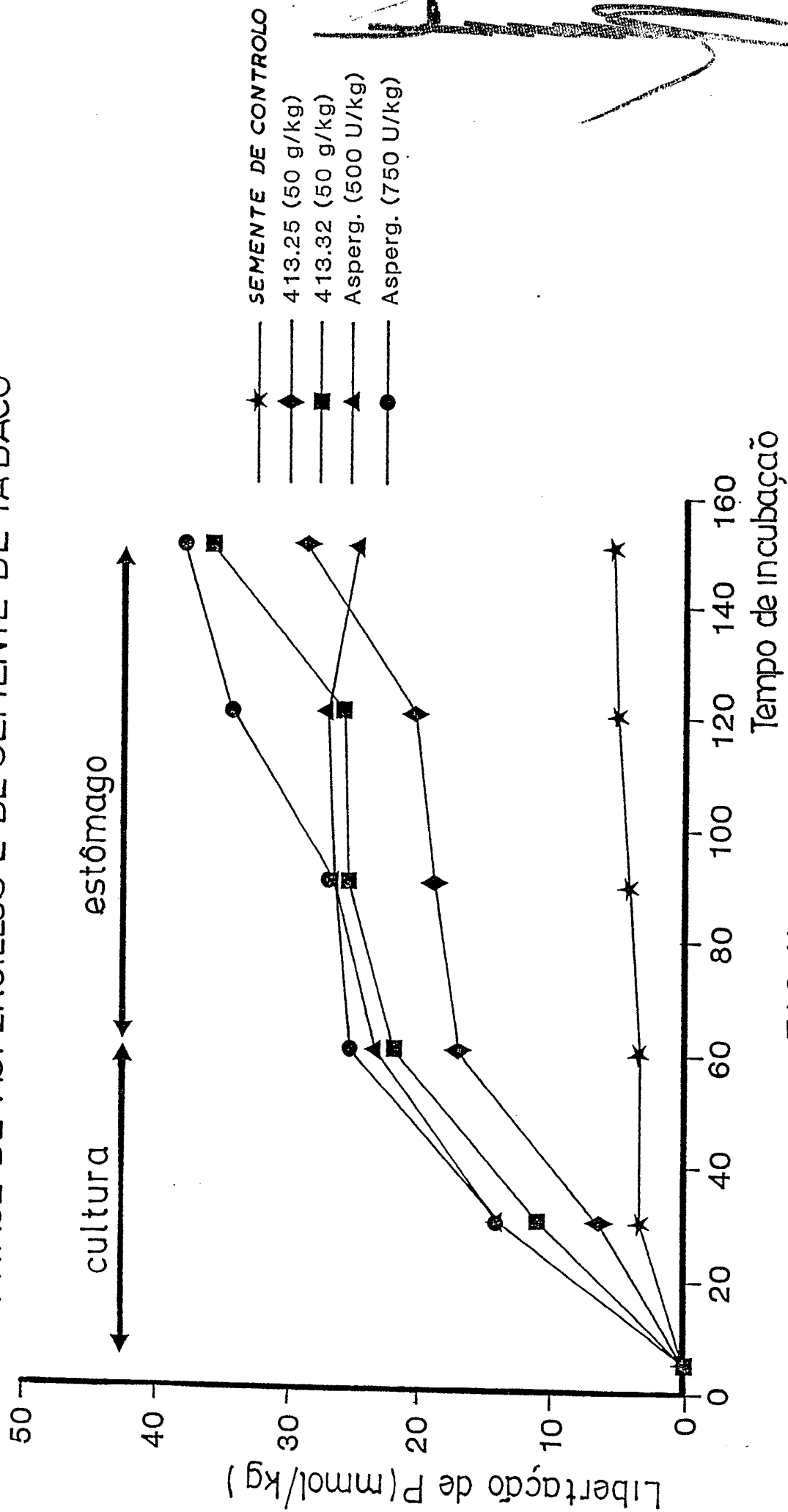


FIG.11

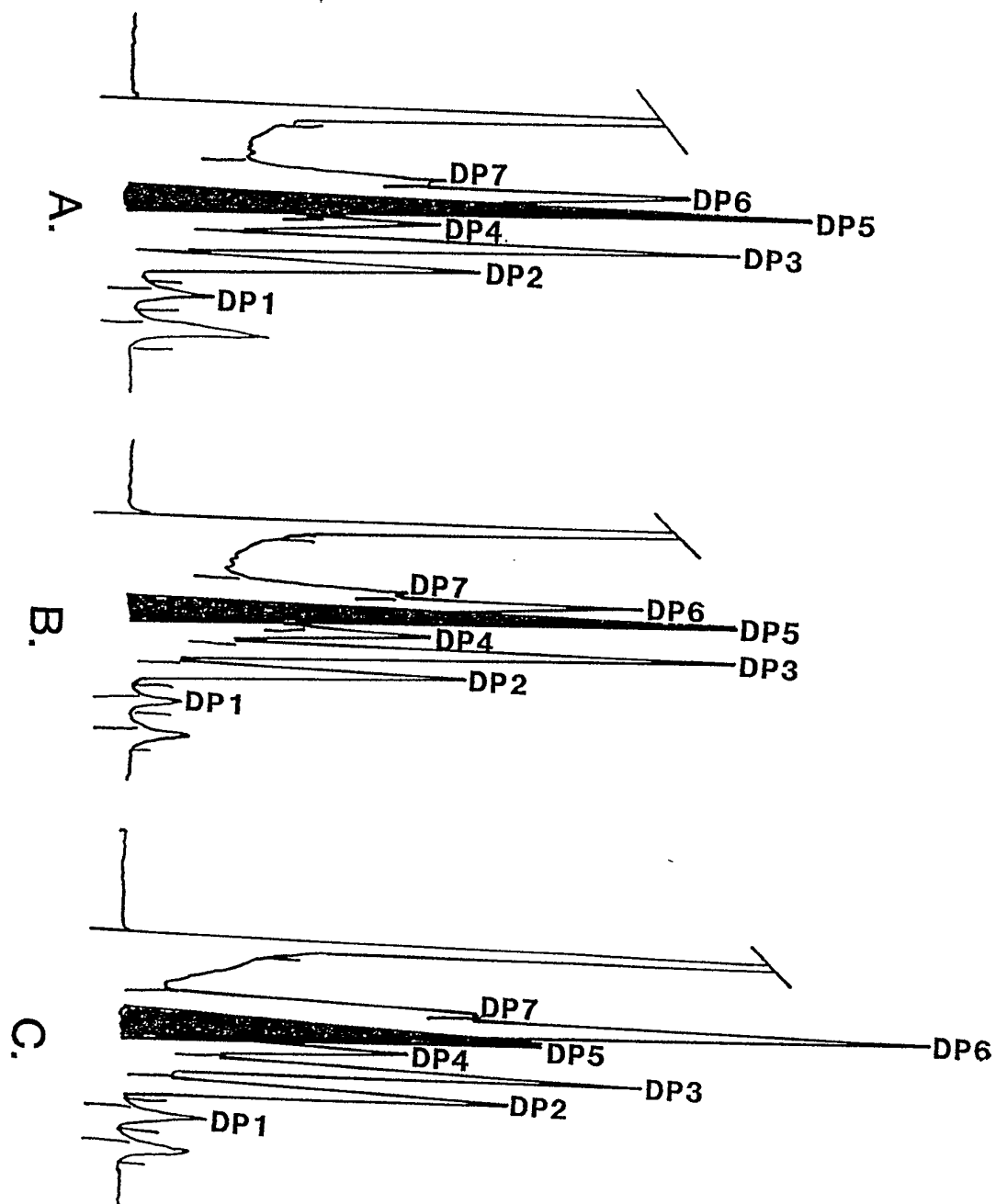


FIG.12

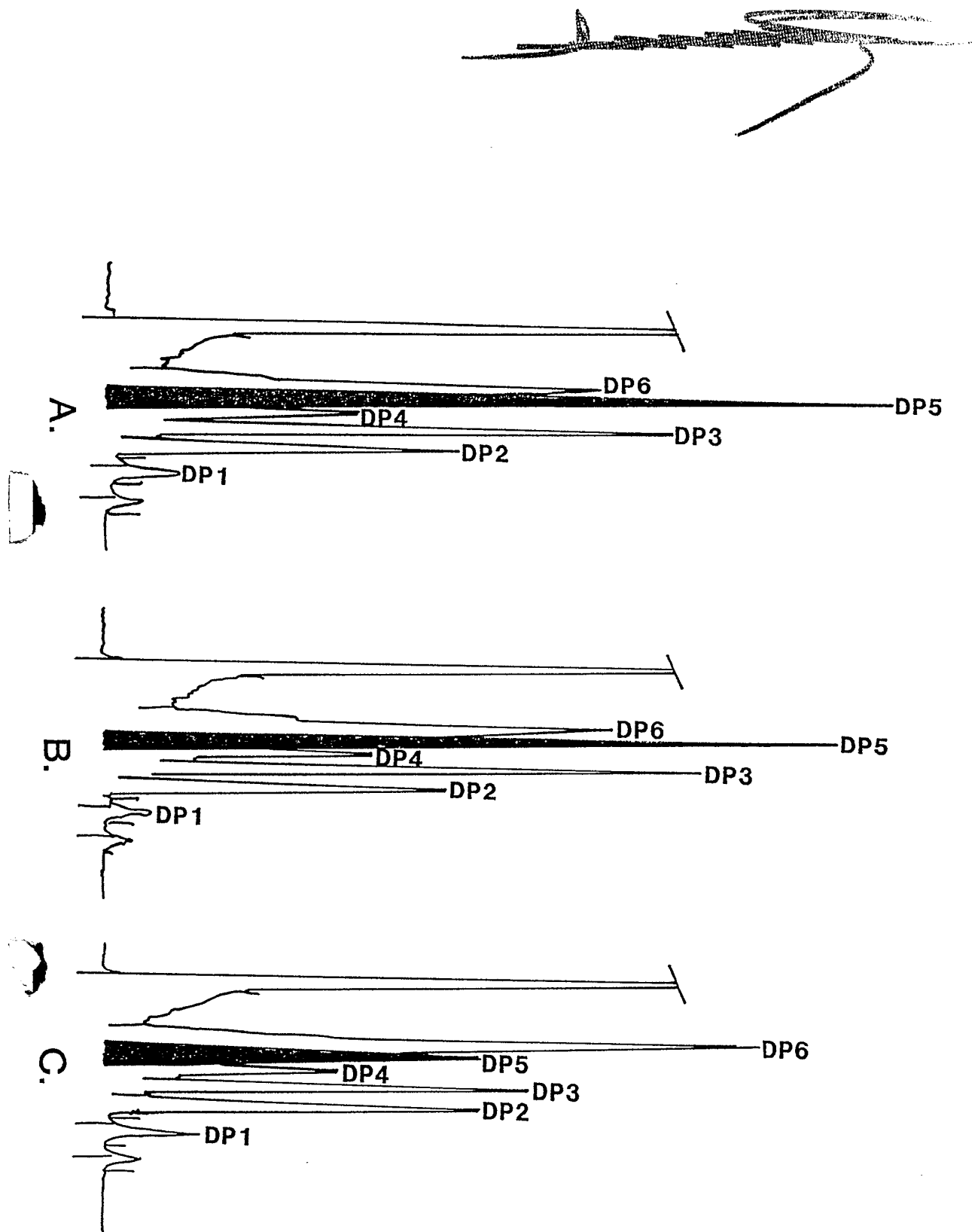


FIG 13