

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(51) Classificação Internacional:

**C12N 15/82** (2011.01) **C12N 15/54** (2011.01)

**C12N 5/04** (2011.01) **C12N 5/10** (2011.01)

**C07H 3/06** (2011.01) **C07H 3/04** (2011.01)

**A01H 5/00** (2011.01)

(22) Data de pedido: **1995.07.07**

(30) Prioridade(s): **1994.07.08 NL 9401140**  
**1995.04.05 NL 1000064**

(43) Data de publicação do pedido: **1997.05.21**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.10.05**  
**233/2011**

(73) Titular(es):

**STICHTING SCHEIKUNDIG ONDERZOEK IN**  
**NEDERLAND (SON)**

**131 LAAN VAN NIEUW OOST INDIE 2595 BM**  
**DEN HAAG**

**NL**

(72) Inventor(es):

**JOSEPHUS CHRISTIANUS MARIA SMEEKENS**

**NL**

**PETRUS JACOBUS WEISBEEK**

**NL**

**MICHA NOT L JOHANNES MARCUS EBSKAMP**

**NL**

**HENDRIKUS ADRIANUS MARIA GEERTS**

**NL**

(74) Mandatário:

**ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO**  
**RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA**

**PT**

(54) Epígrafe: **PRODUÇÃO DE OLIGOSSACÁRIDOS EM PLANTAS TRANSGÉNICAS**

(57) Resumo:

O INVENTO REFERE-SE A UM MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE OLIGOSSACÁRIDOS, COMPREENDENDO A SELECÇÃO DE UM GENE QUE CODIFICA PARA UMA ENZIMA QUE É CAPAZ DE CONVERTER SACAROSE NUM OLIGOSSACÁRIDO; LIGAÇÃO DO GENE A SINAIS DE INÍCIO DA TRANSCRIÇÃO E DE TERMINAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO PARA PROPORCIONAR UMA CONSTRUÇÃO DE EXPRESSÃO; TRANSFORMAÇÃO DE UMA CÉLULA VEGETAL ADEQUADA COM A CONSTRUÇÃO DE EXPRESSÃO; REGENERAÇÃO DE UMA PLANTA TRANSGÉNICA A PARTIR DA CÉLULA VEGETAL TRANSFORMADA; CULTURA DA PLANTA TRANSGÉNICA SOB CONDIÇÕES PERMITINDO A EXPRESSÃO E ACTIVIDADE DA ENZIMA; E ISOLAMENTO DOS OLIGOSSACÁRIDOS A PARTIR DA PLANTA TRANSGÉNICA. O INVENTO REFERE-SE AINDA AO PRODUTO OBTIDO POR MEIO DO MÉTODO E À UTILIZAÇÃO DESTE, PARA ALÉM DE PLANTAS TRANSGÉNICAS E DE PARTES DESTAS QUE SEJAM CAPAZES DE PRODUZIR OLIGOSSACÁRIDOS.

RESUMO

**"Produção de oligossacáridos em plantas transgénicas"**

O invento refere-se a um método para a produção de oligossacáridos, compreendendo a selecção de um gene que codifica para uma enzima que é capaz de converter sacarose num oligossacárido; ligação do gene a sinais de início da transcrição e de terminação da transcrição para proporcionar uma construção de expressão; transformação de uma célula vegetal adequada com a construção de expressão; regeneração de uma planta transgénica a partir da célula vegetal transformada; cultura da planta transgénica sob condições permitindo a expressão e actividade da enzima; e isolamento dos oligossacáridos a partir da planta transgénica. O invento refere-se ainda ao produto obtido por meio do método e à utilização deste, para além de plantas transgénicas e de partes destas que sejam capazes de produzir oligossacáridos.

## DESCRIÇÃO

### **"Produção de oligossacáridos em plantas transgênicas"**

O presente invento refere-se a um método para produção de oligossacáridos, aos oligossacáridos produzidos deste modo, a plantas transgênicas e a células vegetais capazes de produzir oligossacáridos e às aplicações dos oligossacáridos obtidos deste modo.

Na indústria alimentar pode observar-se uma tendência crescente para o "*light*" e para as baixas calorias. A utilização aí de demasiada gordura e/ou açúcar nos produtos é evitada. Contudo, para ser capaz de proporcionar produtos alimentares com um sabor doce um número crescente de substitutos do açúcar está a tornar-se comercialmente disponível. O Aspartamo é um exemplo conhecido destes. No entanto, o Aspartamo tem fracas propriedades organolépticas.

Outro tipo de substituto do açúcar é formado por oligossacáridos. Os oligossacáridos são moléculas que consistem em dois ou mais monossacáridos tais como frutose e/ou glicose. Os monossacáridos nos referidos oligossacáridos são ligados uns aos outros através de ligações  $\beta$ -(2-1)- ou  $\beta$ -(2-6). O número de monossacáridos num oligossacárido é indicado por meio do valor de GP ("Grau de Polimerização"). Um valor de GP de 3 significa que o oligossacárido é constituído por três monossacáridos. As oligofrutoses são oligossacáridos consistindo inteiramente em unidades de frutose. Quando um oligossacárido compreende também uma ou mais unidades de glicose estas serão ligadas por meio de uma ligação  $\alpha$ (1-2) a uma unidade de frutose. A composição dos oligossacáridos é também designada com a fórmula  $G_mF_n$ , em que G representa glicose e F frutose e em que m é igual a 0 ou 1 e n é um número inteiro maior ou igual a 0. Oligossacáridos particularmente adequados são aqueles em que m é igual a 1 e n é 2 a 8, de preferência 2 ou 3.

Os oligossacáridos são dificilmente hidrolisados, quando o são, no estômago humano e no intestino delgado. Sabe-se da oligofrutose que as enzimas digestivas dos seres humanos não têm efeito na ligação  $\beta$ (2-1) nem na  $\beta$ (2-6) na molécula.

Passam portanto através do estômago e do intestino delgado sem serem degradados nem absorvidos para o corpo. Os oligossacáridos não deixam no entanto o corpo pois são metabolizados pela flora microbiana do intestino grosso. Aí libertados juntamente com gás estão ácidos gordos voláteis que servem por sua vez novamente como fonte de energia para a flora intestinal. Este fenómeno explica porque é que os oligossacáridos têm um menor valor energético para os humanos que açúcares livres tais como a glicose, frutose e sacarose, que são absorvidos no corpo. Os oligossacáridos têm no entanto um poder adoçante suficiente para servir como substitutos do açúcar.

Sabe-se ainda que os oligossacáridos, particularmente a oligofrutose, têm um efeito bifidogénico, isto é, que estimulam o crescimento das Bifidobactérias no sistema digestivo. As bifidobactérias protegem contra o desenvolvimento de bactérias patogénicas e têm deste modo uma influência positiva na saúde. Além disso, os oligossacáridos são fibras nutricionais.

Os diferentes oligossacáridos, que são preparados de diversos modos, estão já no presente momento comercialmente disponíveis.

Os oligossacáridos podem ser produzidos através de hidrólise enzimática parcial das cadeias maiores de inulina vegetal. Um método para tal é descrito por exemplo no pedido de Patente Europeia 440.074.

Os oligossacáridos podem igualmente ser sintetizados enzimaticamente. Para esta via de produção enzimática utilizam-se enzimas, frutotransferases, que convertem a sacarose numa mistura de oligossacáridos e que são isoladas a partir de diferentes microrganismos (JP-80/40193).

No entanto, as vias de produção conhecidas têm várias desvantagens. Primeiramente, ambos os métodos de produção conhecidos são relativamente dispendiosos. Além dos oligossacáridos desejados com um comprimento de cadeia de 2 a cerca de 7 na mistura produzida pode também ocorrer um número comparativamente grande de açúcares livres e oligossacáridos

com um comprimento de cadeia maior. A desvantagem para muitos açúcares livres é que estes resultam num aumento no valor energético da mistura. Os açúcares livres têm por exemplo um teor energético de 17 quilojoule por grama enquanto o GF<sub>2</sub> e GF<sub>3</sub> puros têm um teor energético de 4 a 6 quilojoule por grama. Além disso, os açúcares livres causam apodrecimento dentário (cáries).

Por outro lado, os oligossacáridos com um comprimento de cadeia demasiado elevado têm uma capacidade adoçante demasiado pequena, o que faz com que a capacidade adoçante média da mistura caia.

Em contraste com alguns outros adoçantes tais como por exemplo o Aspartamo, os oligossacáridos têm boas propriedades organolépticas.

WO 94/14970 divulga um método para a obtenção de plantas transgénicas mostrando um padrão de frutanos modificado através de transformação com genes bacterianos de frutossiltransferases.

WO 91/13076 divulga um método *in vitro* para a produção enzimática das misturas de oligossacáridos.

É o objectivo do presente invento proporcionar uma via de produção alternativa para os oligossacáridos com os quais são evitadas as desvantagens acima afirmada.

Para este fim o invento proporciona um método para a produção de uma mistura de oligossacáridos possuindo um comprimento de cadeia de moléculas individuais que reside substancialmente entre 2 e 8, compreendendo os passo de:

a) selecção de um gene de origem vegetal que codifica para uma enzima capaz de converter sacarose num oligossacárido;

b) ligação do gene a sinais de início da transcrição e de terminação da transcrição para proporcionar uma construção de expressão;

c) transformação de uma célula vegetal adequada com a construção de expressão;

d) regeneração de uma planta transgénica a partir da célula vegetal transformada;

e) cultura da planta transgénica sob condições que permitam a expressão e actividade da enzima; e

f) isolamento dos oligossacáridos a partir da planta transgénica,

em que o gene nos passos a e b codifica para sacarose-frutano-6-frutosiltransferase (6-SFT) possuindo a sequência de aminoácidos da Figura 4.

O invento proporciona portanto um método com o qual por meio de plantas transgénicas ou de células vegetais pode ser produzida uma mistura de oligossacáridos que possua propriedades mais desejáveis em comparação com os oligossacáridos preparados através de processos industriais conhecidos.

A vantagem particular do método de acordo com o invento é que a distribuição do comprimento da cadeia é mais estreita, pelo que não ocorrem ou ocorrem menos açúcares livres no produto final. A consequência disto é uma menor cariogenicidade e o desejado menor valor energético. Ocorrem também menos oligossacáridos com um comprimento de cadeia de mais de 5. A vantagem disto é que os oligossacáridos produzidos de acordo com o invento possuem uma capacidade adoçante específica mais elevada. É o caso que a capacidade adoçante depende do "comprimento médio da cadeia". Quanto mais elevado for o comprimento médio da cadeia de uma mistura, menor é a capacidade adoçante. A vantagem de uma capacidade adoçante específica mais elevada é que quase nunca é necessário adicionar adoçantes extra no processamento do produto.

Uma consideração semelhante aplica-se em relação à solubilidade. É também o caso aqui que quando o comprimento médio de cadeia aumenta a solubilidade diminui. As misturas de acordo com o invento têm portanto uma solubilidade mais elevada que as misturas obtidas por meio de síntese enzimática ou hidrólise enzimática. Além disso, os custos de produção são consideravelmente reduzidos.

Existem indicações de que as cadeias curtas podem ser melhor absorvidas no corpo bacteriano de *Bifidus* que as mais compridas. As misturas de oligossacáridos produzidas por meio do método de acordo com o invento terão portanto um efeito bifidogénico mais elevado.

O gene é o da sacarose-frutano-6-frutosiltransferase (6-SFT) de cevada (*Hordeum vulgare* L.). São proporcionadas plantas transgénicas que expressam a 6-SFT para a produção de oligossacáridos.

Para expressão em plantas do gene da frutosiltransferase seleccionado, sinais de início da transcrição tais como promotores, estimuladores e semelhantes podem ser adicionados ao gene para obter a construção de expressão desejada. Tais promotores de expressão podem ser específicos para um tipo celular especial ou podem ser activos numa ampla diversidade de tipos celulares. Além disso, o tempo e o local da expressão podem ser determinados através da utilização por exemplo de promotores específicos do desenvolvimento. Um promotor geralmente utilizado para expressão génica em plantas é o Promotor do Vírus do Mosaico da Couve-flor 35S (promotor CaMV) que é activo em muitos tipos celulares na planta dependendo do estágio de desenvolvimento da planta. Quando o gene da frutosiltransferase tem origem numa planta é possível utilizar as suas próprias sequências reguladoras.

O promotor preferido pode ser um promotor específico do tecido ou constitutivo, forte ou fraco, dependendo da planta alvo e do fim. Exemplos de promotores adequados são o promotor da patatina específico de "sumidouro" e o promotor da amido-sintetase ligada aos grânulos da batata, ou o promotor de esporamina da batata doce.

Para aumentar mais os níveis de transcrição o promotor pode ser modificado e conter uma duplicação do estimulador.

A tradução dos ARNm pode ser melhorada através da adição de um estimulador da tradução, tal como o sinal estimulador da tradução RNA4 do Vírus do Mosaico da Alfafa, que tem de estar presente na região 5' transcrita, não traduzida.

Para a terminação correcta da transcrição pode ser adicionada às construções uma sequência terminadora. Um exemplo de uma tal sequência é a sequência de terminação do gene da nopalina-sintetase.

A escolha de sinais de expressão adequados para uma situação específica reside como é claro dentro do alcance do perito médio sem que tenha de ser realizado mais trabalho inventivo para esse fim.

A sacarose, o substrato para as frutossiltransferases, é um hidrato de carbono presente em muitas localizações diferentes. É sintetizada no citoplasma e podem também ser verificadas quantidades significativas no citosol, vacúolo e espaço extracelular (o apoplasto) ou outras localizações possíveis.

Uma vez que os processos bioquímicos nas células vegetais estão de igual modo frequentemente limitados a um único ou a vários compartimentos celulares, é desejável fazer com que a acumulação dos produtos dos genes recentemente introduzidos ocorra num compartimento específico. Para este fim sequências direccionadoras que são específicas dos compartimentos celulares podem estar presentes na construção de expressão próximo da parte de codificação dos genes de frutossiltransferases que são expressos nas plantas transgénicas. As regiões de aminoácidos específicas para o direccionamento para diferentes localizações celulares foram já identificadas e analisadas. Estas sequências de ADN podem ser ligadas aos genes de frutossiltransferases de modo a que a actividade enzimática seja dirigida para um compartimento desejado da célula ou da planta.

Numa concretização preferida do invento a construção de expressão compreende também portanto uma sequência direccionadora para dirigir a actividade de frutossiltransferase para um ou mais compartimentos específicos da célula vegetal. Exemplos de sequências direccionadoras são a sequência sinal e a sequência direccionadora vacuolar do gene da carboxipeptidase Y (*cpy*), a da patatina da batata ou a da esporamina da batata doce, ou a sequência sinal e a sequência direccionadora apoplástica do

gene da proteína S relacionada com patogénese (*pr-s*). Estes são, no entanto, exemplos e o próprio perito será capaz de seleccionar outras sequências direccionadoras.

A construção de expressão pode em princípio ser modificada de modo a que o direccionamento ocorra para qualquer compartimento celular aleatório, tal como o vacúolo, plastos, parede celular, citoplasma, s etc.

É frequentemente vantajoso que a planta controle não só a localização mas também o tempo de expressão dos genes introduzidos. É por exemplo normalmente desejado limitar a expressão das actividades enzimáticas recentemente introduzidas a partes específicas da planta, por exemplo órgãos de colheita tais como tubérculos, frutos ou sementes. É mais frequentemente desejado iniciar a expressão nestes órgãos num estágio de desenvolvimento particular. É certamente o caso quando a expressão dos genes introduzidos interfere com o desenvolvimento normal de tais órgãos.

Os oligossacáridos podem ser utilizados como substitutos do açúcar, do xarope de glicose e da isoglicose em versões "*light*" de diferentes produtos alimentares. Exemplos de produtos alimentares são confeitaria, biscoitos, bolos, produtos lácteos, comida de bebé, gelados e outras sobremesas, chocolate e semelhantes. A estimulação das Bifidobactérias é também importante para a saúde dos animais. Os oligossacáridos podem portanto ser também aplicados por exemplo em rações animais.

O presente invento será ainda elucidado com base nos exemplos aqui abaixo. É feita referência nos exemplos às figuras anexas que mostram o seguinte:

A Figura 1 mostra a separação de 2 isoformas da sacarose-frutano-6-frutosiltransferase (6-SFT) da cevada após o segundo passo de cromatografia de permuta aniónica numa coluna Resource Q num procedimento de purificação. A Figura 1A mostra o perfil de eluição da proteína (A280) e a actividade de frutosiltransferase das fracções obtidas após cromatografia após incubação com sacarose 0,2 M em tampão metilpiperazina (HCl) 25 mM (pH 5,75). Os cromatogramas (Fig.

1B) foram obtidos através de detecção amperométrica pulsada após separação por HPLC de permuta aniónica numa coluna CarboPack-PA100. Os produtos de reacção foram obtidos após incubação do banco I e do banco III apenas com sacarose, ou sacarose e iso-kestose. Os hidratos de carbono foram identificados através dos seus tempos de retenção e trealose foi utilizada como padrão interno.

Os círculos vazios na Fig. 1A representam a actividade de frutossiltransferase, que é indicada como a soma da kestose formada, bifurcose, isokestina e kestina. Na Fig. 1B p corresponde a um produto não identificado resultante de contaminantes de iso-kestose, e c a uma contaminação do substrato da iso-kestose.

A Figura 2A mostra um gráfico da actividade enzimática de um banco de fracções de 6-SFT (referido como banco II; ver Figura 1) após focagem isoelectrica sob condições não desnaturantes. Os triângulos a cheio indicam actividade de beta-frutosidase medida como frutose libertada, enquanto os círculos vazios indicam a actividade de frutossiltransferase medida como kestose formada. A Figura 2B é um gel de SDS-PAGE após análise bidimensional do banco II após a segunda cromatografia de permuta aniónica. As duas isoformas de 6-SFT são aqui mostradas. Verifica-se que ambas as isoformas consistem em duas subunidades de respectivamente 23 kDa e 49 kDa. A Figura 2C é a electroforese em gel bidimensional dos marcadores de IEF ficocianina (pI 4,6), beta-lactoglobulina (pI 5,1) e anidrase carbónica bovina (pI 6,0).

A Figura 3 é uma vista esquemática da estratégia utilizada para obter o clone de ADNc que codifica para 6-SFT de cevada.

A Figura 4 mostra a sequência de ADNc e a sequência de aminoácidos derivada desta de 6-SFT de cevada.

A Figura 5 é uma perspectiva geral da sequência de aminoácidos derivada de 6-SFT de cevada, diferentes invertases (beta-frutosidasas), levanases e levansacarases. A perspectiva geral foi produzida com o programa Pileup do

pacote de suporte lógico de análise de sequências de GCG. São utilizadas as seguintes abreviaturas:

- H.v. 6-SFT = sacarose-frutano-6-frutosiltransferase de cevada.
- V.r. Inv = invertase ácida solúvel da soja verde (feijão-mungo; Arai et al., *Plant Cell Physiol.* 33: 245-252 (1992));
- D.c. Inv = invertase ácida solúvel de cenoura (Unger et al., *Plant Physiol.* 104: 1351-1357 (1994));
- L.e. Inv = invertase ácida solúvel de tomate (Elliott et al., *Plant Mol. Biol.* 21: 515-524 (1993));
- D.c. cw Inv = invertase da parede celular de cenoura (Sturm e Cri-speels, *Plant Cell* 2: 1107-1119 (1990));
- A.s. Inv = sequência de invertase parcial de aveia (Wu et al., *J. Plant Physiol.* 142: 179-183 (1993));
- E.c. Inv = invertase (rafD) de *Escherichia coli* (Aslandis et al., *J. Bacteriol.* 171: 6753-6763 (1989));
- S.m. Scrb = invertase de *Streptococcus mutans* (Sato e Kuramitsu, *Infect. Immun.* 56: 1956-1960 (1989));
- B.p. LelA = levanase de *Bacillus polymyxa* (Bezzate et al., referência não publicada na base de dados de EMBO);
- B.s. SacC = levanase de *Bacillus subtilis* (Martin et al., *Mol. Gen. Genet.* 208: 177-184 (1987));
- K.m. Inu = inulinase de *Kluiveromyces marxianus* (Laloux et al., *FEBS Lett.* 289: 64-68 (1991));
- S.c Inv1 = invertase 1 da levedura de padeiro (Hohmann e Gozalbo, *Mol. Gen. Genet.* 211: 446-454 (1988));
- S.o. inv = invertase de *Schwanniomyces occidentalis* (Klein et al., *Curr. Genet.* 16: 145-152 (1989));
- A.n.Inv = invertase de *Aspergillus niger* (Boddy et al., *Curr. Genet.* 24: 60-66 (1993));
- B.a. SacB = levansacarase de *Bacillus amyloguefaciens* (Tang et al., *Gene* 96: 89-93 (1990));
- B.s. SacB = levansacarase de *Bacillus subtilis* (Steinmetz

- et al., *Mol. Gen. Genet.* 200: 220-228 (1985));
- S.m. SacB = levansacarase de *Streptococcus mutans* (Shiroza e Kuramitsu, *J. Bacteriol.* 170: 810-816 (1988));
- Z.m. LevU = levansacarase de *Zymomonas mobilis* (Song et al., referência não publicada na base de dados de EMBO).

A Figura 6 é um dendrograma de 6-SFT de cevada com diferentes invertases (beta-frutósidas), levansases e levansacarases, com base nas sequências de aminoácidos derivadas. O dendrograma foi gerado com as sequências descritas na Figura 5 fazendo uso do programa Pileup do pacote de suporte lógico de análise de sequências de GCG.

A Figura 7 mostra a expressão funcional de 6-SFT de cevada em protoplastos de *Nicotiana plumbaginifolia*. As barras de erro indicam o desvio padrão médio. O ADNc de 6-SFT foi expresso durante 27 horas em protoplastos. As amostras foram tomadas várias vezes e a actividade de frutossiltransferase foi determinada em extractos de protoplastos através da incubação com sacarose (Fig. 7A) ou sacarose e iso-kestose (Fig. 7B). Os círculos vazios mostram a actividade enzimática de extractos de protoplastos que foram transformados com a construção do gene de 6-SFT. Os quadrados vazios mostram a actividade de extractos de protoplastos transformados com o vector sem o ADNc de 6-SFT.

A Figura 8A mostra os espectros dos extractos obtidos a partir de plantas de tabaco transgénicas, que foram obtidas com um sistema Dionex DX-300 com coluna PA-100 e Detecção Amperométrica Pulsada e eluição com um gradiente de NaOH/NaAc até NaOH a 100%. O número da linha transgénica é indicado por espectro, designadamente 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11. C1 é a linha de controlo. O espectro da linha 9 (NR 9 + ST) é também mostrado em combinação com uma série de inulina (G = glicose, F = frutose, S = sacarose, GP = grau de polimerização).

A Figura 8B mostra os espectros de um controlo (C1), transformante n°. 4 (#4) e transformante n°. 4 em que foram

adicionados ao extracto 100 ng de 6-kestose (#4 + 6K). A designação "6K" no espectro indica o pico de 6-kestose.

## EXEMPLO 1

### Sacarose-frutano-6-frutosiltransferase (6-SFT) de cevada

#### 1. Introdução

A sacarose-frutano-6-frutosiltransferase (6-SFT) é uma enzima chave para a biossíntese de frutanos ramificados (também designados graminanos) que são típicos das gramíneas. A enzima forma kestose a partir de sacarose e bifurcose a partir de sacarose e iso-kestose. Neste exemplo a purificação de uma 6-SFT de cevada (*Hordeum vulgare* L.) é descrita, além da clonagem do ADNc inteiro e confirmação da funcionalidade.

#### 2. Purificação da sacarose-frutano-6-frutosiltransferase

Folhas primárias de plantas de cevada (*Hordeum vulgare* L. cv Express) com oito a dez dias de idade foram cortadas e expostas à luz continuamente durante 48 horas para induzir a acumulação de frutanos e as enzimas da biossíntese de frutanos, tal como descrito por Simmen *et al.* *Plant Physiol.* 101: 459-468 (1993). As folhas foram subsequentemente congeladas em azoto líquido e armazenadas as -70°C até serem utilizadas.

Foi preparada uma preparação de enzima através da moagem de folhas primárias induzidas (700 g de peso fresco) num pó fino em azoto líquido e subsequentemente suspensão em tampão de extracção (metilpiperazina 25 mM, ajustada a pH 5,75 com HCl, com DTT 1 mM, benzamidina 1 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0,1 mM e PVP a 0,5%). Foram utilizados 2 ml por g de peso fresco deste. Após descongelamento, o extracto foi mantido a 4°C e ajustado a pH 4,75 através da adição de HCl 0,1 M às gotas com agitação. Três horas mais tarde o extracto foi centrifugado durante 30 minutos a 17000 g. O sobrenadante resultante foi dialisado de um dia para o outro a 4°C contra tampão de diálise (tampão metilpiperazina (HCl) 10 mM (pH 5,75), com DTT 1 mM, benzamidina 1 mM, EDTA 1 mM e PMSF 0,1 mM).

A solução de enzima foi purificada por meio de cromatografia de afinidade em Azul Sepharose. Para este fim a solução de enzima foi filtrada através de um filtro Millipore de 0,45 micrómetros e carregada a um caudal de 2 ml por minuto numa coluna (26×120 mm) de Azul Sepharose-6-fluxo rápido (Pharmacia, Uppsala, Suécia), que tinha sido previamente equilibrada com o tampão de diálise acima descrito. Para remover proteínas sem afinidade para o corante a coluna foi lavada com três volumes do leito do tampão de diálise. As proteínas ligadas foram eluídas a um caudal de 3 ml por minuto (fracções de 5 ml), primeiro com NaCl 0,2 M em tampão metilpiperazina (HCl) 10 mM (pH 5,75) durante 30 minutos, seguido de um gradiente linear de NaCl de 0,2 M a 0,5 M no mesmo tampão em 90 minutos.

Todas as fracções que continham actividade de 6-SFT foram reunidas, dialisadas de um dia para o outro a 4°C contra tampão de diálise e depois concentradas até um terço do volume inicial cobrindo o saco de diálise com polietilenoglicol 40000 e incubando-o durante 4 horas a 4°C.

Para um primeiro passo de cromatografia de permuta aniónica a fracção de 6-SFT foi filtrada e carregada a um caudal de 3 ml por minuto numa coluna Resource Q de 6 ml (Pharmacia), que tinha sido equilibrada inicialmente com tampão de diálise. Após a coluna ser lavada com tampão metilpiperazina (HCl) 10 mM (pH 5,75), a proteína ligada foi eluída com um gradiente linear de NaCl de 0 a 0,15 M no mesmo tampão em 8 minutos a um caudal de 15 ml por minuto. Fracções de 1 ml foram recolhidas. As fracções que continham 6-SFT foram reunidas e suplementadas com sulfato de amónio até uma concentração final de 2 M.

O banco de 6-SFT foi subsequentemente sujeito a cromatografia de interacção hidrófoba. Para este fim o banco foi carregado a um caudal de 0,5 ml por minuto numa coluna de alquilsuperose HR5/5 (Pharmacia) que tinha sido equilibrada inicialmente com tampão ácido cítrico- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM (pH 5,0) com sulfato de amónio 2 M. As proteínas ligadas foram eluídas em 60 minutos a um caudal de 0,5 ml por minuto com um gradiente linear de sulfato de amónio de 2 a 0 M em tampão

ácido cítrico- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM (pH 5,0). Fracções de 0,5 ml foram recolhidas e as fracções que continham actividade de 6-SFT foram reunidas.

As fracções reunidas foram sujeitas a cromatografia de filtração em gel e antes desta foram primeiro concentradas num volume total de 190 microlitros em tubos de centrífuga microconcentradores (Centricon-30, Amicon-Grace, Beverly, CT). O concentrado foi colocado numa coluna de filtração em gel Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia), que foi equilibrada com tampão ácido cítrico- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM (pH 5,75) com NaCl 0,2 M, e eluída com o mesmo tampão a um caudal de 0,4 ml por minuto. Fracções de 0,2 ml foram recolhidas e as fracções contendo actividade de 6-SFT foram reunidas e dessalgadas através de 5 concentrações sucessivas e passos de diluição em tubos de centrífuga microconcentradores Centricon-30 com tampão metilpiperazina (HCl) 10 mM (pH 5,75).

Para um segundo passo de cromatografia de permuta aniónica a amostra dessalgada foi carregada numa coluna Resource Q de 6 ml (Pharmacia). As condições e tampões foram os mesmos que para o primeiro passo de cromatografia de permuta aniónica mas o tamanho da fracção foi reduzido para 0,5 ml. As fracções que continham actividade de 6-SFT foram combinadas no banco I, II e III (Fig. 1A).

Durante a purificação a actividade enzimática das fracções foi determinada após os diferentes passos de purificação. Para este fim porções de 50-100  $\mu\text{l}$  das preparações de enzima foram dessalgadas guiando-as através de colunas Biogel P-10 (8 $\times$ 300 mm) por centrifugação a 350 g durante 5 minutos (Simmen *et al.*, *supra*). As preparações de enzima dessalgadas foram incubadas com sacarose 0,2 M em tampão ácido cítrico- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM (pH 5,75) para identificar fracções contendo actividade de 6-SFT durante a purificação. As preparações finais de enzima (banco I e III) foram incubadas apenas com sacarose 0,1 M ou em combinação com iso-kestose 0,1 M em tampão metilpiperazina (HCl) 25 mM (pH 5,75). A menos que indicado em contrário, os ensaios da actividade enzimática foram realizados durante três horas a 27°C. A reacção foi parada através de aquecimento das amostras durante 3 minutos a 95°C. As amostras foram

centrifugadas durante 5 minutos a 13000 g, suplementadas com trealose (padrão interno) até uma concentração final de 0,1 µg/µl, e armazenadas a -20°C até à análise.

Os hidratos de carbono neutros foram analisados por meio de cromatografia de permuta aniónica numa coluna CarboPac PA-100 (Dionex, Sunnyvale, USA) com um sistema de cromatografia em gradiente Dionex DX-300 ligado a detecção amperométrica pulsada (Simmen *et al.*, *supra*). Antes da análise por meio de cromatografia de permuta aniónica, foram detectadas actividades enzimáticas libertando glicose a partir de sacarose nas fracções recolhidas durante a purificação da enzima, isto utilizando o estojo de teste de glicose (método GOD-Perid, Boehringer GmbH, Mannheim, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

Duas isoformas de 6-SFT com propriedades catalíticas indistinguíveis foram isoladas através da purificação (tabela I). Através de cromatografia de afinidade numa coluna azul HighTrap e através de cromatografia de interacção hidrófoba na coluna de alquilsuperose, a actividade de invertase (beta-frutosidase) foi quase completamente separada de 6-SFT. Isto significa que a 6-SFT não possui actividade de invertase. A razão de mol entre a actividade de beta-frutosidase e frutossiltransferase caiu num factor de 6 após cromatografia de afinidade e foi então mais reduzida até uma razão final de aproximadamente três após cromatografia de interacção hidrófoba (Tabela I). A actividade de beta-frutosidase restante não podia ser separada de 6-SFT e portanto parece ser uma das suas propriedades catalíticas.

Tal como já demonstrado por Simmen *et al.* (*supra*), a sua capacidade para transferir frutose para sacarose ou para iso-kestose é uma propriedade que caracteriza 6-SFT. Ambas as isoformas de 6-SFT que foram obtidas após a segunda coluna de permuta aniónica têm as mesmas propriedades catalíticas tal como mostrado através de análise de HPLC dos produtos formados após incubação apenas com sacarose ou com sacarose e iso-kestose (Fig. 1B). Na presença de sacarose como o único substrato, forma-se principalmente kestose mas a sacarose é igualmente hidrolisada em glicose e frutose. Após a incubação com sacarose e iso-kestose, forma-se principalmente bifurcose

e é hidrolisada muito menos sacarose. Isto indica que a iso-kestose é o aceitador preferido em comparação com a sacarose e que a actividade de beta-frutosidase é um componente da 6-SFT.

### 3. Electroforese em gel

Para ilustrar a pureza das duas isoformas de 6-SFT, fracções da cromatografia Resource Q residindo entre os dois picos de 6-SFT, e portanto contendo ambas as fracções, foram reunidas (banco II na Fig. 1) e analisadas através de análise em gel de IEF não desnaturante combinada com um ensaio de actividade enzimática (Fig. 2A) ou com análise de SDS-PAGE (Fig. 2B).

Para electroforese bidimensional de 6-SFT o banco II foi sujeito a focagem isoeléctrica dentro de um intervalo de pH de 4-8 sob condições não desnaturantes utilizando um Mini-Protean II 2D-cell (Biorad) de acordo com o protocolo do fabricante.

Os géis tubulares de 1 mm foram subsequentemente cultivados durante 30 minutos em tampão de amostra 5× e carregados num gel de SDS-poliacrilamida a 7,5-12% para uma separação na segunda dimensão (Laemmli, *Nature* 227: 680-685, (1970)), ou lavado três vezes durante dez minutos em tampão ácido cítrico- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,5 M (pH 5,75) e cortado em peças de 2,5 mm para um ensaio da actividade enzimática. Os pedaços de gel de 2,5 mm foram incubados em tampão ácido cítrico- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,4 M (pH 5,75) com sacarose 0,2 M e  $\text{NaN}_3$  a 0,02% durante 12 horas a 27°C. Após centrifugação a 13000 g durante 5 minutos o sobrenadante foi recolhido, aquecido a 95°C durante 3 minutos, suplementado com trealose (padrão interno, concentração final de 0,1 µg/µl) e armazenado a -20°C para mais análises.

As proteínas separadas em géis de SDS-poliacrilamida foram tornadas visíveis por meio de uma coloração de prata (Blum, 1987).

As duas isoformas foram claramente separadas e ambas tinham actividade de frutotransferase e igualmente

actividade de beta-frutosidase. O seu pI diferiu apenas ligeiramente e esteve próximo de pH 5,0. Após desnaturação de ambas as isoformas de 6-SFT proporcionaram em SDS-PAGE duas subunidades de respectivamente 49 e 23 kDa. Estes dados e a quase completa identidade dos padrões de fragmentos obtidos através de digestão triptica (dados não mostrados) indicam que as duas isoformas apresentam mesmo muitas semelhanças em relação à estrutura e sequência. A 6-SFT carregada negativamente (contendo ambas as isoformas) tinha aproximadamente 67 kDa tal como determinado através de cromatografia de exclusão de tamanho (dados não mostrados).

#### 4. Determinação da sequência de aminoácidos N-terminal

Para a determinação da sequência de aminoácidos N-terminal foram carregados 100 µg de proteína de 6-SFT banco I e banco III num gel de gradiente (7,5-12%) e separadas através de SDS-PAGE (Laemmli, *supra*). As proteínas foram transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (membrana de transferência Immobilon PVDF, Millipore Corp., Bedford, MA) utilizando o sistema de tampões CAPS (Matsudeira, *J. Biol. Chem.* 262: 10035-10038 (1987)). As bandas proteicas foram tornadas visíveis na membrana com Ponceau S a 0,2% em ácido acético a 1%, cortadas e digeridas com tripsina.

Os péptidos tripticos foram separados através de HPLC fase inversa e a determinação da sequência N-terminal dos péptidos tripticos foi realizada através de degradação de Edman automática.

A sequência peptídica do terminal N da subunidade de 49 kDa foi determinada e ambas as subunidades, grande e pequena, foram digeridas com tripsina para obter sequências peptídicas internas. Para ambas as subunidades foram determinadas duas sequências de aminoácidos de péptidos tripticos que foram utilizadas para desenhar iniciadores de ADN (Fig. 3).

#### 5. Desenho de uma sonda

Foi gerado um fragmento de 397 pb através de transcrição reversa-reacção em cadeia da polimerase (RT-PCR). Para este

fim foi sintetizado ADNc de cadeia simples através de transcrição reversa de Poli(A<sup>+</sup>)-ARN utilizando um iniciador oligo-d(T) sintético (23mero) e transcriptase reversa M-MuL V. A PCR foi efectuada de acordo com o protocolo de Perkin-Elmer entre os dois iniciadores sintéticos, degenerados:

- (i) CGCCTGCAGGTACCACATGTT(C/T)TA(C/T)CA(A/G)TA(C/T)AA(C/T)CC
- (ii)CCACGTCTAGAGCTCTC(A/G)TC(A/G)TACCA(A/C/G)GC(C/G)GTCAT

Estes iniciadores foram desenhados de acordo com duas sequências parciais de péptidos obtidos após digestão triptica de 6-SFT. O produto de PCR resultante foi clonado no vector pCR-II<sup>™</sup> (estojo de clonagem TA, Invitrogen). A marcação do fragmento com  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP foi efectuada com um estojo de marcação de iniciadores aleatórios (Boehringer GmbH, Mannheim, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

#### 6. Pesquisa de uma biblioteca de ADNc

O fragmento de 397 pb gerado de acordo com o método de 5 foi utilizado como sonda numa análise de *blots* de gel de ARN de folhas primárias, nas quais a acumulação de frutanos foi induzida através de exposição contínua a luz durante tempos diferentes. Verificou-se não haver sinal de hibridação no caso das folhas não tratadas enquanto uma banda que hibridou de aproximadamente 1800 pb se acumulou rapidamente de um modo que correspondeu com o aumento na actividade de 6-SFT nas folhas (dados não mostrados). Este resultado aponta para a presença de um ARN mensageiro de cerca de 1800 pb de comprimento.

O produto de PCR foi também utilizado para pesquisar uma biblioteca de expressão de ADNc de folhas primárias. Foi feita aqui uma pesquisa de um ADNc inteiro.

Para este fim foi primeiro produzida uma biblioteca de expressão de ADNc através de extracção de ARN total de folhas primárias de 8 dias de idade cortadas nas quais a síntese de frutanos foi induzida através de exposição contínua à luz durante 48 horas. As folhas foram moídas em azoto líquido num pó fino e suspensas em tampão de extracção de ARN (Tris (HCl) 0,1 M, pH 9, com EDTA 10 mM, NaCl 0,1 M e DTT 25 mM). A amostra ainda congelada continuou a ser moída até ser

alcançada uma consistência semelhante a um creme e a amostra foi então extraída com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1; v:v:v) (Brandt e Ingversen, *Carlsberg Res. Commun.* 43: 451-469, 1978). O método foi modificado de algum modo através da omissão de um segundo passo de homogeneização e através da precipitação do ARN de um dia para o outro com LiCl 2 M a 4°C após a última extracção em clorofórmio. Após uma precipitação final em etanol o poli(A)<sup>+</sup>-ARN foi isolado através de cromatografia de poli(U)-Sepharose (Brandt e Ingversen, *supra*) e utilizado para síntese de ADNc (estojo de síntese ZAP-cDNA, Stratagene, LaJolla, Ca, USA).

O ADNc foi ligado num vector uni-ZAP-XR, digerido com *EcoRI* e *XhoI* e empacotado em partículas fágicas (Gigapack III, Packaging Kit, Stratagene, La Jolla, Ca, USA) ( $7,5 \times 10^7$  unidades formadoras de placas por 5 µg de poli(A)<sup>+</sup>-ARN).

A biblioteca primária foi pesquisada com o fragmento de 6-SFT de 397 pb de comprimento marcado com  $\alpha$ -<sup>32</sup>P (ver acima) a 60°C de acordo com o protocolo de Stratagene. Os clones positivos foram pesquisados novamente e os fagomídeos de Bluescript foram finalmente clivados a partir dos fagos positivos resultantes utilizando o sistema Exassist/SOLR (Stratagene, La Jolla, Ca, USA). A determinação da sequência de ADNc de ambas as cadeias foi realizada através do método de determinação da sequência didesoxinucleotídica utilizando o estojo de sequenciação PRO (Toyobo, Osaka, Japão). A menos que indicado em contrário, foram utilizados protocolos padrão (Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989)). A análise de dados das sequências foi realizada utilizando o pacote de suporte lógico de análise de sequências de GCG, versão 7.2 (1992).

Após a primeira pesquisa foram isolados 9 clones positivos. Após outra pesquisa permaneceram 7 clones positivos. Destes a sequência foi parcialmente determinada a partir do terminal 5' e a partir dos iniciadores internos que foram desenhados com base no produto de PCR. Todos os 7 clones pareciam codificar para a mesma proteína, e quatro deles compreendiam a sequência de codificação completa. De um dos possíveis clones de comprimento inteiro foi totalmente determinada a sequência de ambas as cadeias e verificou-se

que codificava para um polipéptido que continha a subunidade de 49 kDa bem como a subunidade de 23 kDa (Fig. 3).

Uma vista esquemática da sequência nucleotídica completa do ADNc completamente sequenciado é mostrada na Fig. 4. Compreende um enquadramento de leitura aberto longo que começa no nucleótido 46 e termina no nucleótido 1923 para dois códons de terminação. O enquadramento de leitura aberto codifica para uma cadeia polipeptídica de 626 aminoácidos incluindo uma sequência líder de 67 resíduos de comprimento.

A 6-SFT madura começa no nucleótido 246 e tem portanto pelo menos 559 resíduos de aminoácidos com um peso molecular calculado de 61,3 kDa e um pI calculado de 5,37. Todas as 5 sequências de aminoácidos parciais obtidas a partir da proteína purificada estão presentes na sequência de aminoácidos derivada do ADNc (Fig. 4). O ADNc contém igualmente 45 pb de uma sequência 5' não traduzida e 171 pb de uma sequência 3' não traduzida com uma cauda poli(A). Um possível sinal de início da tradução (ATG) do ADNc de 6-SFT está localizado nas posições de nucleótidos 46 a 48 e uma possível sequência de poliadenilação está presente nas posições de nucleótidos 1973 a 1979. Verificou-se que a 6-SFT madura apresenta ligação reversível de alfa-metil-manósido em ConA-Sepharose, o que indica que é uma glicoproteína (dados não mostrados). Semelhantemente, a sequência de aminoácidos derivada contém 6 possíveis posições de glicosilação (Asn-X-Ser/Thr).

Todas as sequências peptídicas obtidas a partir da proteína purificada estão situadas sem qualquer correspondência errada na sequência de aminoácidos derivada. As duas sequências peptídicas obtidas a partir da subunidade de 23 kDa da SFT purificada estão localizadas próximo do terminal 3' do ADNc, enquanto as sequências obtidas a partir da subunidade de 49 kDa estão localizadas na vizinhança do terminal 5'.

Para estudar a possível relação do ADNc com beta-frutosidases e frutossiltransferases conhecidas, a sequência de aminoácidos derivada foi comparada com a sequência de diferentes invertases vegetais, fúngicas e bacterianas, e com

levanases e levansacarases bacterianas (Fig. 5 e Fig. 6). O ADNc aqui descrito tem a homologia mais elevada com as invertases ácidas solúveis da soja verde (feijão-mung) (Arai *et al.*, *supra*), cenoura (Unger *et al.*, *supra*), e tomate (Elliott *et al.*, *supra*), e igualmente homologias claras com invertases, levanases e levansacarases de outros reinos, isto é, com várias beta-frutosidases. A comparação da sequência de aminoácidos indica pelo menos cinco domínios bem conservados. Os domínios I e IV são menos conservados entre as invertases e levansacarases que os domínios II, III e V. Com estas enzimas o domínio III, em particular, é muito conservado. Surpreendentemente, a homologia mais limitada é com as levansacarases bacterianas, isto é, com uma classe de enzimas que catalisam uma reacção semelhante de transferência de 6-frutosil tal como 6-SFT (ver o dendrograma na Fig. 6).

#### 7. Expressão de 6-SFT em protoplastos de *Nicotiana plumbaginifolia*

O clone de ADNc de 6-SFT foi sub-clonado, num derivado do vector plasmídico pUC119 (Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989) sob a regulação dos sinais de expressão do transcrito 35S do vírus do mosaico da couve-flor (ver Neuhaus *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10362-10366 (1991)).

Os protoplastos de *Nicotiana plumbaginifolia* foram isolados e transformados grandemente tal como descrito por Goodall *et al.* (*Meth. Enzymol.* 181: 148-161 (1990)). Em resumo, 10 µg do plasmídeo contendo o ADNc de 6-SFT foram dispersados num volume de 10 µl de tampão TE em tubos de plástico de 15 ml estéreis. Transformações de controlo foram realizadas com 10 µg do mesmo plasmídeo sem inserção. Foram adicionados  $1 \times 10^6$  protoplastos a um volume de 0,5 ml e misturou-se cuidadosamente com um volume igual de polietilenoglicol 6000 a 20% (p/v). Após 2-5 minutos foram adicionados 6,5 ml de meio K3 e os protoplastos foram incubados durante duas horas a 27°C. Foram posteriormente diluídos 1:1 com o osmótico W5 e sedimentados durante 10 minutos a 1000 g. Todos os protoplastos (excepto os que foram tomados como controlo a t=0 horas) foram ressuspensos em 2 ml

de meio K3 e incubados a 27°C. Após 3, 6, 9, 18 e 27 horas amostras foram tomadas para análise do produto. Os protoplastos foram aqui sedimentados durante 10 minutos a 1000 g após adição de 2 ml de osmótico W5. O sedimento de protoplastos foi ressuspenso em tampão ácido cítrico- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M (pH 5,75), transferido para tubos Eppendorf estéreis e congelado em azoto líquido. Após descongelação as amostras foram sujeitas a vórtice e os restos celulares sedimentados a 13000 g durante 3 minutos. Os sobrenadantes (50 a 100  $\mu\text{l}$ ) foram dessalgados orientando-os através de colunas Biogel P-10 tal como descrito acima. As amostras de enzima dessalgadas foram incubadas com sacarose 0,1 M ou com sacarose 0,1 M em combinação com iso-kestose 0,1 M em tampão ácido cítrico- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM (pH 5,75) com  $\text{NaN}_3$  a 0,02% durante 20 horas a 27°C. A análise do produto foi realizada tal como descrito no caso da Fig. 1 após parar a reacção fazendo aquecer as amostras a 95°C durante 3 minutos.

Após uma fase inicial de latência de cerca de 3 horas os extractos de protoplastos formaram kestose a partir de sacarose e bifurcose a partir de sacarose e iso-kestose. Isto confirma que o ADNc codifica para uma 6-SFT funcional (Fig. 6). Tal como a enzima purificada, a actividade presente nos protoplastos catalisou a produção de bifurcose a partir de sacarose e iso-kestose a uma velocidade que foi quase quatro vezes mais elevada que a da produção de iso-kestose a partir de sacarose. Estes resultados confirmam que o ADNc codifica para uma 6-SFT.

## 8. Expressão do gene de 6-SFT em plantas

O ADNc de 6-SFT foi clonado entre um promotor 35S específico de plantas e um sinal de terminação originário do gene da nopalina-sintetase. Esta construção génica quimérica (35S-6SFT-NOS) foi subsequentemente inserida num derivado do vector binário de plantas pBIN19 (Bevan, *Nucl. Acids. Res.* 12: 8711-8721). Isto resultou no plasmídeo pVDH280. Este plasmídeo foi conjugado em *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Hoekema *et al.*, *Nature* 303: 179-180 (1983)) num cruzamento tripartido utilizando o plasmídeo ajudante pRK-2013 (Lam, *Plasmid* 13: 200-204 (1985)). A construção foi introduzida em *Nicotinia tabacum* var. Samsun NN utilizando o método de

transformação de disco foliar (Horsch et al., *Science* 227: 1229-1232 (1985)). As plantas regeneradas foram seleccionadas para resistência a canamicina, cultivadas em meio MS (Murashige e Skoog, *Physiol. Plant.* 15: 473-497 (1962)) e analisadas.

O material foliar de plantas de controlo não transgénicas *in vitro* bem como das plantas transgénicas *in vitro* 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10 e 11 foi cortado e moído num tubo eppendorf. Após centrifugação (2 minutos a 16000 rpm) foram analisados 200 µl por meio de um sistema Dionex DX-300 com coluna PA-100 e Detecção Amperométrica Pulsada e eluição com um gradiente de NaOH/NaAc até NaOH a 100%. Os espectros obtidos são mostrados na Figura 8.

Nunca foram verificados oligossacáridos nas plantas de tipo selvagem (C1) ou em plantas que foram transformadas com construções não relacionadas (Fig. 8A). A pesquisa dos transformantes mostrou com a utilização destes métodos plantas acumulando oligossacáridos com um GP que, com base na série de inulina, é estimado residir entre 3 e 5 e entre 8 e 9. Os níveis de expressão variaram entre plantas individuais transformadas com a mesma construção. Isto é um fenómeno normal em experiências de transformação em plantas. A variação dos níveis de expressão depende substancialmente da posição de integração no genoma (efeito de posição).

Após adição de 100 ng de 6-kestose ao estrato do transformante n°. 4 foi novamente registado um espectro. A Fig. 8B indica que no caso do transformante n°. 4 formaram-se oligossacáridos com uma ligação de tipo 2-6, uma vez que o pico mais elevado é visível em comparação com o espectro sem 6-kestose. Portanto o pico corresponde provavelmente a 6-kestose.

## EXEMPLO 2

### Aplicabilidade com outras espécies vegetais

Para ilustrar a aplicabilidade geral da tecnologia, as construções descritas no exemplo anterior foram introduzidas em culturas diferentes. A batata foi assim transformada de acordo com o método descrito em Visser, "Plant Tissue Culture

Manual B5", 1-9, Kluwer Academic Publishers, 1991. As plantas transgênicas resultantes acumularam oligossacáridos em todos os órgãos testados. A mesma construção foi também introduzida na beterraba (*Beta vulgaris* L.) que foi transformada tal como descrito por D'Halluin *et al.*, *Biotechnology* 10: 309-314 (1992). As plantas de beterraba transgênicas resultantes acumularam quantidades significativas de oligossacáridos por exemplo nas suas folhas e raízes. As mesmas construções foram introduzidas em *Brassica napus* L. que foi transformada de acordo com Block *et al.*, *Plant Physiol.* 91: 694-701 (1989). As plantas transgênicas resultantes acumularam níveis significativos de oligossacáridos por exemplo nas suas folhas e órgãos de armazenamento. Claro que não é essencial que as plantas sejam transformadas do modo indicado. Outros métodos ao alcance do perito podem também ser utilizados.

Exemplos de outras espécies vegetais que podem ser modificadas compreendem, mas não se limitam a, milho (*Zea mays* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), soja (*Glycin max* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), chicória (*Cichorium intybus* L.), cana do açúcar (*Saccharum officinarum* L.), batata-doce (*Dioscorea esculenta* L.), mandioca (*Manihot esculenta* L.) e gramíneas (por exemplo *Lolium* sp., *Poa* sp. e *Festuca* sp.).

As plantas com padrões de separação de hidratos de carbono modificados, naturais ou induzidos, podem ser plantas alvo preferidas para a introdução de genes de síntese de oligossacáridos. Tais plantas compreendem, mas não se limitam a, mutantes naturais do metabolismo do amido e da sacarose, e plantas nas quais o metabolismo do amido e da sacarose é modificado por meio de técnicas moleculares e genéticas, tal como é descrito, por exemplo, em Sonnewald e Willmitzer, *Plant Physiology* 99: 1267-1270, (1992).

### EXEMPLO 3

#### Utilização dos oligossacáridos de acordo com o invento

Os oligossacáridos produzidos utilizando o método de acordo com o invento podem ser utilizados como substitutos do

açúcar em diferentes produtos. Três exemplos destes são dados abaixo.

### 1. Gelado

O gelado é preparado a partir dos seguintes ingredientes:

- 635 partes de água
- 90 partes de gordura butírica
- 100 partes de leite em pó magro
- 170 partes de oligossacáridos de acordo com o invento
- 5 partes de Cremodan SE30™ (Grindsted)
- 0,3 partes de Aspartame™
- aromas conforme necessário.

O leite em pó é dissolvido na água. O todo é aquecido a 40-45°C. Os restantes ingredientes secos são misturados e dissolvidos no leite morno. É então adicionada a gordura derretida. Este todo é então pasteurizado durante 10 minutos a 72°C. A mistura é a partir daí homogeneizada num homogeneizador de dois passos a 150/35 bar. A mistura gelada acima obtida é arrefecida rapidamente até 5°C e o todo é subsequentemente deixado maturar durante um mínimo de 4 horas a 5°C. Finalmente, a mistura gelada é arejada e congelada numa saturação de 100%.

Após endurecimento a -35°C e armazenamento a -20°C obtém-se um creme gelado que corresponde em termos de sabor e textura ao gelado preparado com açúcares naturais (sacarose, xarope de glicose).

### 2. Barra de *muesli*

Foi preparada uma barra de *muesli* a partir dos seguintes ingredientes:

- 28 partes de oligossacáridos de acordo com o invento
- 68 partes de mistura de *muesli*
- 4 partes de cacau

Foi produzido um xarope a partir dos oligossacáridos aquecendo, xarope que foi misturado com os outros ingredientes. As barras foram formadas a partir da mistura assim obtida numa prensa cilíndrica. Devido à omissão de açúcar natural a barra tem muito menos calorias que as barras convencionais.

### 3. Refrigerante

Foi preparado um refrigerante a partir dos seguintes ingredientes:

- 90 partes de água ou sumo de fruta
- 8-10 partes de oligossacáridos de acordo com o invento
- adoçantes artificiais
- aromas e agentes corantes
- ácidos nutrientes
- dióxido de carbono

Todos os ingredientes foram dissolvidos numa parte da água. A restante água foi então adicionada como água contendo dióxido de carbono. O valor energético do refrigerante é muito menor porque não são adicionados açúcares naturais adicionais.

Tabela I  
Purificação de 6-SFT

| Passo de purificação        | Frutosiltransferase <sup>a</sup> |     | Proteína | Purificação | β-frutosidase/frutosiltransferase <sup>b</sup> |
|-----------------------------|----------------------------------|-----|----------|-------------|------------------------------------------------|
|                             | nkatal <sup>c</sup>              | %   | mg       | vezes       | razão mol                                      |
| Extracto bruto              | 243                              | 100 | 5000     | 1           | 32                                             |
| Precipitação em ácido       | 159                              | 66  | 1700     | 2           | 29                                             |
| HighTrap-azul               | 71,6                             | 29  | 450      | 3           | 5,7                                            |
| Primeira Resource Q         | 22,6                             | 9,3 | 79       | 6           | 6,2                                            |
| Alcil-Superose              | 932                              | 3,8 | 56       | 4           | 3,2                                            |
| Superdex 75                 | 6,64                             | 2,7 | 95       | 15          | 3,4                                            |
| Segunda Resource Q banco I  | 2,99                             | 1,2 | 0,6      | 103         | 2,7                                            |
| Segunda Resource Q banco II | 433                              | 1,8 | 1,7      | 52          | 3,2                                            |

<sup>a</sup> medida como actividade produtora de kestose

<sup>b</sup> mol de frutose por mol de frutose produzida

<sup>c</sup> nkatal = nmol.s<sup>-1</sup>

Lisboa, 2011-11-17

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de uma mistura de oligossacáridos possuindo um comprimento de cadeia de moléculas individuais que reside substancialmente entre 2 e 8, o referido método compreendendo os passo de:

a) selecção de um gene de origem vegetal que codifica para uma enzima que é capaz de converter sacarose num oligossacárido;

b) ligação do gene a sinais adequados de início da transcrição e de terminação da transcrição para proporcionar uma construção de expressão;

c) transformação de uma célula vegetal adequada com a construção de expressão;

d) regeneração de uma planta transgénica a partir da célula vegetal transformada;

e) cultura da planta transgénica sob condições que permitam a expressão e actividade da enzima; e

f) isolamento dos oligossacáridos da planta transgénica, em que o gene dos passos a) e b) codifica para sacarose-frutano-6-frutosiltransferase (6-SFT) possuindo a sequência de aminoácidos da Figura 4.

2. Método tal como reivindicado na reivindicação 1, em que a construção de expressão compreende ainda pelo menos uma sequência sinal direccionadora.

3. Método tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a construção de expressão compreende ainda pelo menos um estimulador.

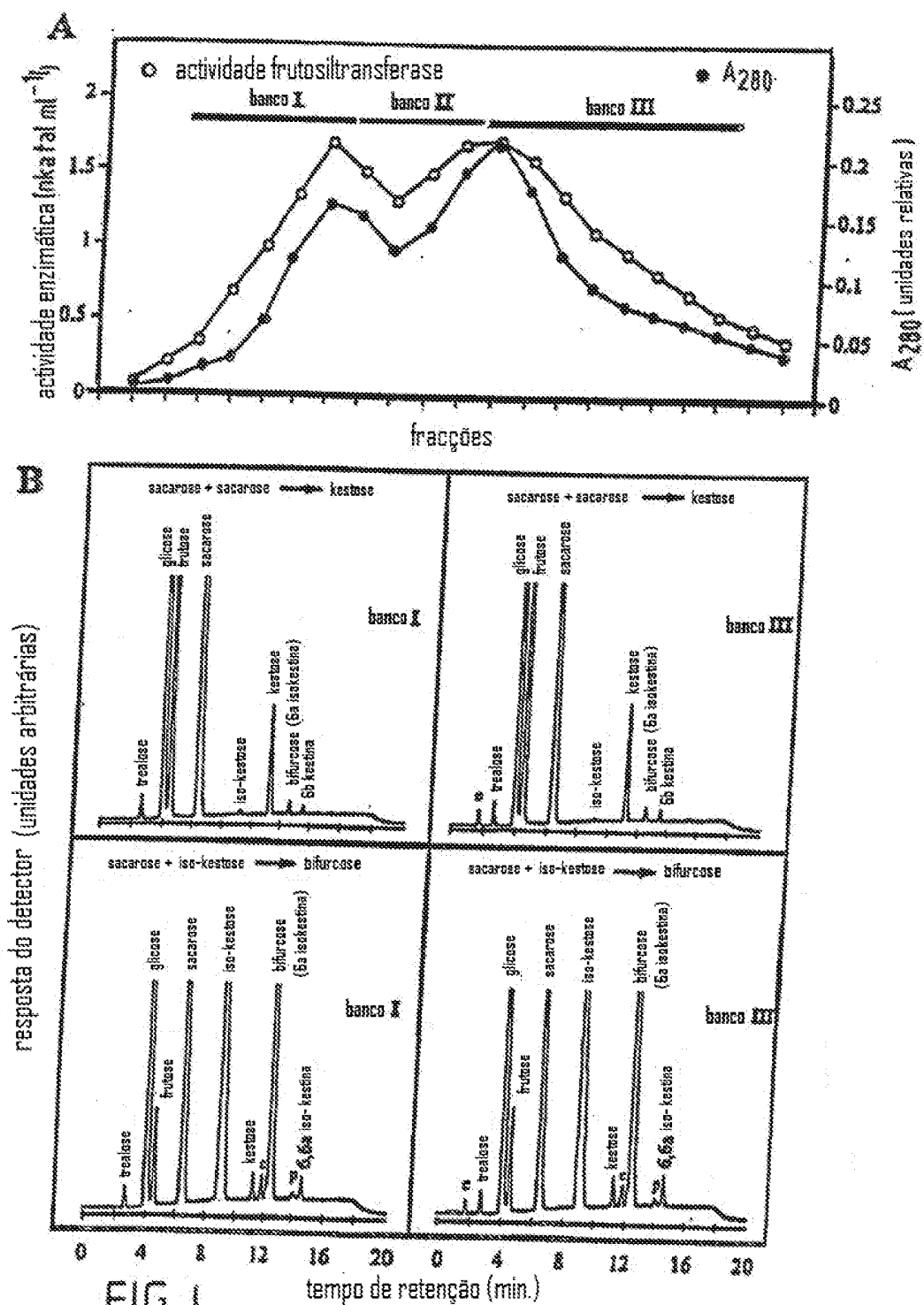
4. Construção de ADN para expressão de uma enzima capaz de converter sacarose num oligossacárido numa planta ou célula vegetal, compreendendo um gene que codifica para a enzima, ligado enquadrado a sinais de início e de terminação da transcrição específicos de plantas, em que o gene codifica para a enzima sacarose-frutano-6-frutosiltransferase (6-SFT) possuindo a sequência de aminoácidos da Figura 4.

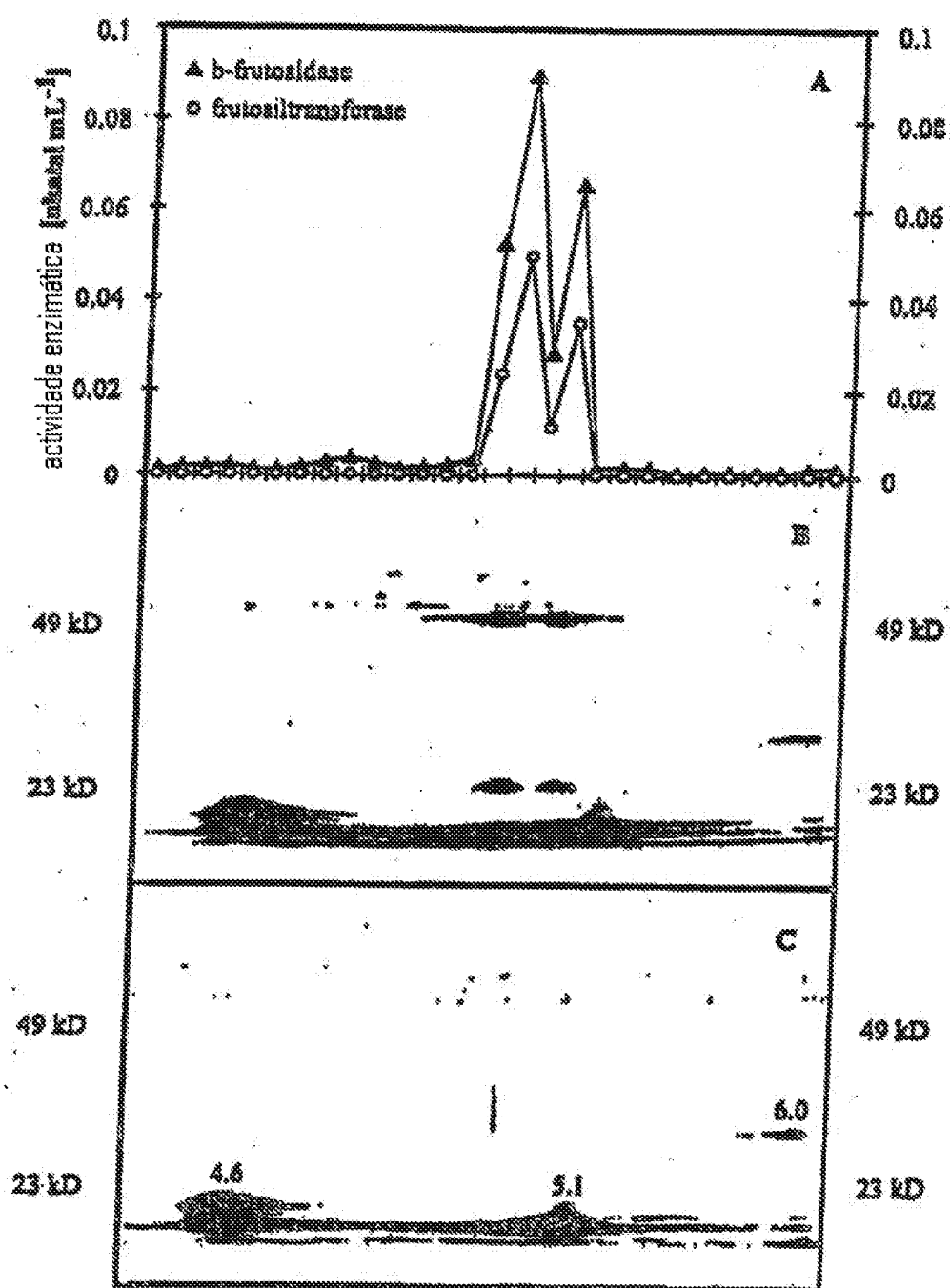
5. Célula vegetal transgénica, compreendendo a construção de ADN tal como reivindicada na reivindicação 4.

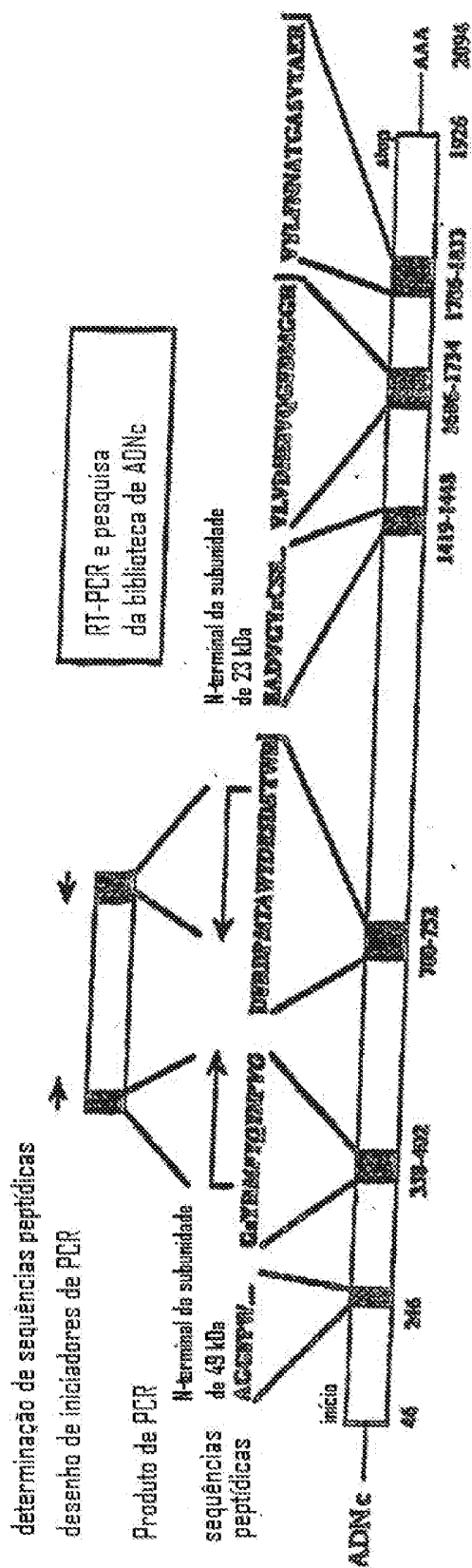
6. Planta transgénica compreendendo a construção de ADN da reivindicação 4, obténível através de regeneração a partir de uma célula vegetal transgénica tal como reivindicado na reivindicação 5.

7. Tecido vegetal transgénico compreendendo a construção de ADN da reivindicação 4, originário de uma planta tal como reivindicada na reivindicação 6 ou obténível através de regeneração de uma célula vegetal transgénica tal como reivindicada na reivindicação 5.

Lisboa, 2011-11-17



FIG. 2



354

## Sequência de ADNc codificando 6-SFT de cevada

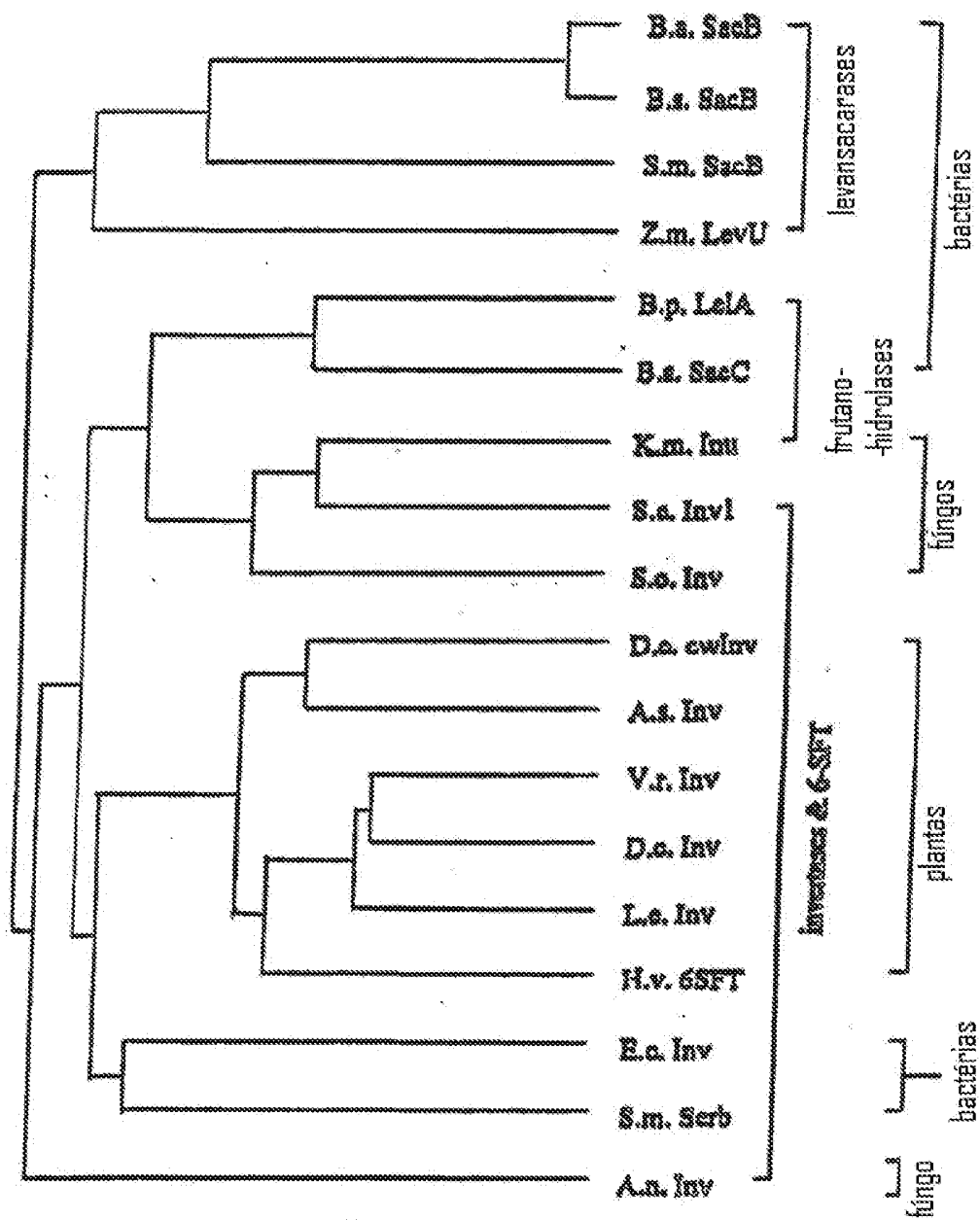
GCTCAGAACTTACCAACCCCTCTCGAGTTGACGAGCGCGCCGCGCATGGGCTCACACGGC  
 MetGlySerHisGly  
 AAGCCACCGCTACCGTACGCTTACAAGCCGCTGCGCCCTCGGACCGCGCGGACGGTAAGCGG  
 LysProProLeuProTyrAlaTyrLysProLeuProSerAspAlaAlaAspGlyLysArg  
 ACCGGCTGACATGAGGTGGTCCGCGTGTGCTACCGTCTGACCGCCTCGGCCATGGCGGTG  
 ThrGlyCysMetArgTrpSerAlaCysAlaThrValLeuThrAlaSerAlaMetAlaVal  
 GTGGTGGTGGCGCCACGCTCTCTGGCGGATTGAGGATGGAGCAGGCGGCTCGACGAGGAG  
 ValValValGlyAlaThrLeuLeuAlaGlyLeuArgMetGluGlnAlaValAspGluGlu  
 GCGCGCGCGCGCGCGGTTCCTGGAGCAACGAGATGCTGCACTGGCAGCGCAGCGGTTAC  
 AlaAlaAlaGlyGlyPheProTrpSerAsnGluMetLeuGlnTrpGlnArgSerGlyTyr  
 CATTCCAGACCGCCAGAACTACATGAGCGATCCCAACGCGCTGATGTATTACCGTGA  
 HisPheGlnThrAlaLysAsnTyrMetSerAspProAsnGlyLeuMetTyrTyrArgGly  
 TGGTACCACATGTTCTACCACTACAACCGGTGGGCGACCGACTGGGACGACCGCATGGAG  
 TrpTyrHisMetPheTyrGlnTyrAsnProValGlyThrAspTrpAspAspGlyMetGlu  
 TGGGCGCCAGCGCGTCTCTCGAACCTTGTCTCATGGCGACCGCTCTCTATCGCATGGTG  
 TrpGlyHisAlaValSerArgAsnLeuValGlnTrpArgThrLeuProIleAlaMetVal  
 GCGGACCACTGGTACGACATCTCTCGAGTCTCTCGCGCTCCATGACGGTCTACCCAAC  
 AlaAspGlnTrpTyrAspIleLeuGlyValLeuSerGlySerMetThrValLeuProAsn  
 GGGACGTCATCATGATCTACAGCGCGCGCCACCAACGCGCTCGCGCTGGAGGTCCAGTGC  
 GlyThrValIleMetIleTyrThrGlyAlaThrAsnAlaSerAlaValGluValGlnCys  
 ATCGCCACCGCGCGCGCGCCACCAACGCGCTCTCTCGCGCTGGAGGTCCAGTGC  
 IleAlaThrProAlaAspProAsnAspProLeuLeuArgArgTrpThrLysHisProAla  
 AAGCCGCTCATCTGCTCGCGCGCGGTGGGCGACCAAGGATTCGAGGACCGCATGAC  
 AsnProValIleTrpSerProProGlyValGlyThrLysAspPheArgAspProMetThr  
 GCTGCTACGACGATCTCGACGAGACATGGCGCACCTCTCTCGCGTCCAGGACGACAC  
 AlaTrpTyrAspGluSerAspGluThrTrpArgThrLeuLeuGlySerLysAspAspHis  
 GACGGCCACCAACGCGCATCGCCATGATGTACAAGACCAAGGACTTCTCACTACGAG  
 AspGlyHisHisAspGlyIleAlaMetMetTyrLysThrLysAspPheLeuAsnTyrGlu  
 CTCATCGCGCGCATCTTGCACCGCGGTGGTGGCGACCGCGAGTGGAGTGCATCGACTTC  
 LeuIleProGlyIleLeuHisArgValValArgThrGlyGluTrpGluCysIleAspPhe  
 TACCCGCTCGCGCGGAGAGCAGCGCACTCTGTCGAGATGCTGACGTTTGAAGCG  
 TyrProValGlyArgArgSerSerAspAsnSerSerGluMetLeuHisValLeuLysAla  
 ASCATGACGACGACGCGCACTACTACTCGCTGGGACGTACGACTCGCGCGCCAC  
 SerMetAspAspGluArgHisAspTyrTyrSerLeuGlyThrTyrAspSerAlaAlaAsn  
 AGGTGGACCGCCATCGACCGGAGCTCGACTTGGGATCGCGCTGAGATACGACTGGGA  
 ThrTrpThrProIleAspProGluLeuAspLeuGlyIleGlyLeuArgTyrAspTrpGly  
  
 AAGTTTATGCGTCCACCTCTTCTATGATCCGCGCAAGAACCGCGCGTCTCATGGG  
 LysPheTyrAlaSerThrSerPheTyrAspProAlaLysAsnArgArgValLeuMetGly  
 TACGTCGCGGAGTGCAGCTCCAAGCGCGCTGATGTCGTCAAGGATCGGCTTCCATTCA  
 TyrValGlyGluValAspSerLysArgAlaAspValValLysGlyTrpAlaSerIleGln  
 TCACTTCTAGGACGCGTGGCTCTGGATGAGAGACCGCGACGAACTCTCTGCTGGCCC  
 SerValProArgThrValAlaLeuAspGluLysThrArgThrAsnLeuLeuTrpPro  
 GTTGAGGAGATCGAGACCTCTCGCGCTCAATGCCACGGAAGTACCGACGTTACCATTAAC

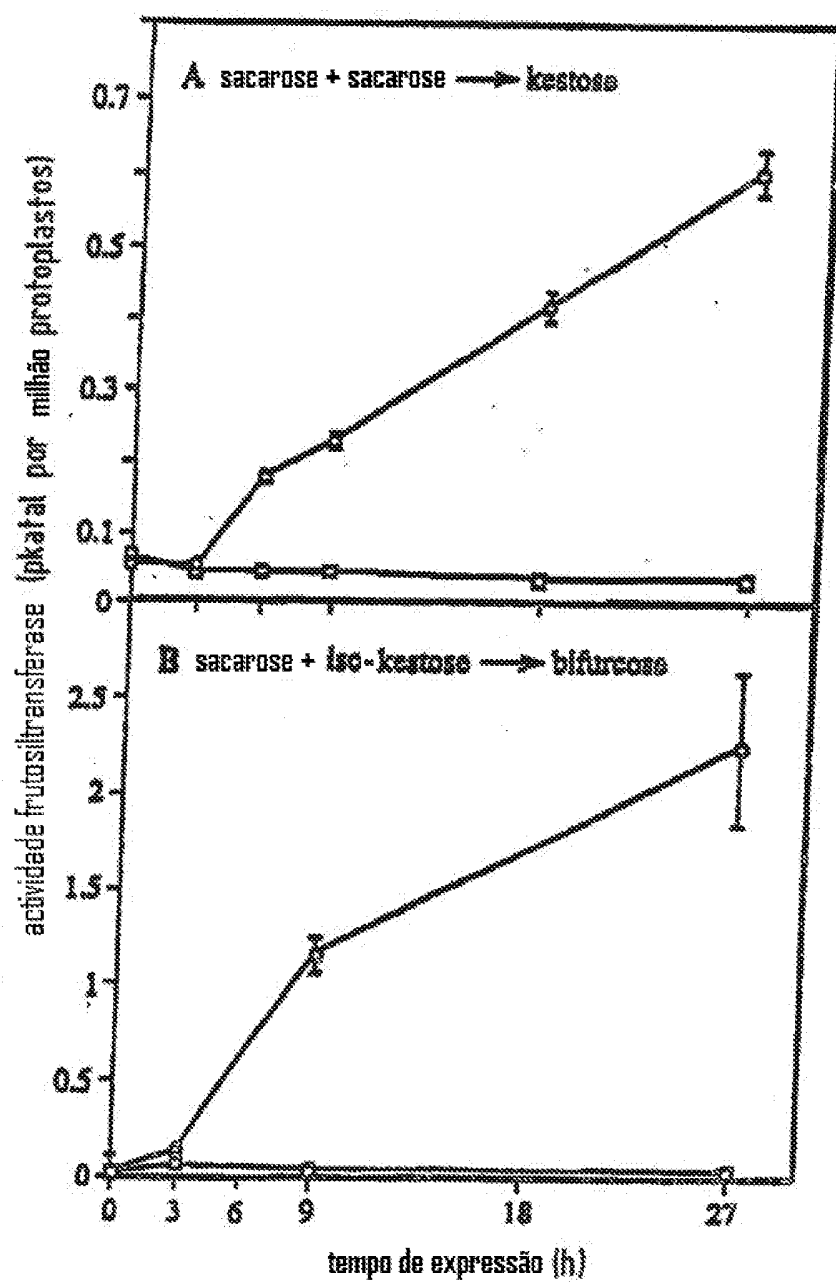
FIG.4

ValGluGluIleGluThrLeuArgLeuAsnAlaThrGluLeuThrAspValThrIleAsn  
 ACTGGCTCCGTCATCCATATCCCGCTCCGCCAAGGCACTCACGCTCGACATCGCGAGGCT  
 ThrGlySerValIleHisIleProLeuArgGlnGlyThrHisAlaArgHisAlaGluAla  
 TCTTTCCACCTTGATGCTTCCGCCCTGCTGCTCCCTCAACGAGGCCGATGTGGCTACAA  
 SerPheHisLeuAspAlaSerAlaValAlaAlaLeuAsnGluAlaAspValGlyTyrAsn  
 TGCACTAGCAGCGCGCGCTGTTAACCGCGCGCGCTAGCGCGCTTCCGCTCTCTCTC  
 CysSerSerSerGlyGlyAlaValAsnArgGlyAlaLeuGlyProPheGlyLeuLeuVal  
 CTCGCGCGCGCTGACCGCGCTGCGCGCGCAACCGCGCTCTACTTCTACGTGTCTAGGGC  
 LeuAlaAlaGlyAspArgArgGlyGluGlnThrAlaValTyrPheTyrValSerArgGly  
 CTTGACGAGCGCTCCACACCGCTTCTGCCAAGATGAGCTGAGATCGTCACGAGCGCAAG  
 LeuAspGlyGlyLeuHisThrSerPheCysGlnAspGluLeuArgSerSerArgAlaLys  
 GATGTGACCAAGCGTGTCTATCGGAGCAGCGCTGCGCGCTCTCGACGCTGAGGCTTTGTCA  
 AspValThrLysArgValIleGlySerThrValProValLeuAspGlyGluAlaLeuSer  
 ATGAGGCTGCTCGTGCATCACTCCATCGTGCAGGCTTCCGACATGCGCGCGAGGAGCAGC  
 MetArgValLeuValAspHisSerIleValGlnGlyPheAspMetGlyGlyArgThrThr  
 ATGACCTCGCGCTGTACCGATGAGTCTGTATCAGGAGGCAAGAGTCTACTTGTTCAC  
 MetThrSerArgValTyrProMetGlnSerTyrGlnGluAlaArgValTyrLeuPheAsn  
 AACGCCACCGCTGACCGCTGACCGCGCAAGGCTGCTGCTGACAGATGAGTCTCGCA  
 AsnAlaThrGlyAlaSerValThrAlaGluArgLeuValValHisGluMetAspSerAla  
 CACAACCGCTCTTCCAATGAGGAGCTGCGCATGTATCTTCATCAAGTCTTGAATCTCT  
 HisAsnGlnLeuSerAsnGluAspAspGlyMetTyrLeuHisGlnValLeuGluSerArg  
 CATTAATAAGCTACATTGATCAAGAGAGATCACCAGCGAAGGCGCAATTCATACATAAT  
 His  
 CGAATCATTTCTGCAACCTCGCTTGCAGCATGCATTGAAACATCTGTATTTGATCATC  
 TTCTTCATTTATGTATAGTGAATATATTACTTTGTAAAAA

FIG. 4 (CONTINUAÇÃO)



FIG. 6

FIG. 7

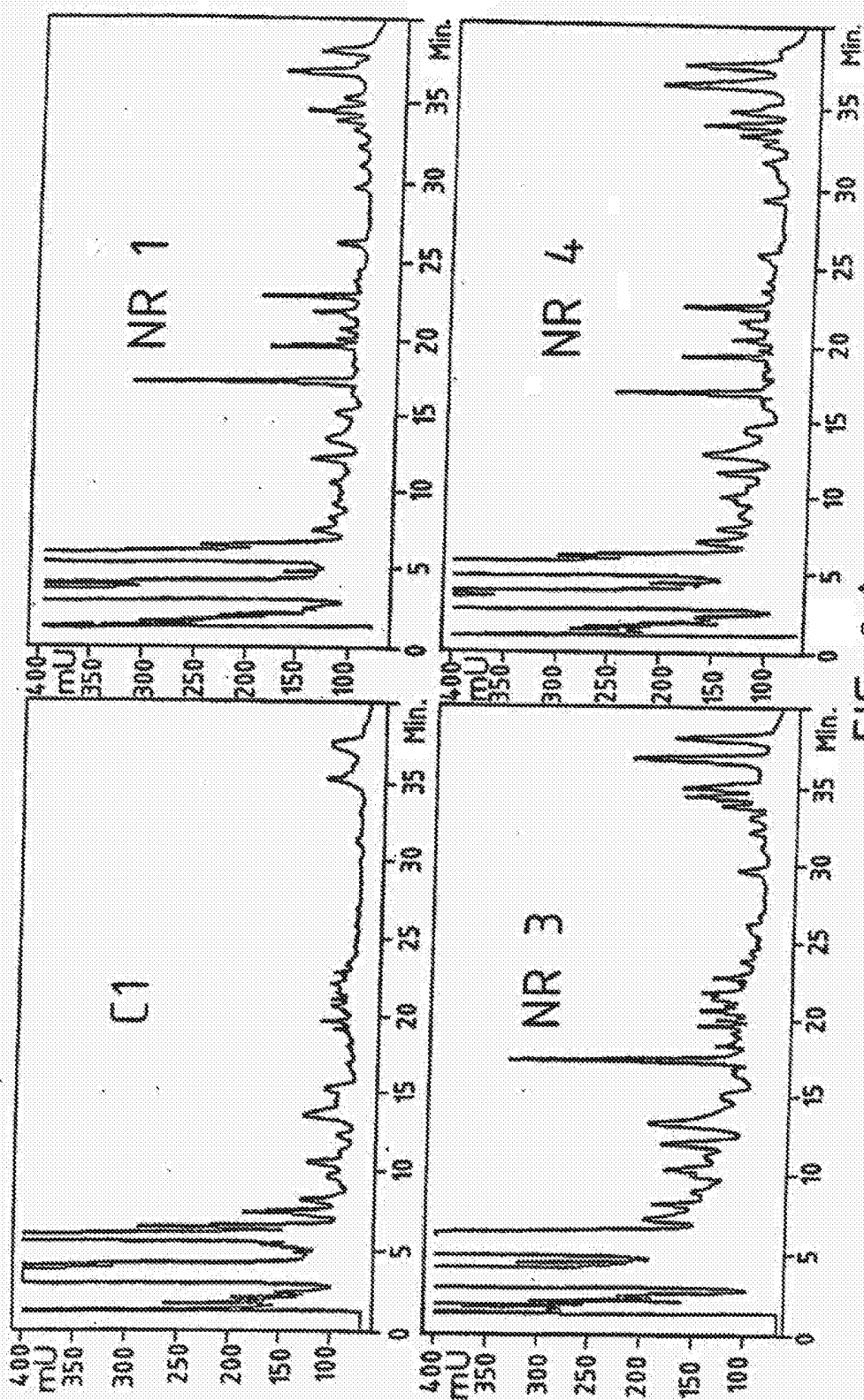


FIG. 8A

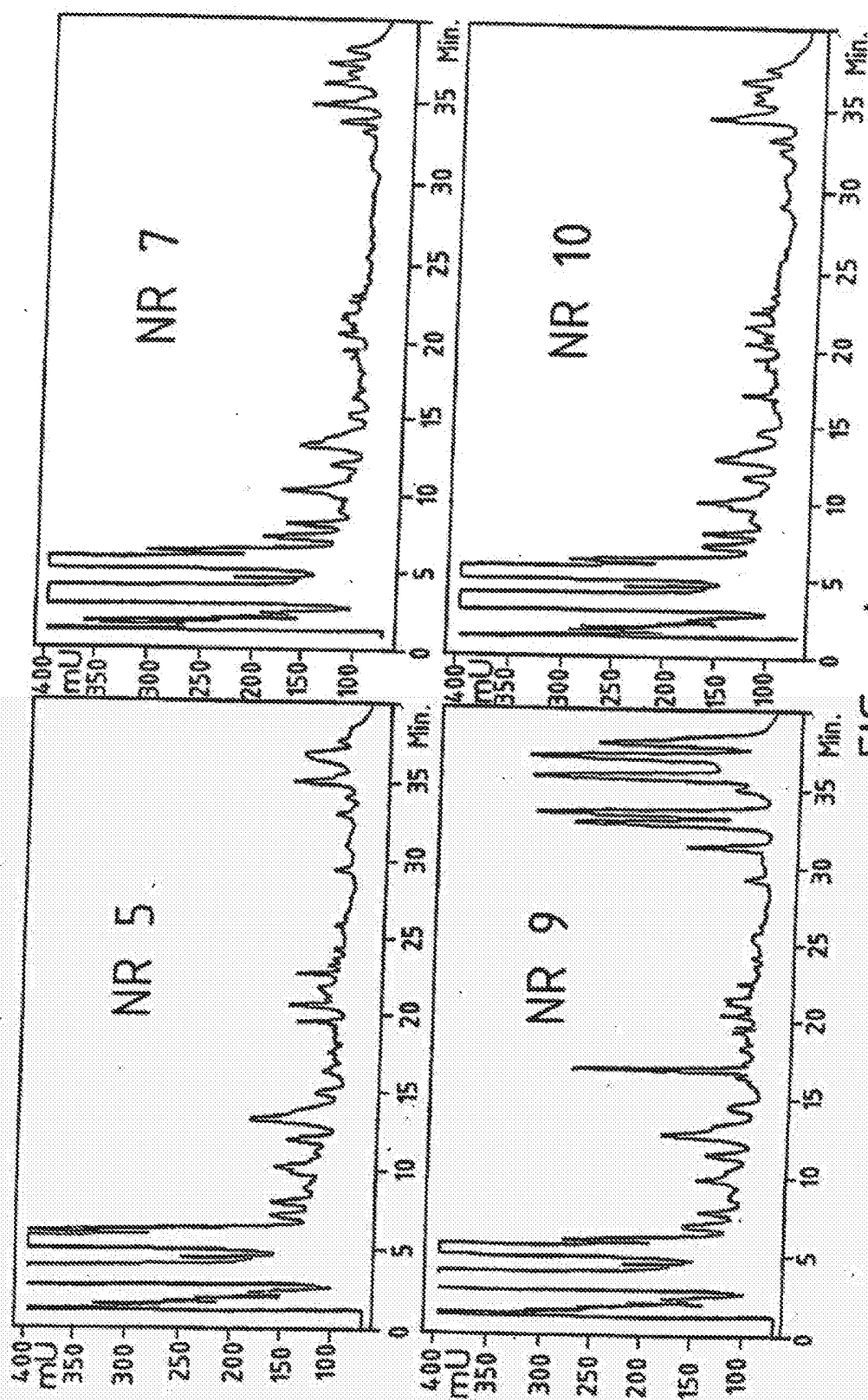


FIG. 8 A (CONTINUAÇÃO)

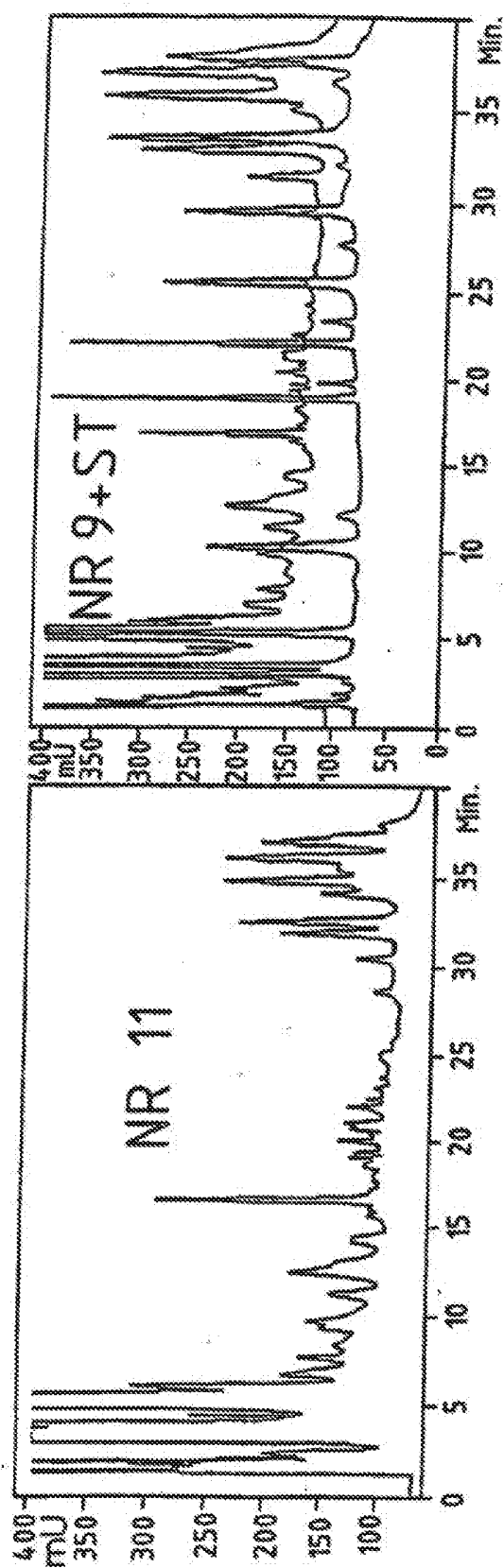


**FIG. 8A** (CONTINUAÇÃO)

