



**República Federativa do Brasil**  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 9917852-4 B1**

**(22) Data do Depósito:** 27/08/1999

**(45) Data de Concessão:** 06/02/2018



---

**(54) Título:** MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLÉICO CODIFICADORA DE FRUTOSILTRANSFERASE, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, PRODUTO ALIMENTÍCIO, OLIGONUCLEOTÍDEO, PROCESSO PARA PRODUZIR PLANTA, PREPARAR CÉLULA HOSPEDEIRA, PREPARAR FRUTOSILTRANSFERASE, PREPARAR POLIFRUTOSE, OU PREPARAR AGENTES TENSOATIVOS, E EMPREGO DE CÉLULA HOSPEDEIRA, FRUTOSILTRANSFERASE OU POLIFRUTOSE

**(51) Int.Cl.:** C12N 15/52; C12N 9/10; C12N 15/31; C12N 5/10; C12N 15/82; C12P 19/18

**(30) Prioridade Unionista:** 02/09/1998 DE 198 40 028.4

**(73) Titular(es):** MAX-PLANCK-GESSELLSCHAFT ZUR FOERDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E. V.

**(72) Inventor(es):** ARND G. HEYER; JOCHEN REHM; REGINA WENDENBURG

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLÉICO CODIFICADORA DE FRUTOSILTRANSFERASE, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, PRODUTO ALIMENTÍCIO, OLIGONUCLEOTÍDEO, PROCESSO PARA PRODUZIR PLANTA, PREPARAR CÉLULA HOSPEDEIRA, PREPARAR FRUTOSILTRANSFERASE, PREPARAR POLIFRUTOSE, OU PREPARAR AGENTES TENSOATIVOS, E EMPREGO DE CÉLULA HOSPEDEIRA, FRUTOSILTRANSFERASE OU POLIFRUTOSE"**.

Dividido do PI9913390-3, depositado em 27.08.1999.

10 A presente invenção refere-se a moléculas de ácido nucléico codificantes de polipeptídeos contendo a atividade enzimática de uma frutossiltransferase. A invenção além disso refere-se a vetores e a hospedeiros contendo tais moléculas de ácido nucléico. A presente invenção também refere-se a processos para a preparação de frutossiltransferase e à prepara-

15 ção de polifrutoses do tipo inulina nos vários organismos hospedeiros ou in vitro, bem como a frutossiltransferase codificada pelas moléculas de ácido nucléico descritas que podem ser usadas para preparar polifrutoses do tipo inulina.

Polímeros lineares solúveis em água, podem ser empregados para vários usos, por exemplo para aumentar a viscosidade de sistemas a-

20 quosos, como detergentes, como agentes de suspensão ou para aceleração de sedimentação e complexação, mas também para ligar água. Polímeros baseados em sacarídeos, por exemplo polissacarídeos frutosil, são materiais de partida particularmente interessantes já que eles são biodegradáveis.

25 Além do seu uso como matérias-primas renováveis na produção industrial e fabricação, polímeros de frutosil são atraentes como aditivos alimentícios, por exemplo como adoçantes. Polímeros de vários comprimentos de cadeia são requisitados para as várias aplicações. Enquanto para o setor alimentício, são preferidos polímeros de comprimento de cadeia curto ou

30 médio, aplicações técnicas, por exemplo a preparação de agentes tensoativos, requerem polímeros com um alto grau de polimerização (DP).

Vários processos foram descritos para a preparação de polissa-

Segue-se folha 1a

carídeos frutano em plantas expressando frutossiltransferases de origem bacteriana, ou para a preparação de polifrutoses de comprimento de cadeia médio expressando frutossiltransferases de origem vegetal. O PCT/US 89/02729, por exemplo, descreve a possibilidade de gerar polímeros carboidrato, particularmente dextrano ou polifrutose, em plantas transgênicas, a

saber especificamente nos frutos de plantas transgênicas. Para gerar plantas que são modificadas desta maneira, é proposto usar sacarose de microorganismos, particularmente de *Aerobacter levanicum*, *Streptococcus salivarius* e *Bacillus subtilis*, ou de dextrano sucrares de *Leuconostoc mesenteroides*. Nem a geração da enzima ativa, nem aquela de levano ou dextrana é descrita, nem a preparação de plantas transgênicas.

O PCT/EP 93/02110 divulga um processo para a preparação de plantas transgênicas que expressa o gene *lsc* da sucrose de levano da bactéria gram-negativa *Erwinia amylovora*. As plantas produzem um levano de alto peso molecular, altamente ramificado. O PCT/NL 93/00279 descreve a transformação de plantas com genes quiméricos que contêm o gene *sacB* do *Bacillus subtilis*. Tais plantas produzem um levano ramificado. As frutossiltransferases bacterianas usadas nos PCT/US 89/ 02729, PCT/EP 93/02110 e PCT/NL 93/00279 sintetizam levano, um  $\beta$ -2,6 polímero frutossil ligado que tem numerosas ramificações  $\beta$ -2,1. Devido às numerosas ramificações, entretanto, levano envolve desvantagens decisivas para o processamento técnico e é portanto muito menos demandado como material de partida técnico do que inulina que mostra ligações  $\beta$ -2,1. No momento, somente um gene bacteriano é conhecido, o gene produto que está envolvido na síntese de inulina, esse gene sendo o gene *fff* do *Streptococcus mutans*. A PCT/NL93/00279 descreve a transformação de plantas com o referido gene, que sintetiza inulina de alto peso molecular, mas em uma escala tão baixa que ela não pode ser economicamente utilizada. O PCT/EP97/02195, também, descreve um processo para a preparação de plantas transgênicas, que produzem inulina com o gene *fff* do *Streptococcus mutans*. Como com as plantas descritas no PCT/NL93/00279, o rendimento de inulina de alto peso molecular é baixo. Embora seja possível expressar o gene em plantas, se o gene foi geneticamente engenheirado anteriormente, o rendimento em inulina que pode ser obtido de plantas transgênicas é tão baixo que as plantas transgênicas não podem ser economicamente utilizadas. Além disso, PCT/NL 96/00012 divulga seqüências de DNA que codificam enzimas sintetizadoras de polímeros de carboidrato, bem como a preparação de plantas

transgênicas usando as referidas seqüências de DNA. As seqüências divulgadas originam-se de *Helianthus tuberosus*. De acordo com PCT/NL 96/00012 as seqüências divulgadas podem ser usadas para modificar o perfil de frutano de petunia e batata, mas também do próprio *Helianthus tuberosus*. Expressão das seqüências divulgadas que codificam uma sacarose frutossiltransferase (SST) dependente de sacarose ou uma frutano frutossiltransferase em plantas transgênicas permite a produção de inulina. O grau de polimerização médio de inulina é, entretanto, DP = 6 a DP = 10. Com um tal grau de polimerização a inulina não pode ser considerada de cadeia longa. O processo descrito em PCT/NL96/00012 não permite produzir inulina de alto peso molecular. Recentemente, Rehm e outros (*J. Bacteriology* 180 (1998), 1305-1310) reportou a geração de oligossacarídeos em levedo por introdução de um SST de *Aspergillus Foetidus*. Entretanto, o grau de polimerização do produto obtido foi de somente DP=3.

A DE 197 08 774.4 refere-se à preparação de 1-kestose e nystose usando-se enzimas contendo atividade frutossil polimerase. Os trissacarídeos e tetrassacarídeos podem ser preparados em plantas transgênicas. O rendimento é alto e na batata corresponde ao teor celular de sacarose. Entretanto, a preparação de inulina de cadeia longa não é descrita. A síntese de polifrutoses por fungos também é discutida em muitas publicações. Barthomeuf e Pourrat (*Biotechnology Letters* 17 (1995), 911-916), descreve, por exemplo a preparação de uma enzima de *Penicillium rugulosum* que tem atividade frutossiltransferase. A preparação exhibe várias propriedades enzimáticas e portanto não representa uma frutossiltransferase pura. Seqüências de DNA do gene da frutossiltransferase não são conhecidas. Cairns e outros (*New Phytologist* 129 (1995), 299-308) descreve uma síntese transiente de trissacarídeos, tetrassacarídeos e pentassacarídeos de sacarose no meio de cultura de *Monographella nivalis*. A atividade enzimática subjacente parece ser de natureza principalmente hidrolítica, já que as polifrutoses são degradadas novamente pela enzima com exaustão crescente do substrato. Já que nenhuma seqüência de DNA é conhecida não é possível avaliar - confiando na homologia com frutofuranosidases (invertases) como referência - se está

presente uma frutossiltransferase no sentido próprio ou uma invertase.

Foi mostrado para o fungo *Aspergillus sydowi* IAM 2544 que ele era capaz de gerar polifrutoses do tipo inulina. Harada e outros (em: Nishinari e Doi (Eds.), *Hidrocolóides de Alimentos: Estruturas, Propriedades e Funções*, Plenum, Nova Iorque (1994), 77-82) descreve, por exemplo a síntese de inulina com conidia de *Aspergillus sydowi*. 125 g de conidia foram incubadas em 25 l de solução 20% de sacarose. O produto gerado foi purificado por HPLC. Entretanto, um tal processo não se presta para uma produção de inulina em grande escala. Maramatsu e outros. (*Agric. Biol. Chem.* 52 (1988), 1303-1304) descreve a produção de frutooligossacarídeos com micélio da mesma classe fungal (*A. sydowi* IAM 2544). O grau de polimerização é reportado como sendo 3 até 13. As enzimas envolvidas neste processo não foram, ou foram somente parcialmente, purificadas. Seqüências de aminoácidos ou seqüências de DNA dos genes correspondentes não são conhecidas. Instruções para a purificação das proteínas não são dadas ou somente são dadas incompletamente.

O problema subjacente da presente invenção é portanto o de fornecer moléculas de ácido nucléico e processos permitindo preparar organismos geneticamente modificados por engenharia genética que são capazes de gerar polifrutoses do tipo inulina.

Este problema é solucionado fornecendo-se os modos de realização como definidos nas reivindicações.

A invenção portanto refere-se a moléculas de ácido nucléico codificando uma frutossiltransferase, selecionada do grupo consistindo de

- (a) moléculas de ácido nucléico codificando uma proteína compreendendo a seqüência de aminoácido indicada na SEQ ID N° 2;
- (b) moléculas de ácido nucléico compreendendo a seqüência de nucleotídeo da região codificadora indicada na SEQ ID N° 1 ou uma seqüência de ribonucleotídeos correspondente;
- (c) moléculas de ácido nucléico hibridizando a uma classe complementar às moléculas de ácido nucléico indicadas em (a) ou (b); e
- (d) moléculas de ácido nucléico da seqüência de nucleotídeo que

se desviam da seqüência de moléculas de ácido nucléico mencionadas em (c) devido à degeneração do código genético;

bem como moléculas de ácido nucléico que são complementares a elas.

5 A seqüência mostrada na Seq ID Nº 1 codifica uma frutan fructosiltransferase dependente de frutose de *Aspergillus sydowi* que leva, em células de plantas, à síntese de polifrutano de cadeia longa do tipo inulina. Verificou-se surpreendentemente que é possível preparar polifrutanas de cadeia longa do tipo inulina em altos rendimentos em organismos hospedeiros, especificamente em plantas transgênicas, bactérias ou fungos quando se usam  
10 as referidas seqüências.

Dentro do âmbito da presente invenção foram elaboradas instruções para a purificação da enzima de *Aspergillus sydowi*. A enzima foi purificada até a homogeneidade de modo a ser capaz de detectar seqüências de amino ácidos. Foram detectados iniciadores obtidos à base da informação  
15 de seqüência, para uma reação em cadeia de polimerase. Fragmentos de genes foram amplificados com o auxílio desses iniciadores que foram usados para varredura de bibliotecas de cDNA. Muitas moléculas de cDNA com homologia de seqüência para os produtos PCR foram preparadas e comparadas. A maioria das moléculas de cDNA obtidas tinha inserções do mesmo  
20 tamanho. A completeza das moléculas de cDNA foi confirmada com a expressão funcional das seqüências de DNA em *Saccharomyces* ou em batata.

A purificação das enzimas, o desenho dos iniciadores para PCR, a identificação de moléculas de cDNA e a expressão heteróloga são descritos nos exemplos. A seqüência de DNA isolada e sua seqüência de proteína derivável são mostradas da Seq ID Nº 1 e 2, respectivamente. A seqüência de DNA de acordo com a invenção é a primeira a codificar a frutano frutosiltransferase dependente de sacarose a partir de fungos. A seqüência de DNA  
30 e a seqüência de proteína codificada por ela diferem amplamente das seqüências de DNA codificando as já conhecidas frutosiltransferases. Por exemplo, há somente uma identidade 22,6% e 39% com a frutosiltransferase

de *Aspergillus naeslundii* lev j na proteína e nível de DNA respectivamente. Enquanto há uma identidade 64 e 60,6 na proteína e nível de DNA, respectivamente, com um gene invertase de *Aspergillus niger*, a proteína codificada pelo respectivo gene tem uma atividade enzimática completamente diferente. Isto vai mostrar que as moléculas de ácido nucléico e as frutossiltransferases codificadas por elas são moléculas que não foram até então descritas.

No contexto da presente invenção, uma frutossiltransferase é compreendida como sendo uma proteína que é capaz de catalisar a ligação  $\beta$ -2,1-glicosídica e/ou  $\beta$ -2,6-glicosídica entre unidades de frutose. O resíduo de frutose a ser transferido se origina de sacarose.

A reação catalisada por uma frutano frutossiltransferase dependente de sacarose de acordo com a invenção pode ser como se segue:



Neste esquema G = glicose, F = frutose e G-F = sacarose. Por exemplo, a enzima transfere resíduos de frutose de seucrose a um polifrutano que é formado partindo de uma molécula de sacarose por ligações  $\beta$ -2,1-glicosídicas, nas quais ligações  $\beta$ -2,6-glicosídicas também podem ocorrer.

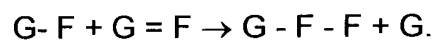
Um polipeptídeo codificado por uma molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção com a atividade de uma frutossiltransferase leva à síntese de polifrutose, e particularmente em células vegetais à síntese de polifrutose do tipo inulina (aqui posteriormente também referida como inulina).

No contexto da presente invenção, polifrutose é compreendida como sendo um polifrutano com um grau de polimerização  $\text{DP} \geq 4$ , de preferência  $\text{DP} \geq 6$ , e especificamente  $\text{DP} \geq 8$ . "Polifrutose do tipo inulina" ou "inulina" é pretendido para se referir a um polímero de frutano de cadeia longa, cujas moléculas são principalmente  $\beta$ -2,1-glicosidicamente ligadas e opcionalmente também têm ramificações  $\beta$ -2,6-glicosídicas. O termo "de cadeia longa" significa que o grau de polimerização (DP) é maior do que 20, de preferência maior do que 50, de preferência mais do que 100 e mais preferentemente mais do que 200. O polímero de frutose pode comportar um resíduo glicose terminal que é ligado via o grupo C-1 OH da glicose e o grupo C-

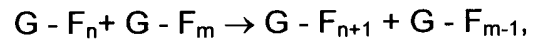
2 OH de um resíduo de frutose. Neste caso, uma molécula de sacarose está contida no polímero de frutose.

Quando a enzima é usada in vitro para a síntese de polifrutano, um produto oligomérico é obtido (DP = 4 a 10).

5 A enzima codificada pelas moléculas de ácido nucléico de acordo com a invenção pode ser particularmente diferenciada de frutotransferases conhecidas devido à reação catalisada. Por exemplo, a planta conhecida SSTs catalisa a reação:

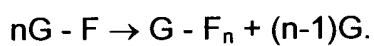


10 As frutotransferases dependentes de frutano de plantas, entretanto, catalizam a reação:



esta reação sendo completamente reversível.

Frutotransferases bacterianas, por exemplo, aquela codificada pelo gene sacB do Bacillus subtilis, também catalisa a reação do tipo



15 Entretanto, essas enzimas produzem levano, isto é, um polifrutano ligado β-2,6-glicosidicamente com ramificação β-2,1.

20 Enquanto a proteína (um FTF) codificado pelo gene fff de Streptococcus mutans induz a síntese de inulina com um peso molecular de muitos milhões de Daltons. Entretanto, o gene fff ou a proteína codificada não exibe uma homologia apreciável para a seqüência de ácido nucléico descrita na SEQ ID Nº 1 (somente 37,3%) ou a seqüência de amino ácido descrita na SEQ ID Nº 2 (somente 22,6%).

25 No contexto da presente invenção o termo "hibridização" significa hibridização sob condições convencionais de hibridização, de preferência sob condições rigorosas, tais como descrito em Sambrook e outros, Clonagem Molecular, Um Manual de Laboratório, 2ª edição (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque. Um exemplo de condições de hibridização rigorosas é a hibridização em 50% de formamida, 5 x SSC, 5 x solução de Denhardt, 40 mM de fosfato de sódio pH 6,8; 0,5%  
30 (peso/vol.) BSA, 1% (peso/vol) SDS, 0,1 mg/ml DNA de esperma de arenque

a uma temperatura de hibridização de 42°C e subseqüentemente lavando os filtros em 0,5 x SSC/0,5% SDS a 60°C.

Um exemplo de condições de hibridização não-rigorosas convencionais é a hibridização sob as condições mencionadas acima com a exceção de que 30% de formamida são usadas ao invés de 50% e os filtros são subseqüentemente lavados em 2 x SSC/0,5% de SDS a 56°C. Moléculas de ácido nucléico hibridizando para as moléculas de acordo com a invenção podem ser isoladas de, por exemplo bibliotecas genômicas ou cDNA que são de preferência preparadas de fungos. Tais moléculas de ácido nucléico podem ser identificadas e isoladas usando-se as moléculas, de acordo com a invenção ou fragmentos dessas moléculas ou os complementos reversos dessas moléculas, por exemplo hibridização de acordo com os processos padrão (ver, por exemplo Sambrook e outros, Clonagem molecular, Um manual de Laboratório, 2ª edição (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NI). Moléculas de ácido nucléico podem ser usadas como amostras de hibridização que exibem exatamente ou substancialmente a mesma seqüência de nucleotídeo descrita na SEQ ID Nº 1 ou fragmentos dessa seqüência. Os fragmentos usados como amostra de hibridização podem também ser fragmentos sintéticos que foram preparados usando-se técnicas convencionais de síntese e a seqüência é substancialmente idêntica à seqüência de uma molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção.

As moléculas hibridizando para as moléculas de ácido nucléico de acordo com a invenção também compreendem fragmentos, derivados e variantes alélicas das moléculas de ácido nucléico descritas acima que codificam uma proteína de acordo com a invenção. "Fragmentos" são compreendidos como partes das moléculas de ácido nucléico que são longas o suficiente para codificar uma proteína com atividade frutossiltransferase. O termo "derivado" conforme usado na presente invenção significa que as seqüências dessas moléculas diferem das seqüências das moléculas de ácido nucléico descritas acima em uma ou mais posições, mas exibem um elevado grau de homologia a essas seqüências. Homologia significa uma identidade

de seqüência de pelo menos 40%, particularmente uma identidade de pelo menos 60%, de preferência mais do que 80%, e até mais preferido mais do que 90%. As proteínas codificadas por essas moléculas de ácido nucléico de preferência têm uma identidade de seqüência para a seqüência de amino

5 ácidos indicada na SEQ ID No 2 de pelo menos 60%, de preferência de pelo menos 70%, particularmente pelo menos 80%, particularmente preferido de pelo menos 90%, e mais preferido de pelo menos 95%. Os desvios das moléculas de ácido nucléico descritas acima podem ser arquivados por, por exemplo, deleção, substituição, inserção e/ou recombinação. Moléculas de

10 ácido nucléico de acordo com a invenção podem ser outros derivados das seqüências de origem fungal. Uma derivatização das seqüências pode ser requisitada de modo a facilitar a expressão em certas células hospedeiras.

As moléculas de ácido nucléico que são homólogas às moléculas descritas acima e representam derivados das respectivas moléculas são

15 variações regulares dessas moléculas que representam modificações exercendo a mesma função biológica. Essas variações podem tanto ocorrer naturalmente, por exemplo seqüências de outras classes ou organismos, ou mutações. Essas mutações podem ter ocorrido naturalmente ou podem ter sido introduzidas por mutagêneses específica. Também, as variações podem ser seqüências preparadas sinteticamente. As variantes alélicas podem

20 ser tanto variantes que ocorrem naturalmente ou são preparadas sinteticamente, ou geradas por técnicas de DNA recombinante.

As proteínas codificadas pelas várias variantes das moléculas de ácido nucléico de acordo com a invenção de preferência têm certas características em comum, tais como atividade enzimática, peso molecular, reatividade imunológica ou conformação ou propriedades físicas como a mobilidade eletroforética em eletroforeses em gel, comportamento cromatográfico, coeficiente de sedimentação, solubilidade, propriedades espectroscópicas, estabilidade, ótimo de pH ou ótimo de temperatura.

25

Em um modo de execução preferido, as moléculas de ácido nucléico de acordo com a invenção codificam um polipeptídio contendo as propriedades de uma frutossiltransferase fungal, particularmente preferida de

30

Aspergillus, e mais preferido de uma frutossiltransferase de *Aspergillus sydowi*.

As moléculas de ácido nucléico de acordo com a invenção tanto podem ser moléculas de DNA ou RNA. Exemplos de moléculas de DNA correspondentes são moléculas de DNA genômicos ou cDNA. As moléculas de ácido nucléico de acordo com a invenção podem ser isoladas de fontes naturais, por exemplo de fungos, particularmente *Aspergillus* e de preferência de *Aspergillus sydowi*, ou elas podem ser sintetizadas de acordo com processos conhecidos. Também é possível introduzir várias mutações nas moléculas de ácido nucléico de acordo com a invenção por meio de técnicas convencionais de biologia molecular (ver, por exemplo Sambrook e outros, Clonagem Molecular, Um manual de laboratório, 2ª edição (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Uma tal introdução induz a síntese de proteínas com propriedades biológicas potencialmente modificadas. Uma abordagem é a de gerar mutantes de deleção nos quais moléculas de ácido nucléico são geradas por deleções progressivas da extremidade 5' ou da 3' extremidade da seqüência de DNA codificador que leva à síntese de proteínas correspondentemente truncadas. Uma outra abordagem é a de especificamente preparar enzimas que estão localizadas em diversos compartimentos devido à adição de seqüências de sinal. Para adquirir uma localização das proteínas de acordo com a invenção no citosol, nenhuma seqüência de sinais foi adicionada à seqüência indicada na SEQ ID N° 2.

Por outro lado, mutações de ponto poderiam também ser introduzidas em posições onde a modificação de seqüência de amino ácido influencia, por exemplo, a atividade enzimática ou a regulação da enzima. Desta forma, por exemplo mutantes com um valor K modificado podem ser preparados, ou mutantes que não são mais submetidos a mecanismos de regulação em regulação alostéricas ou modificação covalente usualmente ocorrendo em células.

Ademais, mutantes com um substrato modificado ou especificidade de produto podem ser preparados. Além disso, mutantes com um perfil

de atividade-temperatura modificado podem ser preparados.

Para a manipulação genética em células procarióticas, as moléculas de ácido nucléico da invenção ou fragmentos dessas moléculas, podem ser integradas em plasmidas que permitem uma mutagênese ou uma  
5 modificação de seqüência por recombinação de seqüências de DNA. Por meio de processos padrão (cf. Sambrook e outros, clonagem Molecular, Um Manual de Laboratório, 2ª edição (1989) /Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Iorque) de trocas de bases podem ser execu-  
10 tadas, ou seqüências naturais ou sintéticas podem ser adicionadas. Para ligar fragmentos de DNA, adaptadores ou ligantes podem ser ligados aos fragmentos. Ademais, pode ser feito uso de manipulações que oferecem locais de restrição apropriados ou que removem DNA supérfluo ou locais de restrição. Onde inserções, deleções ou substituições possam ser úteis, podem ser usados mutagênese in vitro, "iniciador repair", restrição ou ligação.  
15 Para análise, uso é geralmente feito de uma análise de seqüência, uma análise de restrição ou ainda processos bioquímico-molecular biológicos.

Além disso, a invenção refere-se a vetores que contêm as moléculas de ácido nucléico de acordo com a invenção. De preferência, esses vetores são plasmídeos, cosmídios, vírus, bacteriófagos e outros vetores  
20 comuns na engenharia genética.

De preferência, a molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção é operacionalmente ligada ao vetor de acordo com a invenção com elementos regulatórios que permitem transcrição e síntese de um RNA traduzível em células procarióticas e/ou eucarióticas. Por exemplo um vetor de  
25 acordo com a invenção contém os seguintes elementos:

1. Um promotor garantindo a transcrição de regiões codificadoras fluxo abaixo em células do organismo hospedeiro e opcionalmente elementos ressaltadores.
2. Uma região codificadora fundida ao promotor que contém pelo  
30 menos um quadro de leitura aberto para a tradução de um polipeptídio. Na presente invenção, a região codificadora é uma molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção.

3. Seqüências opcionalmente adicionais fundidas à região codificadora, por exemplo sinais de transcrição de terminação, se esses são requisitados para uma expressão genética de sucesso em um certo organismo hospedeiro, ou seqüências de sinal influenciando a localização subcelular do produto gene ou induzindo a secreção de proteína.

Um tal vetor pode conter genes adicionais, tais como um gene marcador permitindo seleção dos vetores em uma célula hospedeira apropriada e sob condições apropriadas. Expressão da molécula de ácido nucléico em um mRNA transladável. Elementos regulatórios permitindo a expressão da molécula de ácido nucléico em células procarióticas e eucarióticas são conhecidas pelas pessoas versadas na técnica. Elementos regulatórios possíveis que são apropriados para a expressão da molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção em células hospedeiras procarióticas incluem, por exemplo, um promotor  $P_L$ , lac, trp, ou tac em E. Coli. É particularmente preferido usar o promotor lac Z que é induzível em E. Coli IPTG. Exemplos de elementos regulatórios permitindo a expressão em células hospedeiras eucarióticas são o promotor AOX1 e o promotor GAL 1 em levedo ou o promotor CMV, SV40, promotor RSV, promotor CMV, aumentador SV40 ou uma globina íntron em células mamárias ou células de outros animais. Para a expressão em levedo, é usado de preferência o promotor do gene álcool desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* que é altamente ativo em levedo. Outros sistemas de vetores apropriados foram descritos na técnica anterior, por exemplo em Sambrook, Clonagem Molecular, Um Manual de Laboratório (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Iorque, e em Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology (1989), Green Publishing Associates e Wiley Interscience, Nova Iorque.

Elemento regulatório para a expressão da molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção em células de plantas é em princípio qualquer promotor, aumentador, terminador, etc que é ativo em células de plantas. O promotor pode ser selecionado de uma tal maneira que a expressão tem lugar constitutivamente ou em um certo tecido, a um certo ponto no tempo do desenvolvimento da planta ou a um ponto de tempo determinado

por circunstâncias externas. Com respeito ao promotor de planta pode ser homólogo ou heterólogo.

Promotores apropriados para uma expressão constitutiva são, por exemplo, o promotor de RNA 35S do Virus Cauliflower Mosaic (ver por exemplo US 5 352 605) e o promotor de ubiquitin (ver por exemplo US 5 614 399) para uma expressão constitutiva, o promotor de gene patatin B33 (Rocha-Sosa, EMBO J. 8 (1989), 23-29) para uma expressão específica de tubérculo em batata, ou um promotor que assegura a expressão somente em tecidos fotossinteticamente ativos, por exemplo o promotor ST-LS1 (Stockhaus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus, EMBO J. 8 (1989), 2445-2451), o promotor Ca/b (ver, por exemplo, US 5 656 496, US 5 639 952, Bansal, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 3654-3658) e o promotor Rubisco SSU (ver, por exemplo US 5 034 322, US 4 962 028). Entretanto, também podem ser usados promotores que são ativados somente em um certo ponto no tempo determinado por circunstâncias externas (ver, por exemplo, WO 93/07279). Promotores de proteínas heat-shock permitindo uma indução simples podem ser de interesse específico. Também promotores específicos de semente, tais como o promotor USP de vicia faba, podem ser usados, os quais permitem uma expressão específica de semente em Vicia faba e outras plantas (Fiedler, Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679; Bäumllein, Mol. Gene. Genet. 225 (1991), 459-467). Além disso, promotores específicos de fruta podem ser usados tal como descrito em WO 91/01373. Para a expressão em fruta em tomate maduro, por exemplo, elementos cis-regulatórios de um promotor de poligalacturonase de tomate são apropriados, que são ativos no pericarpo externo ou interno (Nicholass e outros, Plant. Mol. Biol. 28 (1995), 423-435; Montgomery e outros, Plant Cell 5 (1993), 1049-1062). Outro promotor específico de fruta para tomate é descrito por Van Haaren e outros (Plant Mol. Biol. 21 (1993), 625-640).

Além disso, promotores para uma expressão endosperma específica podem ser usados, tais como o promotor de glutelina (Leisy, Plant Mol. Biol. 14 (1990), 41-50; Zheng, Plant J. 4 (1993), 357-366), o promotor HMG de trigo, o promotor USP, o promotor de faseolina ou promotores de genes

de zeína ou trigo (Pedersen, *Célula* 29 (1982), 1015- 1026; Quattrocchio, *Plant Mol. Biol.* 15 (1990), 81-93) ou o promotor de encolhimento shrunken-1 (sh-1) de trigo (Werr, *EMBO J.* 4 (1985), 1373-1380).

A expressão das moléculas de ácido nucléico de acordo com a  
5 invenção é particularmente vantajosa naquelas partes da planta que têm um  
teor de sacarose aumentado ou que armazenam sacarose. Tais órgãos são,  
por exemplo, a raiz da beterraba ou a haste da cana-de-açúcar e sorgo do-  
ce. São portanto particularmente preferidos promotores mediando a expres-  
são nesses órgãos, tais como o promotor de patatina B33 de *Solanum tube-*  
10 *rosu*m. Para a expressão específica na haste da cana-de-açúcar pode ser  
usado o promotor de ubiquitina em combinação com o primeiro íntron. Os  
vetores de acordo com a invenção podem também possuir unidades funcio-  
nais adicionais que efetuam uma estabilização do vetor em um organismo  
hospedeiro, tal como uma replicação de origem bacteriana ou o DNA de 2  
15 microns para a estabilização e replicação autônoma em levedo. Também  
podem estar contidas seqüências de "borda esquerda" e "borda direita" de  
T-DNA agrobacteriais, o que permite uma integração estável do genoma das  
plantas. Também pode estar presente uma seqüência de terminação que  
serve para terminar corretamente a transcrição ou adicionar uma cauda poli-  
20 A para o transcrito, que diz-se ter uma função na estabilização dos transcri-  
tos. Tais elementos são descritos na literatura (comparar com, por exemplo,  
Gielen, *EMBO J.* 8 (1989), 23-29) e são livremente permutáveis. Em um mo-  
do de realização preferido, a molécula de ácido nucléico contida no vetor de  
acordo com a invenção compreende uma região que contém uma seqüência  
25 de sinal funcional para a secreção da enzima codificada. Tais seqüências  
são conhecidas. Um exemplo de um peptídeo de sinal permitindo a localiza-  
ção da proteína no vacúolo é o peptídeo de sinal da carbóxipeptidase Y de  
levedo (CPY). O gene correspondente foi descrito por exemplo em Valls e  
outros (*Célula* 48, 887-899). Seqüências de sinal de planta são, por exem-  
30 plo, aquelas dos genes de lecitina de cevada (Raikhel e Lerner, *Dev. Genet.*  
12 (1991), 255-269) ou os 43 amino ácidos da região N-terminal da fitohe-  
maglutinina madura de feijões (Tague e outros, *Célula de Planta* 2 (1990),

533-546). Um exemplo de um peptídeo de sinal C-terminal é aquele da quitinase (Neuhaus e outros, *Planta J.* 5 (1994), 45-54).

Uma seqüência de sinal preferida é, por exemplo a seqüência de sinal do inibidor do gene de proteinase II da batata. Entretanto, qualquer outra seqüência de sinal levando a secreção de um polipeptídeo no hospedeiro  
5 tra seqüência de sinal escolhido pode ser usada. A frutossiltransferase secretada pode ser obtida do meio de cultura e usada para síntese in vitro.

Em um modo de realização particularmente preferido, a molécula de ácido nucléico contida no vetor contém uma região que codifica uma  
10 seqüência de sinal para a localização no vacúolo de células de planta, de preferência aquela do gene de patatina da batata (Sonnewald, *Planta J.* 1 (1998), 95-106). Isto permite a localização subcelular da frutossiltransferase nos vacúolos das células de planta e plantas geneticamente modificados por engenharia genética, por exemplo beterraba ou batata, e a acumulação de  
15 polifrutoses de alto peso molecular do tipo inulina nos vacúolos. Outras seqüências de sinal localizadas nos vacúolos foram descritas, por exemplo por Matusoaka (*Journal of Experimental Botany* 50 (1999), 165-174), Chrispeels (*Cell* 68 (1992), 613-616), Matsuoka (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991), 834-838), Bednarek (*Plant Cell* 3 (1991), 1195-1206), Nakamura (*Plant Phys.*  
20 101 (1993), 1-5).

Em um outro modo de realização da invenção, a molécula de ácido nucléico contida no vetor compreende uma região que codifica uma seqüência de sinal para a localização plastídica em células de plantas.

Como seqüência de sinal, por exemplo, pode ser usada a seqüência de sinal da ferredoxina: NADP(+) - oxidoreductase (FNR) de espinafre. A seqüência contém as regiões 5' não - transladadas bem como a seqüência de peptídeo de trânsito do flanco do cDNA da proteína plastídica ferredoxina: NADP(+)-oxidoreductase (FNR) de espinafre (nucleotídeo - 171 a +  
25 165; Jansen, *Current Genetics* 13 (1988), 517-522).

30 Também, o peptídeo de trânsito da proteína cerosa de milho mais os primeiros 34 amino-ácidos da proteína cerosa madura (Klösgen, *Mol. Gene. Genet.* 217 (1989), 155-161) podem ser usados como seqüência de si-

nal. Em um modo de realização preferido da invenção, o peptídeo de trânsito da proteína cerosa de milho é usado sem os primeiros 34 aminoácidos da proteína cerosa madura.

5 Em um modo de realização particularmente preferido, a invenção refere-se a plasmídeos pSK-as1 p112-as1, pA7-as1, p35-as1, p35-s3-as1, cuja construção é descrita nos exemplos (Fig. 1 até 5).

10 As moléculas de ácido nucléico e vetores de expressão de acordo com a invenção permitem a preparação de polifrutoses do tipo inulina nos vários organismos hospedeiros, particularmente em plantas, fungos e bactérias. As enzimas codificadas também podem ser usadas fora do organismo hospedeiro para a preparação de polifrutoses do tipo inulina. Isto é, é particularmente possível usar as moléculas de ácido nucléico de acordo com a invenção para a preparação das proteínas codificadas por elas em quaisquer células hospedeiras, para obter a proteína das células hospedeiras e/ou o  
15 meio de cultura e usá-lo para a síntese in vitro de inulina.

Por exemplo, uma construção que contenha o promotor de álcool desidrogenase e uma molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção pode ser usada para a transformação de *Saccharomyces cerevisiae*. Já que levedos não são capazes de absorver sacarose, células deveriam ser  
20 usadas que expressam um transportador de sacarose devido à introdução de uma seqüência de DNA heteróloga. A preparação de tais células foi descrita, por exemplo, em Riesmeier e outros (EMBO J. 11 (1992), 4705-4713). Levedos transformados com a construção acima descrita formam polifrutoses do tipo inulina de cadeia longa. Já que a frutossiltransferase de *Aspergillus sydowi* não possui um peptídeo de sinal, ela não é secretada. As polifrutoses de cadeia longa são portanto geradas nas células de levedo. Células de levedo contendo essas polifrutoses podem ser diretamente usadas como aditivos alimentares. Se as polifrutoses podem ser obtidas fermentativamente no meio de cultura, uma seqüência de sinal pode ser fundida a uma molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção, para secreção.  
25  
30

Em outro modo de realização, a invenção refere-se a células hospedeiras que transientemente ou estavelmente contêm as moléculas de

ácido nucléico ou vetores de acordo com a invenção ou que são derivadas de uma tal célula. O termo "célula hospedeira" refere-se a um organismo que é capaz de absorver DNA recombinado in vitro e opcionalmente sintetizar as proteínas codificadas pelas moléculas de ácido nucléico de acordo com a invenção. As células hospedeiras podem tanto ser de origem procariótica ou eucariótica. O termo "procariótico" inclui todas as bactérias que podem ser transformadas ou transfectadas com uma molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção e que vantajosamente permite a expressão de uma proteína contendo atividade frutossiltransferase. Células hospedeiras procarióticas incluem, por exemplo, ambas as bactérias gram-negativas e gram-positivas, tais como *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* e *Bacillus subtilis*. O termo "eucariótica" inclui células de inseto, células fungais, células de plantas, células animais e células humanas. Células fungais preferidas são por exemplo aquelas que são ou podem ser usadas para fermentação, particularmente *Saccharomyces*, particularmente preferidas *S. Cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* etc. De preferência, uma tal célula fungal é uma célula do gene *Aspergillus* e particularmente preferido da espécie *Aspergillus niger*. De interesse particular é a expressão da frutossiltransferase de acordo com a invenção nessas células em combinação com uma seqüência de sinal secretória, por exemplo, aquela do gene da patatina ou o gene 1-SST de *Aspergillus foetidus* (Rehm e outros, *J. Bac.* 180 (1998), 1305-1319), permitindo secreção da frutossiltransferase no meio. São vantajosamente usadas células que possuem uma atividade invertase reduzida ou não secretória de todo. Espécies fungais sem atividade invertase própria são, por exemplo, *Trichoderma reesei*. Um protocolo para a expressão de uma  $\beta$ -frutofuranosidase (a invertase de *A. niger*) foi descrito, por exemplo, em Bergès e outros (*Curr. Genet.* 24 (1993), 53-59). Uma molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção que codifica uma proteína contendo atividade frutossiltransferase, ou um vetor correspondente, pode ser transfectada ou transformada com a célula hospedeira por técnicas convencionais por versados na técnica. Processos para preparação de genes fundidos, operadamente ligados e sua expressão em células hospedeiras apropriadas são

bem-conhecidas por aqueles versados na técnica e foram descritas, por exemplo, em Sambrook ou Ausubel, ver acima. Hospedeiros preferidos são *E. coli*, fungos, particularmente levedos, e células de plantas.

5 As células de acordo com a invenção são de preferência definidas pelo fato de que a molécula de ácido nucléico introduzida é heteróloga no que diz respeito à célula transformada, isto é, de que ela não ocorre naturalmente nessas células, ou de que ela está localizada em um local do genoma diferente daquele da seqüência que ocorre naturalmente.

10 Quando as moléculas de ácido nucléico de acordo com a invenção são expressas em plantas é geralmente possível que a proteína sintetizada esteja localizada em qualquer compartimento da célula da planta. Para obter a localização em um compartimento específico, a molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção pode estar ligada a seqüências de DNA que assegurem localização no compartimento desejado; ver acima. Tais seqüências são conhecidas (ver, por exemplo, Braun, EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; Wolter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; Sonnenwald, Plant J. 1 (1991), 95-106; Rocha Sosa, EMBO J. 8 (1989), 23-29).

Os hospedeiros de acordo com a invenção portanto compreendem células de plantas transgênicas, tecidos de plantas e plantas que são transformadas com uma ou mais molécula(s) de ácido nucléico de acordo com a invenção, bem como células de planta transgênica que originam-se de células transformadas desta maneira. Tais células contêm uma ou mais molécula(s) de ácido nucléico que é(são) de preferência ligada(s) com elementos regulatórios de DNA permitindo a transcrição em células de planta, particularmente com um promotor. Tais células podem ser distinguidas de células de planta que ocorrem naturalmente pelo fato de que elas contêm pelo menos uma molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção que não ocorre naturalmente nessas células, ou que uma tal molécula está localizada em um local do genoma das células onde ela não é naturalmente localizada, isto é, em regiões genômicas diferentes. Em um outro modo de realização, a presente invenção refere-se a células de plantas contendo no seu citosol a proteína de acordo com a invenção. Para este modo de realiza-

20  
25  
30

ção, a seqüência indicada como SEQ ID N° 2 deve ser usada sem outras seqüências de sinal.

Em um outro modo de realização preferido, a presente invenção refere-se a células de plantas contendo a proteína de acordo com a invenção no seu plastídeos.

Para trazer à tona a localização da proteína de acordo com a invenção, pode-se modificar as moléculas de ácido nucléico de acordo com a invenção e/ou os vetores de acordo com a invenção na maneira descrita acima.

Já que o vacúolo é capaz de armazenar grandes quantidades de sacarose, que serve à proteína de acordo com a invenção como substrato, este compartimento é perfeitamente apropriado para gerar células de plantas que, devido à atividade de uma proteína preparada de acordo com invenção, produziram polifrutose nos vacúolos.

Em um modo de realização particularmente preferido, a presente invenção portanto refere-se a células de plantas contendo no vacúolo a proteína de acordo com a invenção. Já foi explicado acima como moléculas de ácido nucléico e/ou vetores de acordo com a invenção devem ser construídos para mediar uma localização da proteína de acordo com a invenção no vacúolo.

As células de plantas transgênicas e tecidos de plantas podem ser regenerados em plantas completas por processos conhecidos daqueles versados na técnica. As plantas obteníveis por regeneração das células de plantas transgênicas de acordo com a invenção também são objeto da presente invenção. Outro objeto da presente invenção são plantas que contêm as células de plantas transgênicas conforme descritas acima. As plantas de acordo com a invenção podem geralmente ser plantas de quaisquer espécies de plantas, de preferência elas são monocotiledôneas ou dicotiledôneas. De preferência, as células de plantas originam-se de plantas úteis agriculturalmente, isto é, plantas que são cultivadas pelo homem com o propósito de provisãoamento de alimentos ou com propósitos técnicos, particularmente industriais. De preferência as invenções referem-se a preparação

de fibras (por exemplo, linho, cânhamo, algodão), armazenamento de óleo (por exemplo, coza, girassol, soja), armazenamento de açúcar (por exemplo, beterraba, cana de açúcar, sorgo doce, banana) e plantas armazenadoras de proteína (por exemplo, leguminosas). Em outro modo de realização preferido, a invenção refere-se a plantas de forragem (por exemplo, forragem ou gramas de forragem, alfafa, trevo, etc), vegetais (por exemplo, melão, tomate, banana, chicória, alho-poró, aspargo, cenoura) ou plantas armazenadoras de amido (trigo, cevada, aveias, centeio, batatas, trigo, ervilhas, cassava, feijão mungo).

10 Em outro modo de realização, a invenção refere-se a células de plantas de plantas contendo sacarose (por exemplo beterraba, batata, arroz, trigo, cana de açúcar, etc), Particularmente preferidos são beterraba, chicória, arroz, milho, batata, cana de açúcar e trigo. A invenção também refere-se ao material de propagação e produtos de safra das plantas de acordo  
15 com a invenção, por exemplo, frutas, sementes, tubérculos, raízes, brotos, mudas, caules, culturas celulares, etc.

A presente invenção também refere-se a processos para preparação de plantas transgênicas nas quais

(a) uma célula de planta é geneticamente modificada por introdução de uma molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção e/ou um vetor de acordo com a invenção; e

(b) uma planta é regenerada da célula; e opcionalmente

(c) outras plantas são geradas da planta de acordo com (b).

No contexto da presente invenção o termo "geneticamente modificado" significa que a célula de planta é modificada em sua informação genética devido à introdução de uma molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção, e que a presença ou a expressão da molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção resulta em uma modificação fenotípica. A modificação fenotípica de preferência significa uma modificação detectável  
25 de uma ou mais funções das células. Por exemplo, plantas geneticamente modificadas de acordo com a invenção exibem uma atividade da proteína de  
30 acordo com a invenção ou uma atividade frutossiltransferase total aumentada.

As plantas podem ser regeneradas segundo a etapa (b) de acordo com processos bastante conhecidos para o versado na técnica.

5 A geração de outras plantas de acordo com a etapa (c) do processo de acordo com a invenção pode ser feita, por exemplo, tanto vegetativamente (por exemplo usando-se mudas, tubérculos ou cultura de calos e regeneração de plantas totais) ou generativamente. A propagação generativa de preferência se processa de uma maneira controlada, isto é, plantas selecionadas contendo propriedades específicas são cruzadas e propagadas. A presente invenção refere-se às plantas obteníveis pelos processos de  
10 acordo com a invenção.

A presente invenção também refere-se ao material de propagação de plantas de acordo com a invenção bem como às plantas transgênicas geradas pelos processos de acordo com a invenção. O termo "material de propagação" compreende aquelas partes da planta que são apropriadas para  
15 preparação de sucessores tanto pela via vegetativa quanto generativa. Para propagação vegetativa, por exemplo, frutas, sementes, mudas, protoplastas, culturas celulares, etc. De preferência, o material de propagação são tubérculos e sementes.

20 Em um outro modo de realização, a presente invenção refere-se a partes de planta colhíveis das plantas de acordo com a invenção, tais como frutas, folhas, raízes de armazenamento, raízes, flores, brotos, botões ou hastes, de preferência sementes ou tubérculos.

25 Em um outro modo de realização preferido, a presente invenção refere-se a gêneros alimentícios para animais e/ou seres humanos que contêm as partes das plantas colhíveis de acordo com a invenção, de preferência sementes ou tubérculos.

30 De preferência, as partes das plantas de acordo com a invenção, após o consumo, têm um efeito vantajoso na saúde de humanos e/ou animais se comparado às partes de plantas que não foram geneticamente modificadas da maneira descrita na invenção. O mesmo aplica-se aos gêneros alimentícios para animais e/ou seres humanos descritos na invenção. Em humanos, o consumo do gênero alimentício de acordo com a invenção pode,

por exemplo, levar a uma composição aperfeiçoada da flora intestinal, particularmente a um aumento no teor de bactéria bifido no intestino, que presume-se que tenha um efeito positivo na saúde humana (Izzo, Tendências na Ciência dos alimentos & Tecnologia 9 (1998), 255-257). Esses efeitos positivos são de preferência efeitos profiláticos ou efeitos que suportam a utilização dos gêneros alimentícios.

Outro assunto objeto da invenção são processos para preparação de células hospedeiras, nas quais as células hospedeiras apropriadas são transformadas com uma molécula de ácido nucléico ou vetor de acordo com a invenção. Processos para a transformação das várias células hospedeiras a serem contemplados são conhecidos das pessoas versados na técnica.

Em um outro modo de realização, a presente invenção refere-se a processos para a produção de uma frutossiltransferase, na qual um hospedeiro de acordo com a invenção é cultivado sob condições suficientes para a expressão da molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção, e depois a frutossiltransferase é isolada da cultura, isto é, as células e/ou o meio de cultura possivelmente presente. No processo acima mencionado, as células hospedeiras transformadas ou transfectadas são cultivadas, por exemplo, em fermentadores até que uma densidade de célula ótima seja atingida. Opcionalmente, no caso de promotores induzíveis, a expressão da proteína codificada pela molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção é induzida somente ao final da etapa de fermentação. A proteína expressa desta maneira pode então ser purificada do meio, lisatos de célula ou frações de membranas celulares de acordo com técnicas convencionais. As proteínas que foram expressas, por exemplo, microbialmente, podem ser isoladas e purificadas por processos de purificação preparativos cromatograficamente ou imunologicamente, por exemplo, usando-se anticorpos monoclonais ou policlonais que reconhecem a proteína codificada pela molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção. Neste contexto deveria ser mencionado que a proteína contendo atividade frutossiltransferase e sendo codificada pela molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção pode conter seqüên-

cias de amino ácido funcionais adicionais, por exemplo etiquetas de proteína (GST, GFP, Flag, peptídeo HA, rótulo HIS) que podem se originar de proteínas heterólogas ou podem ter sido preparadas sinteticamente.

5 A invenção além disso refere-se a proteínas possuindo atividade frutossiltransferase, isto é, frutossiltransferases codificadas pelas moléculas de ácido nucléico de acordo com a invenção ou obteníveis pelo processo de acordo com a invenção. As frutossiltransferases de acordo com a invenção podem de preferência ser usadas para produzir polifrutoses do tipo inulina. Elas podem também servir para produzir anticorpos que podem ser usados  
10 para detectar e/ou purificar frutossiltransferases.

Outro assunto objeto da invenção são moléculas de ácido nucléico que especificamente hibridizam para as moléculas de ácido nucléico de acordo com a invenção, ou seus fragmentos. Essas moléculas são de preferência oligonucleotídeos com um comprimento de pelo menos 10, particularmente 15 e particularmente preferido pelo menos 50 nucleotídeos. Os  
15 oligo- nucleotídeos de acordo com a invenção podem, por exemplo, ser usados como iniciadores para uma reação PCR, como amostras de hibridização ou semelhantes.

Outro assunto objeto da presente invenção são processos para  
20 preparação de polifrutoses, particularmente do tipo inulina, onde células hospedeiras de acordo com a invenção, ou organismos hospedeiros contendo-as, são cultivadas sob condições permitindo a expressão de frutossiltransferase de acordo com a invenção, bem como a síntese de polifrutose.

Pelo fornecimento das moléculas de ácido nucléico de acordo com a invenção tornou-se possível preparar - por meio de processos da tecnologia de genes - polifrutoses, particularmente do tipo inulina, em organismos, tais como não foi ainda possível usando-se processos convencionais. É portanto possível expressar as moléculas de ácido nucléico de acordo com a invenção em hospedeiros tais como bactérias, fungos ou células de plantas para aumentar a atividade da frutossiltransferase correspondente ou para  
30 introduzi-la em células que normalmente não expressam a referida enzima. Devido à expressão ou expressão adicional de pelo menos uma molécula de

ácido nucléico de acordo com a invenção, as células hospedeiras de acordo com a invenção sintetizam polifrutose, particularmente do tipo inulina. Outro assunto objeto da presente invenção são portanto as polifrutoses, particularmente do tipo inulina, obteníveis das células hospedeiras de acordo com a invenção bem como obteníveis do material de propagação e, para plantas, obteníveis das plantas e seus produtos de safra.

Portanto, a presente invenção particularmente refere-se à preparação de polifrutoses, particularmente do tipo inulina, compreendendo:

(a) o cultivo de uma célula hospedeira de acordo com a invenção, ou um hospedeiro contendo uma tal célula, sob condições que permitem a preparação de frutossiltransferase e reação de sacarose, opcionalmente adicionada de fora da célula ou um substrato equivalente a polifrutoses do tipo inulina; e

(b) obtenção da polifrutose preparada daquela maneira a partir das células hospedeiras, dos hospedeiros ou do meio.

As células hospedeiras de preferência são células de plantas e os hospedeiros são de preferência plantas. Um processo para obtenção de polifrutose, particularmente do tipo inulina, de plantas é descrito por exemplo em Vogel (em: Inulina e Safras contendo inulina, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, A. Fuchs (Ed.) (1993), 65-75).

Outro assunto objeto da presente invenção é um processo in vitro para preparação de polifrutose, particularmente do tipo inulina, compreendendo:

(a) contactação de sacarose ou de um substrato equivalente com uma frutossiltransferase de acordo com a invenção sob condições permitindo a conversão em polifrutose; e

(b) obtenção da polifrutose preparada desta maneira.

Um substrato equivalente a sacarose é, por exemplo, um substrato que é convertido em sacarose pela célula hospedeira ou uma ou mais outra(s) enzima(s). Um substrato equivalente a sacarose pode também ser aquele(s) dissacarídeo(s) ou oligossacarídeo(s) que podem ser alternativamente usado(s) como substrato(s) pela frutossiltransferase de acordo com a

invenção. Um exemplo desses sacarídeos é o trissacarídeo rafinose. Entretanto, sacarose derivada também pode ser usada. De preferência, a inulina obtida de acordo com o processo acima mencionado é uma inulina de cadeia longa, e de preferência tem um grau de polimerização de  $DP > 20$ , de preferência de  $DP > 50$ , particularmente de  $DP > 100$ , e particularmente preferido um grau de polimerização de  $DP > 200$ .

A presente invenção além disso refere-se a um processo para a preparação de polifrutose, particularmente do tipo inulina, compreendendo a etapa de extração da polifrutose, de uma das plantas / células de planta acima descritas e ou de partes de tais plantas de acordo com a invenção. De preferência, um tal processo também compreende a etapa de colheita das plantas cultivadas e/ou partes dessas plantas antes da extração da polifrutose e particularmente preferido da etapa de cultivo das plantas de acordo com a invenção antes de colhê-las. Processos para extração da polifrutose das plantas ou partes das plantas são conhecidos daqueles versados na técnica e foram descritos por exemplo por Gibson (International Sugar Journal 96 (1994), 381-387), Vogel (Stud. Plant Sci. 3 (1993), Inulina e safras contendo inulina, 65-75).

Também, a presente invenção refere-se a polifrutose, particularmente do tipo inulina, que é obtenível das células hospedeiras de acordo com a invenção ou de acordo com um processo de acordo com a invenção descrito acima. Esta polifrutose pode de preferência ser usada para produzir agentes tensoativos, para aumento da viscosidade do sistema aquoso, como detergente, como agente de suspensão, para aceleração da sedimentação e complexação, ou para ligar água.

Também, as células hospedeiras de acordo com a invenção que sintetizam polifrutose, particularmente do tipo inulina, podem ser usadas como aditivos alimentícios. Tal uso é vantajoso já que frutanos têm efeitos positivos na saúde (Roberfroid e outros, J. of Nutrition 128 (1998), 11-19; Kleesen e outros, Am. J. Clin. Nutr. 65 (1997), 1937-1402).

A presente invenção além disso refere-se a um processo para preparação de polifrutose, particularmente do tipo inulina, em que uma fruto-

siltransferase fúngica é usada para preparar a polifrutose, ou um organismo hospedeiro expressando uma frutossiltransferase. De preferência, frutossiltransferases de acordo com a invenção ou células hospedeiras de acordo com a invenção podem ser usadas. A presente invenção mostra pela primeira vez que é possível usar tais frutossiltransferases fúngicas para a preparação de polifrutose do tipo inulina.

Finalmente, a presente invenção refere-se ao uso de frutossiltransferases fúngicas para preparação de polifrutose, particularmente do tipo inulina.

Esses e outros modos de realização são divulgados e são óbvios para o versado na técnica e são compostos pela descrição e os exemplos da presente invenção. Mais literatura de um dos processos, meios e usos descritos acima, que podem ser utilizados na presente invenção, podem ser tirados da técnica anterior, por exemplo, de bibliotecas públicas, por exemplo usando meio eletrônico. Para este propósito, bancos de dados públicos tais como "Medline" são úteis, e estão disponíveis via internet, por exemplo sob o endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. Outros bancos de dados e endereços são conhecidos dos versados na técnica e podem ser encontrados na internet, por exemplo sob o endereço <http://www.lycos.com>. Uma visão geral das fontes e informação, no que concerne a patentes biotécnicas ou pedidos de patente, é fornecida em Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

Figura 1 mostra a construção de pSK-as1 para a transformação de bactérias.

Figura 2 mostra a construção de plasmida p112-as1 para a transformação de células de levedo.

Figura 3 mostra a construção de plasmida pA7-as1 para a transformação de células de plantas.

Figura 4 mostra a construção de plasmida p35-as1 para a transformação de plantas.

Figura 5 mostra a construção de plasmida p35-s3-as1 para a transformação de plantas.

Figura 6 mostra uma análise por cromatografia de camada fina de uma *E. coli* transformada com pSK-as1. A faixa 1 mostra um experimento de controle com o vetor sem inserção pBluescript SK. A faixa 2 mostra um experimento com plasmida pas1 no qual a região de código as1 não está no quadro com o gene lacZ (faixa 2). Neste caso, a translação da região codificadora as1 não é executada como fusão para a  $\beta$ -glucoronidase mas prossegue, com eficácia reduzida, iniciando do códon de partida endógeno. As faixas 3 a 6 mostram experimentos com os vários transformantes da construção pSK-as1. Após o crescimento de bactérias até um OD 600 de 0,4, as culturas foram induzidas com 100 mM IPTG. Após duas horas de indução, as células foram colhidas e lisadas em 50 mM de fosfato de sódio pH 6,0. Os extratos de proteína foram incubados por 12 horas com 600 mM de sacarose a 37° C. Como padrão para a cromatografia de camada fina, 1-kestose (7), sacarose (8) e frutose (9), respectivamente, foram aplicados nas faixas 7-9.

Figura 7 mostra uma análise por cromatografia de camada fina de células de levedo transformadas contendo plasmida p112-as1 (faixa 2) ou p112-as1L (faixa 3). Vetor p112-as1L contém o líder 5' do transportador de sacarose de espinafre. A faixa 1 mostra um experimento de controle com células de levedo não-transformadas. Atividade frutossiltransferase foi detectada em extratos de proteína de células de levedo. Como padrão, aplicou-se frutose (faixa 4), uma mistura de 1-kestose, nistose e frutossil-nistose (faixa 5) e sacarose (faixa 6).

Figura 8 mostra uma análise por cromatografia de camada fina de células de planta contendo plasmida pA7-as1. A faixa 1 mostra a transformação com o vetor sem a inserção pA7 (50  $\mu$ g); as faixas 2 até 5 mostram transformações com o vetor pA7-as1 (faixa 2: 10  $\mu$ g; faixa 3: 20  $\mu$ g; faixas 4 e 5: 50  $\mu$ g). Como padrão, aplicou-se uma mistura de 1-kestose, nistose e frutossil-nistose (faixa 6), sacarose (faixa 7) e frutose (faixa 8).

Para cada experimento 500 000 protoplastos foram usados. Os protoplastos foram incubados por dois dias a 25°C após transformação, depois um extrato de proteína foi obtido em 50 mM de fosfato de sódio pH 6 que foi incubado por 20 horas a 28°C com 500 mM de sacarose. Aplicou-se

4 µg de diluição 1/10 da mistura.

Figura 9 mostra uma análise por cromatografia de camada fina de plantas que foram transformadas com a construção 35-as1. Doze plantas foram selecionadas randomicamente. Extraíu-se de cada 20 mg de material de folha, 200 µl de água. Aplicou-se 4 µl do extrato. Como padrão aplicou-se frutose (faixa F), sacarose (faixa S) e uma mistura de 1-kestose, nistose e frutossil-nistose (faixa St).

Figura 10 mostra uma análise por cromatografia de camada fina de plantas que foram transformadas com a construção 35-S3as1. Doze plantas foram selecionadas randomicamente. Extraíu-se 20 mg de material folha em 200 µl de água. Aplicou-se 4 µl do extrato. Como padrão, aplicou-se frutose (faixa F), sacarose (faixa S) e uma mistura de 1-kestose, nistose e frutossil-nistose (faixa St).

Figura 11 mostra o eluado "400 até 0 mM de sulfato de amônio" de uma coluna de fenil superose que foi carregada com um extrato de proteína de *Aspergillus sydowi* enriquecido com frutossiltransferase (faixa E). Nas faixas definidas por "M" um marcador de tamanho é separado. As massas moleculares das proteínas marcadoras são indicadas do lado direito em kDaltons.

Os exemplos ilustram a invenção.

#### Exemplo 1

##### Purificação do af1-SST de *Aspergillus sydowi*

*Aspergillus sydowi* IAM 2544 cresceu em um meio de cultura que continha 2% de extrato de malte, 0,5% de peptona e 2% de sacarose. O meio foi solidificado por adição de 2% de agar. Esporos foram colocados em pratos e a cultura foi mantida a 25° C até que os pratos estivessem completamente secos. Conídias foram colhidas dos pratos e dissolvidas em 50 mM de fosfato de sódio pH 6,0. A lise da conídia foi realizada por três passagens através de uma "Célula com pressão francesa".

Para purificação, o homogenado foi adsorvido em sefarose Q. Proteína ligada foi eluída com um gradiente linear de 0- até 1000 mM KCl. Frações sucroliticamente ativas foram obtidas entre 500 e 700 mM de KCl.

Essas frações foram mergulhadas e dializadas contra fosfato de sódio pH 6,0. Para enriquecimento da proteína, ela foi novamente adsorvida em Sepharose Q (volume de leito 2 ml) e eluída em um volume de 10 ml. O eluado foi ajustado a 2M de sulfato de amônio e adsorvido em fenil superose. A eluição foi realizada após lavagem com sulfato de amônio 2M, 100 mM de fosfato de sódio pH 7,0 com um gradiente linear de 2M até 0M de sulfato de amônio. Frações ativas foram obtidas no gradiente de eluição entre 400 até 0 mM de sulfato de amônio. A mistura de proteína obtida foi analisada por SDS-PAGE. O resultado é mostrado na Fig. 11. Um enriquecimento similar de uma atividade sucrolítica - entretanto, com um micélio de *Aspergillus sydowi* - foi descrito por Muramatsu e Nakakuki (Biosci Biotech Biochem 59 (1995), 208-212). A purificação não rende uma proteína homogênea que seria apropriada para, por exemplo, seqüenciação.

Para uma identificação da frutossiltransferase, um gel de poliacrilamida semiativa foi usado, dentro do qual foi aplicado 10 µg de proteína do eluado da coluna de fenil superose em 0,1% de SDS, 10% de glicerol, 50 mM de tris pH 6,8. Após eletroforese o gel foi retamponado três vezes por 10 minutos em 50 mM de fosfato de sódio pH 6,0, 1% de triton x 100 e depois incubado por 30 minutos em 50 mM de fosfato de sódio pH 6,0, 1% de Triton x 100, 500 mM de sacarose. Depois o gel foi fervido em 0,1% (peso/volume) cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), 0,5 M de NaOH. TTC assim forma uma corante de formazano juntamente com açúcares de redução. A faixa de proteína rotulada na fig. 11 resultou em uma mancha devido à atividade sucrolítica da proteína, que poderia assim ser identificada como a frutossiltransferase de *Aspergillus sydowi*. A faixa foi isolada de um gel preparatório, a proteína foi eluída do gel e usada para seqüenciação. Já que a proteína é bloqueada N-terminalmente, clivagens foram realizadas com endopeptidase Lys/c e Asp N, os peptídeos foram purificados por HPLC e submetidos a uma seqüenciação de acordo com Edmann. As seguintes seqüências foram obtidas:

LysC: VLPSTSQASEK (SEQ ID N° 3)

AspN: DDLVTYR (SEQ ID N° 4)

DPYVFQNHEV ( SEQ ID Nº 5)

Para clonagem dos genes, uma biblioteca cDNA foi construída no fago Lambda Zap II (Estrageno, Heidelberg). Já que não foi possível preparar RNA a partir da conídia, RNA foi preparado a partir do micélio de acordo com Logemann e outros (Anal. Biochem. 163 (1987), 16-20). Um poli A+ - RNA foi obtido pelo sistema poliAtract (Promega , Madison, USA). A síntese de cDNA e clonagem em Lambda Zap II foi realizada seguindo as instruções do fabricante (Stratagene, Heidelberg). De acordo com as seqüências de proteína, nos seguintes iniciadores foram designados:

10                   Iniciador asp19 para baixo: 5'-GAYGAYYTNGTNACNTAYMG  
(SEQ ID Nº 6)

                    Iniciador asp19 para cima: 5'-CKRTANGTNACNARRTCRTC  
(SEQ ID Nº 7)

15                   Iniciador asp31- para baixo: 5'- GTNTTYCARAAYCAYGARG  
(SEQ ID Nº 8)

                    Iniciador asp31 para cima: 5'-TGRTTYTGRAANACRTANGG  
(SEQ ID Nº 9)

                    Iniciador lys1 para cima: 5'-GCYTGNSWNGTNSWNGG  
(SEQ ID Nº 10)

20                   Em uma reação PCR com toda a biblioteca cDNA como matriz e a combinação de iniciador asp19 para baixo/asp 31 para cima (temperatura de anelamento 40°C) obteve-se um fragmento de DNA de cerca de 350 bp. O respectivo fragmento foi usado após rotulação radioativa (Kit Megaprime , Boehringer Mannheim, Mannheim) para monitorar a biblioteca de cDNA.  
25                   Clones obtidos foram amplificados após excisão in vivo como plasmidas p-Bluescript. As inserções de cDNA foram comparadas após clivagem de restrição e as inserções de um clone foram completamente seqüenciadas. A seqüência da inserção de cDNA é mostrada na SEQ ID Nº 1. A seqüência de proteína derivada é mostrada na SEQ ID Nº 2.

30                   Exemplo 2

Preparação de construtos contendo regiões codificadoras de frutossiltransferases fungais para a transformação de várias células procarióticas e eucarió-

ticas.

Para a transformação das várias células hospedeiras com frutotransferases fúngicas, um número de diferentes construtos foi preparado de acordo com técnicas padrão moleculares-biológicas (Sambrook e outros, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Os construtos são mostrados nas Figs. 1 até 5. Especificamente, os construtos foram preparados como se segue:

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- pSK-as1 é um derivado de pas1 que foi obtido como excisão in vivo de um clone Lambda Zap II da biblioteca de cDNA de *Aspergillus sydowi*. pas1 contém o cDNA como fragmento EcoRI/XhoI. pSK-1 resulta de pas1 por clivagem de BamH e SmaI, preenchendo a extremidade BamHI coesiva e religando o vetor. Por remoção dos 4 nucleotídeos a região codificadora de as1 é ligada à moldura de leitura do gene lacZ (figura 1).
- p112-as1 No vetor p112A1NE (ver Riesmeier e outros, EMBO J. 11 (1992), 4705-4713), que foi clivado com BamHI, preenchido e depois clivado com NotI, fragmento as1 de pas1 (clivado com Asp18, preenchido e clivado com NotI) foi clonado (Figura 2).
- pA7-as1 foi gerado de pA7 por clonagem da região codificadora de pas1 como fragmento SmaI/Asp718, cujas extremidades coesivas foram preenchidas, no Asp718 preenchido e local de restrição SmaI do vetor. A orientação correta do fragmento foi confirmada por uma clivagem HidIII que resultou em cerca de 1900 bp de fragmento. pA7 é um derivado de pUC18, que contém entre EcoRI e Asp 718 o promotor 35S RNA do vírus do mosaico de couve-flor (CaMV; 528 bp; nt 6909-7437, Franck e outros, Célula 21 (1980), 285-294), bem como entre SphI e HindIII a terminação do gene de sintase de octipin de *Agrobacterium tumefaciens* (Gielen e outros, EMBO J. 3 (1984), 835-846) (Figura 3).
- p35-as1 foi gerado a partir de pBinAR por fragmento de ligação as1 de pas1 (clivagem com Asp718/NotI e depois preenchido) no vetor que tinha sido clivado com SmaI. pBinAR é um derivado de

pBin19 (Bevan, Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) que contém entre EcoRI e Asp718 o promotor 35S de RNA do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV; 528 bp; nt 6909-7437, Franck e outros, loc. cit.), bem como entre SphI e HindIII a terminação do gene de sintase de octopina de *Agrobacterium tumefaciens* (Gielen e outros, loc. cit.) (Figura 4).

p35-s3-as1 foi clonado em duas etapas. Primeiro, um fragmento BamHI/Asp718 de pas1, cujas extremidades coesivas tinham sido preenchidas com T4 polimerase, foi clonado no vetor pS3, que tinha sido clivado com BamHI e depois preenchido. Assim, pS3-as1 foi obtido. O vetor pS3 contém um fragmento PCR do gene da patatina B33 (Rosahl e outros, Mol. Gene. Genet. 203 (1986), 214-220) que compreende nucleotídeos 725 a 1400. O fragmento de PCR é fornecido com um local de restrição Asp718 (GGTACC) em nt725, com uma seqüência ATGG em nt 1400, que em combinação com nt 1399 e 1400 dá o local de restrição NcoI. O fragmento PCR é inserido entre o Asp 718 e o local de restrição SmaI. De pSe-as1 foi preparado um fragmento SacI (preenchido)/XbaI que contem a fusão S3-as1. Este fragmento foi clonado entre o SmaI e o local de restrição XbaI de pBinAR (Figura 5).

Os hospedeiros correspondentes foram transformados por técnicas padrão. *E. coli* foi transformada de acordo com o processo de Hanahan (J. Mol. Biol. 166 (1983), 557-580), *Saccharomyces cerevisiae* foi transformado de acordo com o processo por Dohmen e outros (Levedo 7 (1991), 691-692), expressão de gene transiente em protoplastos de tabaco foi executada de acordo com o processo por Damm e Willmitzer (Mol. Gene. Genet. 213 (1989), 15-20), transformação estável de plantas de batata de acordo com o processo por Dietze e outros (em: Protykus, I. e G. Spangenberg (Ed.). Transferência de genes para plantas, xxii + 361 (1995), 24-29; editora Springer: Berlin, Alemanha; Nova Iorque, EUA. ISBN 3-540-58406-4).

### Exemplo 3

Análise da atividade frutossiltransferase de células hospedeiras transgênicas

ou organismos expressando frutossiltransferases fungais.

Síntese in vivo de inulina

Células hospedeiras transgênicas ou organismos que expres-  
sam frutossiltransferases fungais foram cultivadas em meio com 2% de saca-  
5 rose - a menos que fosse tecido de planta. No caso de *Escherichia coli* K12  
como organismo hospedeiro, um gene *cscB* funcional codificando a permea-  
se de sacarose de *E. coli* foi introduzido como construção no vetor  
pACYC184. No caso de *Saccharomyces cerevisiae* o gene do transportador  
de sacarose de espinafre foi introduzido no vetor p112AINE (Riesmeier e  
10 outros, EMBO J. 11 (1992), 4705-4713). As células foram cultivadas por pelo  
menos 24 horas na presença de sacarose, depois colhidas e quebradas a-  
pós lavagem em 50 mM de fosfato de sódio pH 6,0.

Plantas expressando as frutossiltransferases fungais cresceram  
em solo. Após quatro semanas amostras de folhas e outros tecidos foram  
15 tiradas e extraídas em 1 ml de água/g de peso fresco na presença de polivi-  
nilpolipirrolidona insolúvel, detritos de célula foram removidos por centrifuga-  
ção.

4  $\mu$ l de cada um dos extratos foram aplicados em sílica gel nos  
filmes DC pré-moldados (Schleicher e Schüll, Dassel, Alemanha) e desen-  
20 volvidos duas vezes em acetona/água (87:13). O ensaio para resíduos de  
frutossil foi realizado com um reagente uréia-ácido fosfórico (Röber e outros,  
Planta 199 (1992), 528-536).

Síntese in vitro de inulina

Células expressando frutossiltransferases fungais foram quebra-  
25 das em 50 mM de fosfato de sódio pH 6,0, 50  $\mu$ M PMSF, 1 mM de DTT, 10%  
(v/v) de etileno glicol. Extratos das células foram incubados em 50 mM de  
fosfato de sódio pH 6,0, 500 mM de sacarose, 50  $\mu$ M PMSF, 1 mM DTT,  
0,02% (p/v)  $\text{NaN}_3$ , 10% (v/v) de etileno glicol por 12 horas a 25°C. As mistu-  
ras foram diluídas 1:10 em água, depois 4  $\mu$ l foi aplicado em películas DC de  
30 sílica gel pré-moldada (Schleicher e Schüll, Dassel, Alemanha) e desenvol-  
vida duas vezes em acetona/água (87:13). O ensaio para resíduos de frutossil  
foi executado com um reagente de uréia ácido fosfórico (Röber e outros, loc.

cit.).

Os resultados das análises individuais são mostrados nas figuras 6 até 10. As figuras mostram as películas de sílica gel após cromatografia de camada fina de misturas de incubação ou homogenados celulares e manchando com açúcar contendo frutose. Por meio de cromatografia de 5 camada fina em acetona/água (87:13) os carboidratos monopoliméricos, oligopoliméricos, e poliméricos são separados de acordo com o tamanho. Frutose migra ainda mais do que sacarose, que por sua vez migra mais do que kestose, etc. Oligômeros de um  $DP > 7$  e mais não são separados e 10 permanecem no local da aplicação.

Na figura 6 pode-se ver que clones de *E. coli* que são transformados com um vetor pBluescript sem inserção não são capazes de converter sacarose (faixa 1), enquanto aqueles transformados com plasmida pas1 sintetizam o trissacarídeo kestose. Clones que são transformados com 15 plasmida pSK-as1 também são capazes de sintetizar oligômeros maiores (faixas 3-6). Simultaneamente, resíduos de frutose são transferidos para água, formando assim frutose. A referida conversão é catalisada pelo SFT de *Aspergillus sydowi*. A figura 7 mostra que extratos de proteína de levedo que são transformados com plasmida 112-as1 podem sintetizar frutano. A atividade 20 frutose transferase é maior nesses levedos do que naqueles que são transformados com o construtor 112-as1L. O último- devido à menor atividade de frutossiltransferase conseguida no tempo disponível no experimento - só pode sintetizar os trissacarídeos. O tamanho dos frutanos sintetizados depende do tempo de reação e da atividade frutossiltransferase. A figura 8 25 demonstra que o tamanho do frutano sintetizado nos extratos de protoplastos de tabaco transformados depende, no dado tempo de reação, da quantidade de atividade frutossiltransferase obtida, que por sua vez depende da quantidade de plasmida pA7-as1 transformada. Nas faixas 3-5 pode-se ver que oligopolímeros e polímeros com  $DP > 7$  foram sintetizados, os quais com 30 cromatografia não migram do local de aplicação. O mesmo é verdadeiro para extratos de planta de plantas estavelmente transformadas, como mostrado nas figuras 9 e 10.

## REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucléico codificadora de frutossiltransferase, caracterizada pelo fato de ser aquela definida na SEQ ID N° 1.

2. Molécula de ácido nucléico de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que é uma molécula de DNA ou molécula de RNA.

3. Molécula de ácido nucléico de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que codifica um polipeptídeo fungal.

4. Molécula de ácido nucléico de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o fungo é do gênero *Aspergillus*.

5. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucléico codificadora de frutossiltransferase, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

6. Vetor de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido nucléico está operativamente ligada a elementos regulatórios que asseguram a transcrição e a síntese de um RNA transladável em células procarióticas e/ou eucarióticas.

7. Vetor de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido nucléico contém uma região que codifica uma sequência de sinal, que influencia a localização intracelular ou extracelular da frutossiltransferase.

8. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que é uma célula bacteriana ou uma célula fungal transformada por (i) uma molécula de ácido nucléico codificadora de frutossiltransferase, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e/ou (ii) um vetor, como definido em qualquer uma das reivindicações 5 a 7.

9. Processo para produzir uma planta, caracterizado pelo fato de que consiste das seguintes etapas:

(i) geneticamente modificar uma célula de planta através da introdução de (a) uma molécula de ácido nucléico codificadora de frutossiltransferase, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e/ou um vetor, como definido em

qualquer uma das reivindicações 5 a 7;

- (ii) regenerar uma planta a partir de uma célula obtida na etapa (ii); e opcionalmente
- (iii) gerar outras plantas a partir da planta obtida na etapa (ii).

5 10. Produto alimentício para humanos e/ou animais, caracterizado pelo fato de que compreende polifrutose, particularmente aquela do tipo inulina, e partes colhíveis de:

- (i) uma planta consistindo de células de planta transformadas por (a) uma molécula de ácido nucléico codificadora de frutossiltransferase, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e/ou (b) um vetor, como definido em qualquer uma das reivindicações 5 a 7; ou
- (ii) uma planta obtível por um processo, como definido na reivindicação 9.

15 11. Processo para preparar uma célula hospedeira, como definida na reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que consiste na etapa de transformar uma célula bacteriana ou fungai adequada com (i) uma molécula de ácido nucléico codificadora de frutossiltransferase, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e/ou (ii) um vetor, como definido em  
20 qualquer uma das reivindicações 5 a 7.

12. Processo para preparar uma frutossiltransferase, caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

- (i) sob condições que permitam a síntese da frutossiltransferase, cultivar uma célula hospedeira, como definida na reivindicação 8, ou uma célula de planta transformada por (a) uma molécula de ácido nucléico codificadora de frutossiltransferase, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e/ou (b) um vetor, como definido em qualquer uma das reivindicações 5 a 7; e
- (ii) isolar a frutossiltransferase das células cultivadas e/ou do meio de cultura.

30

13. Oligonucleotídeo, caracterizado pelo fato de que especifica-

mente hibridiza uma molécula de ácido nucléico codificadora de frutossiltransferase, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que o comprimento do oligonucleotídeo é de pelo menos 15 nucleotídeos.

5 14. Processo para preparar polifrutose, particularmente aquela do tipo inulina, caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

- 10 (a) cultivar uma célula hospedeira, como definida na reivindicação 8, sob condições que permitem a produção de frutossiltransferase e a conversão de sacarose introduzida por fora ou um substrato equivalente a polissacarose; e
- (b) obter a polifrutose assim preparada a partir das células cultivadas, do hospedeiro ou do meio.

15 15. Processo para preparar polifrutose, particularmente aquela do tipo inulina, caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

- 20 (a) colocar em contato sacarose ou um substrato equivalente com uma frutossiltransferase codificada por uma molécula de ácido nucléico codificadora de frutossiltransferase, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, ou de uma frutossiltransferase obténível por um processo, como definido na reivindicação 12, sob condições que permitem a conversão a polifrutose; e
- (b) obter a polifrutose preparada desta maneira.

25 16. Processo para preparar polifrutose, particularmente aquela do tipo inulina, caracterizado pelo fato de que compreende a extração da polifrutose a partir de:

- 30 (i) uma planta compreendendo células de planta que foram transformadas por (a) uma molécula de ácido nucléico codificadora de frutossiltransferase, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e/ou (b) um vetor, como definido em qualquer uma das reivindicações 5 a 7, ou uma planta originada de tais células;

- (ii) uma planta obtida por um processo, como definida na reivindicação 9; ou
- (iii) partes das referidas plantas.

5 17. Processo para preparar agentes tensoativos, caracterizado pelo fato de que consiste nas etapas (a) e (b) do processo definido na reivindicação 14 ou 15 ou na etapa de extração do processo definido na reivindicação 16.

10 18. Emprego de célula hospedeira, como definida na reivindicação 8, de uma célula de planta transformada por (a) uma molécula de ácido nucléico codificadora de frutossiltransferase, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e/ou (b) um vetor, como definido em qualquer uma das reivindicações 5 a 7, ou de uma planta que se origina de tal célula, caracterizado pelo fato de ser como aditivo alimentar.

15 19. Emprego de uma frutossiltransferase codificada por uma molécula de ácido nucléico codificadora de frutossiltransferase, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, ou de uma frutossiltransferase obténível por um processo, como definido na reivindicação 12, caracterizado pelo fato de ser na preparação de polifrutose, particularmente do tipo inulina.

20 20. Emprego de uma polifrutose preparada por um processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 14 a 16, caracterizado pelo fato de ser na preparação de agentes tensoativos para elevar a viscosidade de sistemas aquosos, como detergentes e agentes de suspensão, para acelerar a sedimentação e complexação ou para ligar de água.

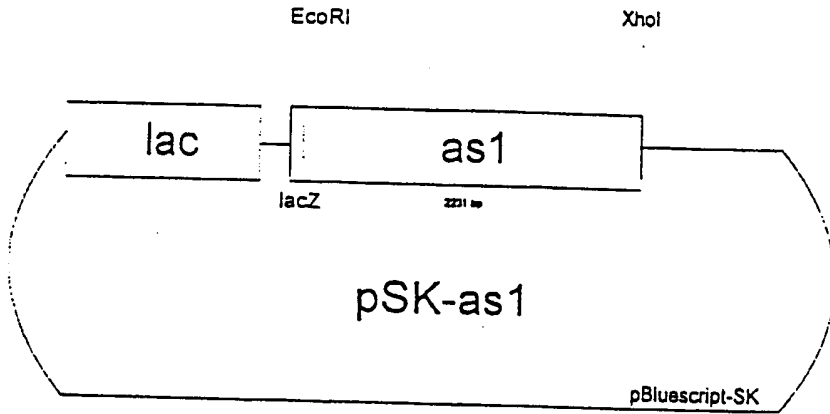


Fig. 1

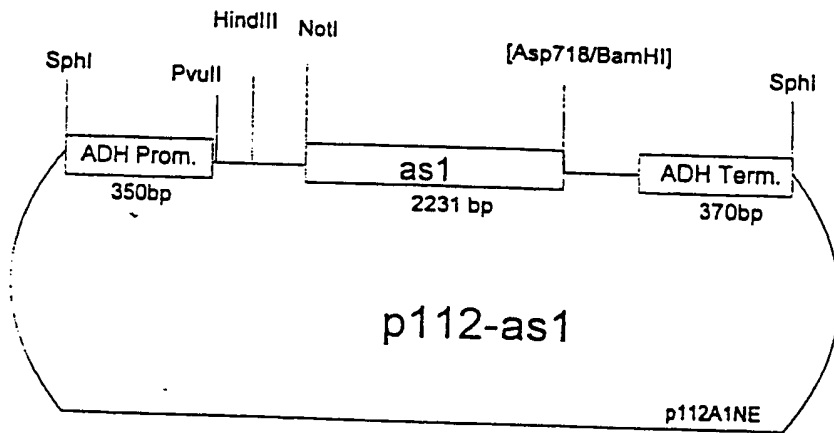


Fig. 2





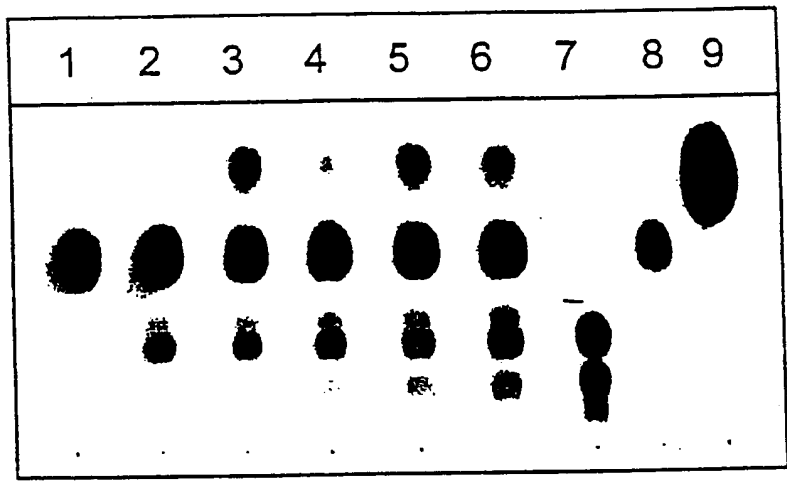


Fig. 6

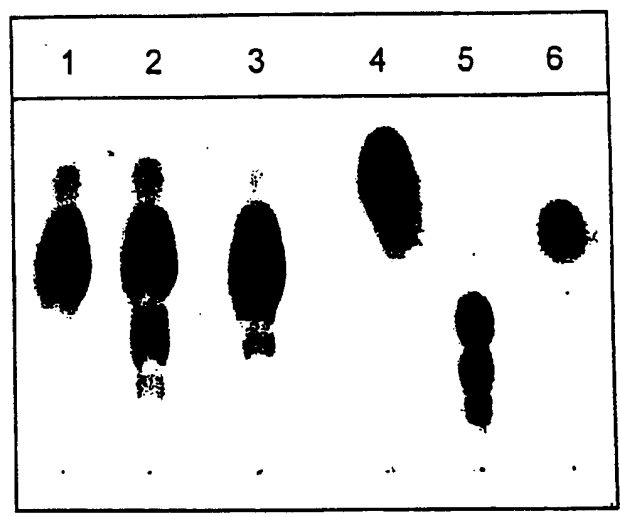


Fig. 7

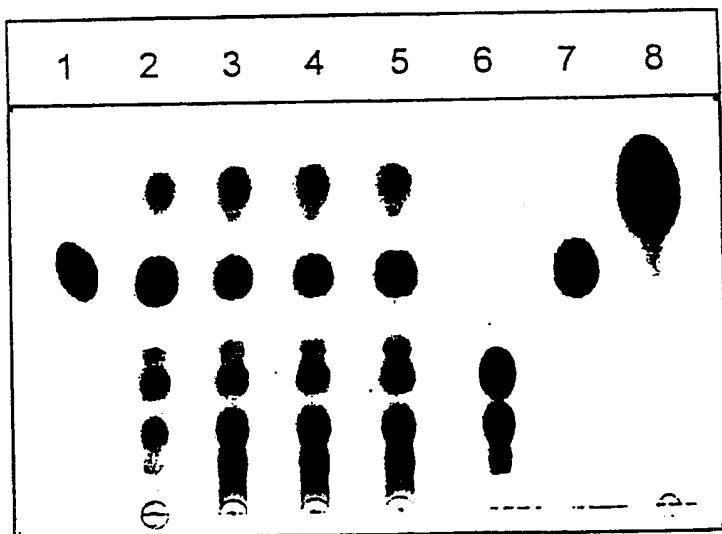


Fig. 8

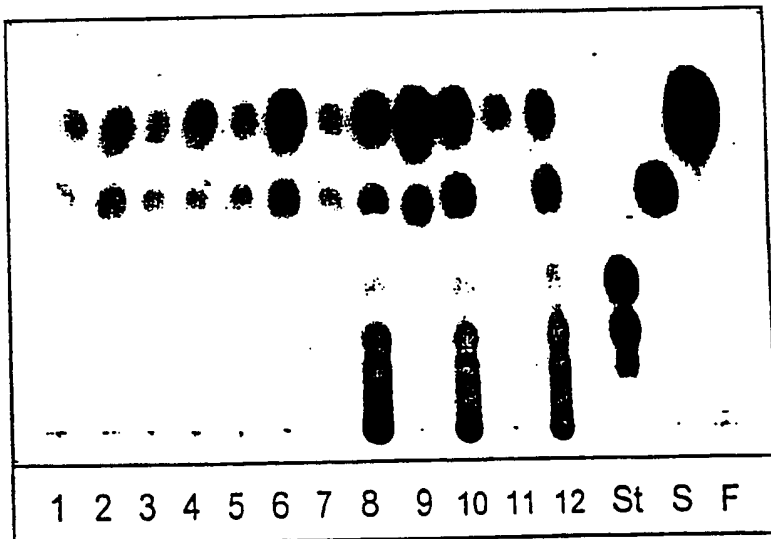


Fig. 9

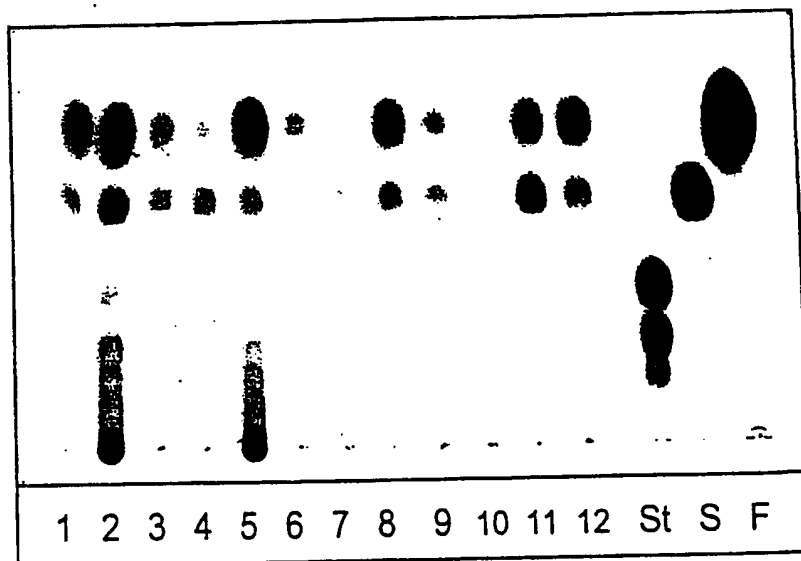


Fig. 10

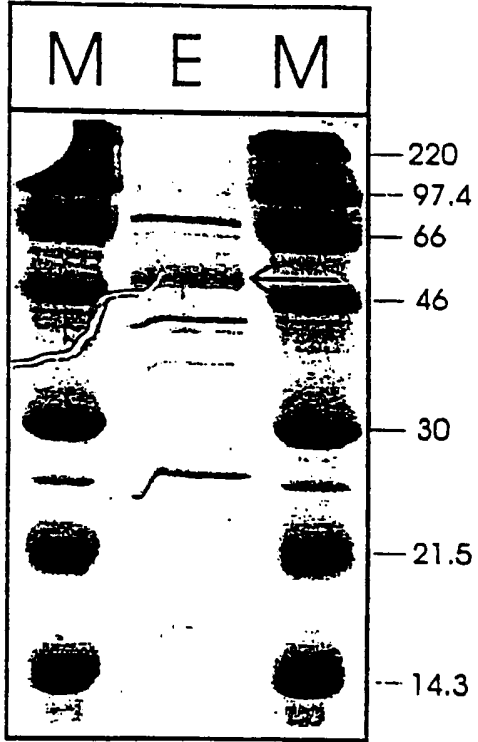


Fig. 11