

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 97 185

REQUERENTE: GIST-BROCADES N.V., holandesa, com sede em Wateringseweg 1, P.O. Box 1, 2600 MA Delft, Países Baixos

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVAS ESTIRPES DE LEVEDURA COM TEORES REFORÇADOS EM TRE-HALOSE"

INVENTORES: Marianne Driessen, Hlaas Anne Osinga e Margareta Adriana Herweijer

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

Europeia apresentados em 28 de Março de 1990 e em 20 de Dezembro de 1990, sob os N.ºs 90200757.4 e 90203462.8, respectivamente.



Descrição referente à patente de invenção de GIST-BROCADES N.V., holandesa, industrial e comercial, com sede em Wateringseweg 1, P.O. Box 1, 2600 MA Delft, Países Baixos, (inventores: Marianne Driessen, Hlaas Anne Osinga e Margareta Adriana Herweijer, residentes na Holanda), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVAS ESTIRPES DE LEVEDURA COM TEORES REFORÇADOS EM TRE-HALOSE".

DESCRIÇÃO

Âmbito da invenção

Esta invenção refere-se a leveduras, em especial a leveduras para panificação.

Fundamento da invenção

É bem conhecido que as estirpes de leveduras pertencentes ao género Saccharomyces são capazes de fermentar açúcares transformando-os em quantidades aproximadamente iguais de dióxido de carbono e etanol sob condições anaeróbicas. A actividade levedante da levedura na massa resulta deste efeito. A velocidade de libertação de dióxido de carbono e de etanol na massa depende, para além da actividade dos enzimas envolvidos, da sensibilidade da levedura para com a quantidade de açú-



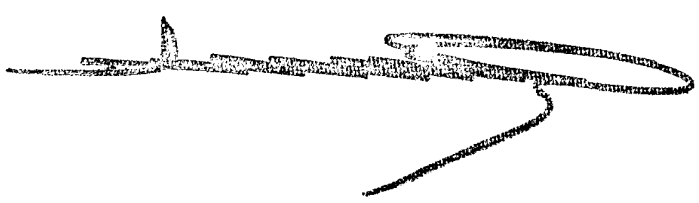
car presente na massa. Em massas ricas em açúcar a actividade levedante da levedura pode ser muito menor do que em massas pobres (não açucaradas), devido a uma maior pressão osmótica relacionada com a presença do açúcar.

O produto comercial "levedura de padeiro" é produzido em várias formulações que incluem levedura fresca, levedura seca e levedura congelada. A levedura fresca encontra-se disponível como levedura comprimida (27-33% de teor em matéria seca) e levedura creme (17-23% de teor em matéria seca). A levedura seca encontra-se disponível na forma de levedura seca activa (ADY) e levedura seca instantânea (IDY) com teores em humidade de 6-8% e 3-6%, respectivamente. Existe um esforço de investigação em marcha para melhorar a capacidade de fermentação da levedura. Tanto a levedura seca como a levedura húmida podem ser melhoradas para aumentar a sua capacidade de produção de dióxido de carbono, tanto em massas pobres (não açucaradas) como em massas ricas (açucaradas), de modo a reduzir-se o tempo de levedação e/ou a permitir o uso de menos levedura, um factor de custo considerável em panificação.

Papel de tre-halose nas células de levedura

A tre-halose (alda-D-glucopiranosí)-alfa-D-glucopiranosído) é um importante composto de armazenamento em células vegetativas e esporos de fungos e leveduras. A tre-halose parece servir principalmente como hidrato de carbono de armazenamento durante períodos de não proliferação. Isto aplica-se ao ciclo vital, ao ciclo celular e a outras condições nas quais ocorre a paragem do crescimento, tais como, por exemplo, inanição (Thevelein, J.M. (1984) Microbiol. Rev. 48, 42-59).

A tre-halose acumula-se no fim dos estados reprodutivos e parece ser importante para a viabilidade das restantes células (Thevelein, ibid). Acredita-se também que os elevados níveis de tre-halose em esporos de fungos aumentam a resistência dos esporos em condições ambientes extremas, tais como temperaturas altas e baixas e secagem. Para além do papel da tre-halose na viabilidade dos esporos, muitos investigadores descobriram uma relação entre o nível do teor em tre-halose in-



tracelular ou extracelular e a resistência ao desgaste: o nível de tre-halose está positivamente relacionada com a capacidade de formar gases da levedura seca (Pollock, G.E., Holstrom, C.D. (1951) Cereal Chem. 28, 498-505). Também se descobriu uma correlação positiva entre o nível de tre-halose e a osmotolerância (Mackenzie, K.F., Sing, K.K., Brown, A.D. (1988), J. Gen. Microbiol. 134, 1661-1666) e a tolerância térmica (Hottiger, T., Boller, T., Wiemken, A. (1987); FEBS Lett., 220, 113-115). Num outro estudo descobriu-se que o nível de tre-halose adicionada exógena está relacionado com a resistência à desidratação em células de fase estacionária mas não em células de fase exponencial (Gadd, G.M., Chalmers, K., Reed, R.H. (1987), FEMS Microbiol. Lett., 48, 249-254).

Elevação do nível celular de tre-halose

Existe a necessidade de produzir levedura de qualidade superior, tais como leveduras com maior capacidade de produção de gases. Tais leveduras podem obter-se elevando o teor em tre-halose celular da levedura. Isto diminui o efeito prejudicial de várias formas de desgaste da levedura. A elevação do nível de tre-halose celular ocorre em condições que diminuem a velocidade de crescimento, o que pode acontecer p. ex. em condições de inanição, temperaturas elevadas e, em geral, sob formas de desgaste tais como secagem e congelamento. No fabrico de leveduras a velocidade mais baixa de crescimento pode conseguir-se reduzindo o melaço introduzido no fim da fermentação. Podem obter-se também elevados níveis de tre-halose aplicando várias formas de desgaste como acima referido. Contudo, estas condições conduzem a leveduras com propriedades alteradas e uma baixa qualidade (p. ex. viabilidade, capacidade de produção de gases), devido a efeitos secundários das condições utilizadas (Jimenez J., Benitez T., (1988) Curr. Genet. 119, 541-547 e Morris G.J., Winters L., Contson G.E., Clarke K.J. (1983) J. Gen. Microbiol., 129, 2023-2034).

Tem-se conseguido a modificação genética do nível de tre-halose usando estirpes de levedura mutacionais no gene RA52. As proteínas RAS de levedura são proteínas



que se ligam ao nucleótido da guanina e estão envolvidos na formação de CAMP e possivelmente também no rendimento dos fosfolípidos do inositol. Tanto as proteínas RAS1 como RAS2 têm capacidade de ligação a nucleótidos da guanina bem como de hidrolisar GTP, enquanto que esta última actividade está anulada nos mutantes RAS^{val19}, nos quais o 19º aminoácido (glicina) está substituído por valina.

Os mutantes RAS^{val19} têm fenótipos dominantes múltiplos que incluem: (1) incapacidade de acumular hidratos de carbono de armazenamento tais como glicogénio e tre-halose; (2) esporulação ineficiente; (3) sensibilidade à falta de nutriente; e (4) sensibilidade ao tratamento por choque térmico. As estirpes a que falta o gene RAS2 têm virtualmente fenótipos opostos que incluem: (1) acumulação de hidrocarbonetos de armazenamento e (2) esporulação mesmo em meios ricos. Estes mutantes não crescem eficientemente em fontes de carbono não fermentáveis e os homozigotos celulares para disrupções RAS2 esporulam em meios ricos (Tatchell, K., supra). Estes fenótipos são semelhantes aos fenótipos das leveduras envolvidas no mecanismo cAMP (Tamanoi, F. (1988) Biochim. Biophys. Acta., 948, 1-15).

Existem resultados contraditórios publicados sobre a relação entre os níveis de tre-halose e a actividade da tre-halose na célula.

Especificamente, as mutações no gene RAS2 conduziram a baixos níveis de tre-halose neutra, o enzima que mobiliza a tre-halose, e a níveis elevados de tre-halose acumulada em células da fase estacionária inicial, no caso de uma mutação *ras2⁻* (Tatchell, K., Robinson, L.C., Breitenbach, M. (1985), Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 3785-3789). Níveis elevados de tre-halose neutra e ausência de acumulação de tre-halose em células de levedura da fase estacionária, ocorrem com uma mutação RAS^{val19} (Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K., Wiggler, M. (1985), Cell, 40, 27-36). Não se testou a resistência contra diferentes formas de desgaste nos mutantes acima mencionados.

Num outro estudo utilizaram-se mutantes com defeitos na cascata de proteinoquirase dependente de cAMP.



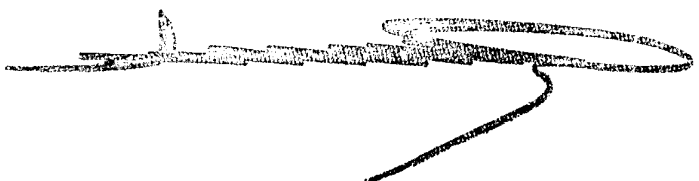
Uma mutação *bcy1* (proteinoquinase independente de cAMP) conduziu a um alto nível de tre-halose neutra e a baixos níveis de tre-halose, enquanto que uma mutação *cyr1-2(ts)* (adenilatociclose termolábil e baixos níveis de cAMP) conduziu a um baixo nível de tre-halose neutra e a um nível normal de tre-halose, ao contrário dos resultados obtidos com os mutantes *ras2* (Uno, I., Matsumoto, K., Adachi, K., Ishikawa, T. (1983) J. Biol. Chem., 258, 10867-10872).

Tal como as modificações do teor em tre-halose da levedura induzidas fisiologicamente ou pelo meio ambiente, como o crescimento a temperaturas mais elevadas ou as condições de inanição, as modificações induzidas geneticamente acima mencionadas têm efeitos secundários negativos para além do aumento do teor em tre-halose. Por isso, a modificação genética do teor em tre-halose através das referidas modificações não é útil para aplicação industrial.

Têm sido apresentados por grupos de investigadores diferentes resultados oposto no que respeita à existência de uma relação directa entre o teor em tre-halose neutra e o teor em tre-halose na levedura, por exemplo comparando mutantes *ras2⁻*, que têm um teor mais baixo em tre-halose neutra e mais alto em tre-halose, com mutantes *cyr1-2(ts)*, que têm um teor mais baixo em tre-halose neutra mas não têm um teor mais alto em tre-halose.

Regulação do metabolismo da tre-halose na levedura

A tre-halose é sintetizada a partir da glucose-6-fosfato e da UDP-glucose, catalisada por tre-halose-6-fosfato sintase, para formar tre-halose-6-fosfato que é transformado em tre-halose pela tre-halose-6-fosfato fosfatase. Panek e colaboradores (Panek, A.C., De Araujo, P.S., Moura-Neto, V. e Panek, A.D. (1987) Curr. Genet., 11, 459-465) afirmam que a actividade da tre-halose-6-fosfato sintetase é inactivada pela proteinoquinase dependente de cAMP. Outros, contudo, afirmam que a tre-halose-6-fosfato sintetase não é afectada pela proteinoquinase dependente de cAMP (Vandercammen, A., François, J. e Hers, H. (1989) Eur. J. Biochem., 182, 613-620). Mediu-se a activida-



de da tre-halose-6-fosfato sintetase em células de fase estacionária e verificou-se ser independente de ATP, cAMP e proteinoquinase dependente de cAMP. A degradação da tre-halose é efectuada por uma tre-halase citoplasmática neutra, cuja activação é mediada pela fosforilação pela proteinoquinase dependente de cAMP. A forma não fosforilada é inactiva (Uno, I., Matsumoto, K., Adachi, K., Ishikawa, T. (1983), J. Biol. Chem., 258, 10867-10872). Além disso, o vacúolo contém uma chamada tre-halase ácida cuja função ainda não é conhecida (Harris S.D., Cotter D. A. (1988) Can. J. Microbiol. 34, 835-838).

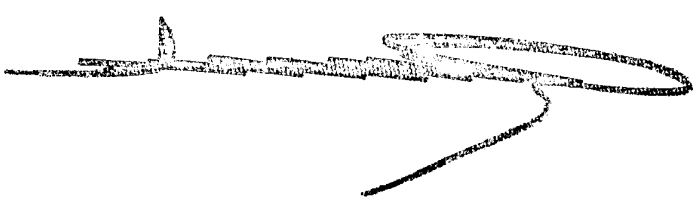
Após o impulso de glucose observa-se um aumento substancial na concentração intracelular de AMP-cíclico nos primeiros minutos da fase logarítmica que precede o crescimento. Segue-se um aumento de 6-8 vezes na actividade da tre-halase neutra concomitante com a rápida degradação da tre-halose. Após cerca de 1 hora a actividade da tre-halase neutra diminuiu até ao baixo nível de actividade medido antes da activação (Van der Plaats, J.B., Van Solingen, P. (1974) Biochem. Biophys. Res. Comm., 56, 580-587).

Enquanto que o crescimento reduzido está associado com a acumulação de tre-halose, a indução do crescimento nos restantes estágios está associada com a mobilização rápida da tre-halose devida à activação da tre-halase. A adição de uma fonte de azoto aumenta a degradação da tre-halose e impede que seja de novo sintetizada (vide Thevelein (1984) Microbiol. Rev., 48, 42-59).

Os dados da literatura sugerem claramente que durante os períodos em que é necessária a síntese de tre-halose apenas a tre-halose-6-fosfato sintetase se encontra activa enquanto que a tre-halase neutra é inactiva e assim se impede que a síntese da tre-halose e a sua degradação ocorram ao mesmo tempo.

Resumo da invenção

A presente invenção refere-se a leveduras transformadas contendo pelo menos um gene que codifique a tre-halase neutra ou a tre-halose-6-fosfato sintetase, gene esse



modificado de modo que difira do gene do tipo nativo correspondente que codifica a tre-halase neutra ou a tre-halose-6-fosfato sintetase, tendo a levedura como resultado disso um teor em tre-halose diferente do da levedura mãe não transformada. A levedura transformada, de acordo com a invenção, tem uma maior resistência ao desgaste comparada com a estirpe de levedura não transformada, sem a ocorrência dos efeitos secundários negativos previamente mencionados. Além disso, a invenção refere-se também a um método eficaz para a produção de tre-halose.

Descrição detalhada da invenção

Por "resistência ao desgaste" entende-se ao longo da presente invenção uma maior tolerância a condições de desgaste "stress", p. ex. maior pressão osmótica, temperatura elevada ou condições de secagem.

Por "rendimento de fermentação" entende-se o número de gramas de biomassa seca formada por grama de açúcares consumida.

Por "tre-halase neutra" entende-se a tre-halase citoplasmática responsável pela degradação da tre-halose.

Por "hibridação estrita" entendem-se as condições de hibridação descritas por Maniatis et al. (T. Maniatis, E.E. Fritsch, J. Sambrook (1982), Molecular Cloning, A Laboratory Manual), pp. 387-389.

Surpreendentemente, descobriu-se que tanto a tre-halase neutra como a tre-halose-6-fosfato sintetase são activas quando se efectua a síntese da tre-halose durante a produção da levedura de padeiro. Isto é inesperado porque durante a síntese da tre-halose é suposto a tre-halase neutra não ser activa. Pode aplicar-se esta descoberta ao aumento do teor em tre-halose da levedura, modificando o nível celular da tre-halase.

De acordo com um dos aspectos da presente invenção, a actividade da tre-halase neutra na célula de levedura é diminuída pela manipulação do gene da tre-halase neutra, aumentando assim o teor em tre-halose intracelular. A leve



dura assim detida terá uma maior resistência ao desgaste.

Este modo de operar tem a vantagem de os efeitos laterais, que até agora têm ocorrido simultaneamente com o aumento da tre-halose como resultado de outras modificações genéticas ou fisiológicas, não ocorrerem nas leveduras com um teor modificado em tre-halase neutra celular. Por isso, uma levedura com um nível de tre-halose elevado devido a um teor em tre-halase modificado, é apropriada para uma utilização industrial.

De acordo com a invenção, as estirpes de levedura possuem propriedades melhoradas em condições de produção e aplicação. Por propriedades melhoradas como usado na especificação relacionadas com as estirpes de levedura (modificadas) presentes, entendem-se uma maior capacidade de panificação, uma resistência à secagem especialmente melhorada em relação à estirpe correspondente não transformada (do tipo nativo) e/ou uma maior resistência ao açúcar em relação à estirpe correspondente não transformada (do tipo nativo).

Referem-se por isso métodos para a construção de estirpes de levedura com um maior teor em tre-halose comparada com o da estirpe mãe. Estes métodos compreendem o uso de gases que codificam para enzimas envolvidos no metabolismo da tre-halose, tais como a tre-halose-6-fosfato sintetase, a tre-halose-6-fosfato fosfatase e a tre-halase. Deste modo é possível regular o teor em tre-halose da célula sem interferência com outro processo metabólico (tal como descrito acima).

Numa forma preferencial de concretização da invenção isolou-se o gene que codifica a tre-halase neutra. A disponibilidade deste gene possibilita a diminuição da actividade da tre-halase na célula através da bem conhecida técnica da "disrupção de genes" (Rothstein R.J. (1983) em "Methods in Enzymology" 101, 202) do(s) respectivo(s) gene(s). Por exemplo, numa estirpe de levedura diploide, uma ou mesmo ambas as formas alternativas ("alleles") do gene de tre-halase pode(m) ser inactivada(s) (assumindo que num genoma haploide está presente uma cópia do gene de tre-halase).

Numa outra forma de concretização da invenção pode modificar-se o gene de tre-halase neutra de tal mo-



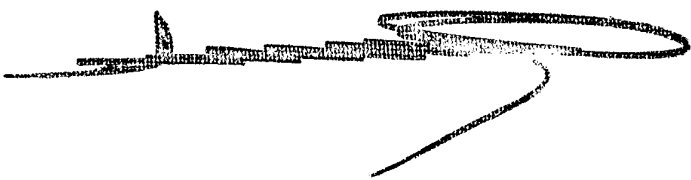
do que se modifique uma posição de fosforilação da tre-halase, não podendo assim ocorrer mais a fosforilação. É conhecido da literatura que a tre-halase neutra se activa através da fosforilação, activação essa que é catalisada por uma proteinoquinase dependente de cAMP. A tre-halase não fosforilada tem uma actividade muito mais baixa. Pode modificar-se a posição de reconhecimento do consenso da proteinoquinase dependente de AMP cíclico, de modo a que a fosforilação não possa voltar a ocorrer. Isto gera um gene que codifica uma tre-halase neutra modificada que já não pode ser activada por fosforilação. Qualquer actividade residual da tre-halase não fosforilada pode também ser importante para a fisiologia da célula. Este processo alternativo pode por isso ser muito bem o escolhido no caso de ser essencial alguma mobilização da tre-halase durante a formação da biomassa ou no período inicial de actuação da levedura de padeiro na massa.

Numa outra forma de concretização da invenção mutageniza-se aleatoriamente o gene que codifica a tre-halase neutra. Isolam-se os genes que codificam para a tre-halase com menor actividade e usam-se para substituições de genes do(s) gene(s) não modificado(s) de uma estirpe de levedura. Também este processo levará a uma actividade geral mais baixa da tre-halase e, deste modo, a um maior nível de tre-halose.

Numa outra forma de concretização da invenção coloca-se o gene que codifica a tre-halase neutra sob controle de um promotor indutível permitindo assim a expressão controlada deste gene. Isto possibilitará tornar o gene activo em condições em que a actividade da tre-halase é benéfica para a célula e impedir a sua expressão genética em condições em que se pretenda um nível de tre-halose elevado estável, por exemplo no fim do período de produção da biomassa de levedura.

Numa outra forma de concretização da invenção coloca-se o gene que codifica para a tre-halase neutra sob controle de um promotor mais fraco do que o promotor deste gene particular.

Ainda numa outra forma de concretização da invenção pode regular-se a expressão do(s) gene(s) da tre-halase neutra por meio de um processo de RNA de sentido inverso.

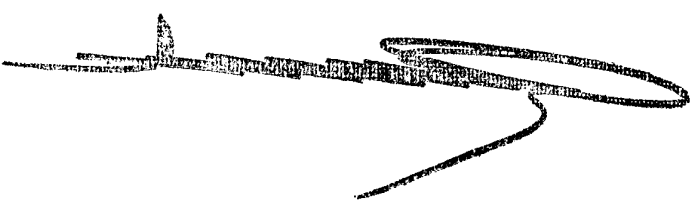


Neste caso, constroi-se RNA de sentido inverso do gene da tre-halase neutra (ou de partes dele) na célula por clonagem da região codificante (ou partes dela) em orientação oposta atrás de um promotor. O RNA sintetizado a partir deste gene pode fazer emparelhamento de bases com o RNA normal da tre-halase neutra, impedindo assim a sua translação. A eficiência com que se forma finalmente o RNA de cadeia dupla determina o nível de síntese de tre-halase neutra. Deste modo, este processo é uma alternativa para regular a expressão de genes e tem interesse no caso de o genoma conter uma família de genes de tre-halase. Dado que o RNA de sentido inverso actua de forma trans, essa família de genes pode regular-se de modo simples.

Numa outra forma de concretização da invenção isola-se o gene que codifica a tre-halase ácida vacuolar. Com este gene como instrumento pode modificar-se este tipo de actividade da tre-halase, por exemplo através de técnicas de disrupção de genes, de engenharia de proteínas, ou permuta de promotores (indutível, fraco). Este processo é útil quando, na ausência de qualquer actividade de tre-halase neutra, ocorre ainda uma substancial mobilização de tre-halose através da tre-halase ácida. Por isso, este processo pode utilizar-se para obter um nível óptimo de tre-halose na célula.

Ainda numa outra forma de concretização clonam-se genes que codificam enzimas directamente envolvidos na síntese da tre-halose, tais como tre-halose-6-fosfato sintetase e tre-halose-6-fosfato fosfatase. O aumento da velocidade da biossíntese da tre-halose é um outro processo directo para aumentar o nível da tre-halose. Tal aumento pode obter-se por meio de técnicas de engenharia genética aplicadas a esses genes biossintéticos de tre-halose (aumento do número de cópias de genes, engenharia de proteínas para alterar actividades específicas, uso de outros promotores, etc.).

Todas estas formas de concretização acima mencionadas têm em comum o uso de genes que codificam para enzimas directamente envolvidos no metabolismo da tre-halose para aumentar o nível de tre-halose na célula. Esse aumento de nível é vantajoso em condições de desgaste, como aquecimento, presão osmótica, secagem, congelamento da massa e outras.



As leveduras obtidas pelas técnicas acima mencionadas podem usar-se em programas de melhoramento de es tirpe, usando técnicas como transformação através do DNA, bem como técnicas como fusão de protoplasto, acoplamento de massa ou mutação. São também possíveis combinações destas técnicas. Por exemplo, podem cruzar-se leveduras transformadas com outra estirpe (de produção). As estirpes de levedura obtidas com estes programas de melhoramento estão também abrangidas no âmbito da invenção.

De acordo com a invenção utiliza-se uma estirpe de levedura pertencente ao género Saccharomyces ou ao género Kluyveromyces, empregando-se com vantagem uma estirpe pertencente a S. cerevisiae.

A presente invenção refere-se também a métodos de preparação de massas (massas normais e congeladas), pão e produtos similares, usando a levedura de acordo com a invenção para gerar dióxido de carbono.

A presente invenção refere-se ainda a leveduras com um alto teor em tre-halose celular permitindo assim um método eficiente para a produção de tre-halose.

Técnicas de clonagem

Em relação a técnicas gerais de clonagem existem referências no manual de Maniatis et al. (T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual). Os enzimas de restrição utilizaram-se como recomendado pelo fabricante e foram fornecidos por New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Boehringer Mannheim (Boehringer). São em geral necessárias 1 a 5 unidades de enzima para cindir 1 ug de DNA.

A transformação de E. coli efectuou-se usando a técnica de CaCl_2 (T. Maniatis et al., vide acima).

Noutros aspectos a invenção refere-se a um plasmídeo recombinante ou a um vector que compreenda pelo menos parte de um gene de tre-halase neutra e em que o gene de tre-halase neutra tenha sido opcionalmente modificado de modo a que o referido gene codifique para uma tre-halase com uma acti-



vidade mais baixa do que a codificada pelo gene correspondente do tipo nativo. Refere-se também a um plasmídeo recombinante ou vector que compreenda pelo menos parte de um gene de tre-halose-6-fosfato sintetase em que o gene de tre-halose-6-fosfato sintetase tenha sido opcionalmente modificado de modo a que o referido gene codifique para uma tre-halose-6-fosfato sintetase com uma actividade maior do que a codificada pelo gene correspondente do tipo nativo. Todas as publicações e registos de patentes citados nesta especificação são aqui incorporadas como referência, como se cada publicação ou registo de patente individual fosse específica e individualmente indicado para ser incorporado como referência.

Embora a presente invenção tenha sido descrita com algum pormenor, de um modo ilustrativo e exemplificado para fins de clareza e compreensão, será evidente para o especialista na matéria, à luz dos ensinamentos desta invenção, que certas alterações e modificações lhe poderão ser feitas sem alterar o espírito e âmbito das reivindicações que se seguem.

Os dados experimentais seguintes destinam-se a ilustrar a invenção. Deve entender-se que um especialista na matéria e familiarizado com os métodos pode utilizar outras estirpes de leveduras e vectores que possam ser igualmente usados para atingir os objectivos da presente invenção. Estas alterações estão também abrangidas no âmbito da invenção.

Lista de registos (clono, estirpes e linha celular de hibridoma)

Os clonos fogos seguintes, estirpes ou linhas celulares foram registados em CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures Oosterstraat 1, 3742 SA Baarn, o Netherlands, e em ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) (PHLS-Centre for Applied Microbiology and Research, Port Down, Salisbury, Wiltshire SP4, OJG, UK).

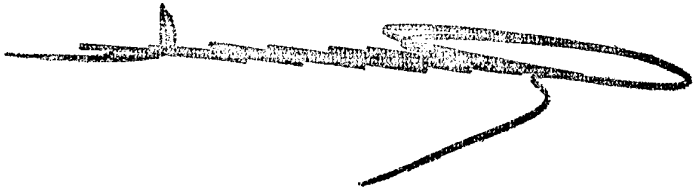


clono lambda gt 11	Nº de registro	Data do registro
lambda TRE 16.1.1	CBS 512.90	Novembro 22, 1990
Estirpes	Nº de registro	Data do registro
<u>Saccharomyces cerevisiae</u> GRD 11-21 (estirpe G)	CBS 154.91	Março 5, 1991
<u>Saccharomyces cerevisiae</u> 227 Ng	CBS 155.91	Março 5, 1991
<u>Saccharomyces cerevisiae</u> 237 Ng (estirpe A)	CBS 158.86	Março 25, 1986
<u>Escherichia coli</u> plasmídeo de recepção pTRE16.1.1	CBS 115.91	Fevereiro 19, 1991
<u>Escherichia coli</u> plasmídeo de recepção pTZ19R	CBS 405.87	Setembro 3, 1987
linha celular de hibridoma produtora do anticorpo mono- clonal 41-2F10	ECACC 90121901	Dezembro 14, 1990

Breve descrição do desenho

A Figura 1 mostra a estrutura do plasmídeo pTRE16G418-2. As setas indicam a direcção de transcrição. A orientação do segmento 16.1.1 ainda não é conhecida.

Abreviaturas: G418-res, gene Tn5 que confere resistência a G418; promotor ADH, promotor de Saccharomyces cerevisiae do gene ADHI, ligado a G418-res; fl ori, origem de replicação do fago fl; ampR, gene de resistência à ampicilina; 16.1.1, inserção de levedura como também presente em lambda TRE 16.1.1, contendo parte do gene de tre-halase neutra. Além disso, indicam-se as posições de restrição relevantes. As



duas posições EcoRI nos limites do segmento 16.1.1 não estão necessariamente presentes na posição correspondente do genoma de Saccharomyces cerevisiae. Pelo menos uma destas posições resulta do modo como foi construído o banco de cDNA de λ gt 11. No círculo interior, indica-se o comprimento em pares de bases.

EXEMPLO 1

ACTIVIDADE DA TRE-HALASE E TEORES EM TRE-HALOSE DA LEVEDURA DE PADEIRO.

Fermentação aeróbica (alimentação descontínua)

Preparou-se uma pasta de levedura usando uma estirpe de levedura Saccharomyces cerevisiae 227 Ng.

Cultivou-se uma amostra de cultura liofilizada, do modo habitual, até se obter a quantidade desejada de levedura semeada. Para a cultura de levedura usaram-se fermentadores de laboratório com um volume de 10 litros (volume útil : 6 litros), equipados com um dispositivo para alimentação contínua de melaços e de uma fonte de azoto assimilável. Os fermentadores tinham também um dispositivo para a regulação do pH e controle de temperatura. A fermentação efectuou-se essencialmente de acordo com o processo de G. Reed e H.J. Peppler, Yeast Technology, The AVI Publishing Company Inc., Westport Connecticut, USA, 1973. As condições da cultura foram, em particular:

- Mistura de melaços, constituída por 80% em peso de melaço de beterraba e 20% em peso de melaço de cana, calculado na base de 50% de açúcar;
- Alimentação de melaços (de acordo com Reed e Peppler, pag. 78/79) conforme indicado na Tabela 1;
- Adicionou-se a quantidade necessária de fosfato na forma de monofosfato de amónio, antes da inoculação;
- Adicionou-se a quantidade necessária de azoto na forma de uma solução aquosa de NH_3 a 10%, de acordo com a Tabela 1 abaixo;
- Manteve-se a temperatura a 30°C durante todo o período de fermentação;
- Manteve-se o pH (segundo Reed e Peppler, pag. 67/68) a 5.0

- durante todo o processo de fermentação;
- Adicionou-se vitamina B₁ numa quantidade de 6 mg/kg de melaços e 50% de açúcar no estágio inicial da fermentação.

A levedura obtida nestas fermentações concentrou-se e lavou-se com água corrente numa centrífugadora de laboratório.

Tabela 1

Tempo horas	g de melaços até 50% de açúcar (no total)	g de amoníaco até 10% (no total)
0.00	49	20
1.00	49	20
2.00	49	20
3.00	69	23
4.00	108	32
5.00	168	52
6.00	246	77
7.00	325	102
8.00	404	132
9.00	503	166
10.00	601	200
11.00	700	228
12.00	798	228
13.00	897	228
14.00	976	228

Determinaram-se os níveis de enzima em amostras tomadas durante as fermentações de alimentação descontínua.

Após filtração, ressuspenderam-se os pelletizados em tampão de extracção (MES, 25 mM; CaCl₂, 2.5 mM; PMSF, 1 mM; pH = 7). Efectuaram-se os extractos celulares adicionando esferas de "Bammotini" (3 g/ml) e agitando num agitador tubular Vibrax VXR, por 3 vezes, durante 3 minutos, arrefecendo entre os períodos de agitação (0°C). Centrifugaram-se os extractos durante 10 minutos a 1200 x g e dialisaram-se durante



a noite contra o tampão (MES, 5 mM; CaCl_2 , 2.5 mM; pH = 7).

A determinação da actividade de tre-halase nos extractos celulares livres efectuou-se de acordo com o método de Thevelein, J.M., Van Laere, A.J., Beullens, M., Van Assche, J.A., Carlier, A.R. (1983) J. Gen. Microbiol., 129, 716-726, com a excepção de se ter usado tetrametilbenzidina como reagente de glucose em vez de o-dianisidina. Define-se 1 U de actividade de tre-halase como 1 umol de glucose produzida por minuto.

Determinou-se o teor em tre-halose das células por HPLC do modo seguinte: filtraram-se as amostras de fermentação, lavaram-se e ferveram-se a seguir. Após centrifugação para remover os fragmentos celulares maiores, diluiu-se o sobrenadante com acetonitrilo e água até uma concentração final de acetonitrilo de 50% (v/v). Filtrou-se a amostra (0.45 um) antes de se aplicar a uma coluna de hidratos de carbono com uma pré-coluna RCSS e se eluir com acetonitrilo/água, 4:1. Determinaram-se os teores em tre-halose com um detector de índice de refração e um integrador.

Determinou-se a proteína dos extractos celulares livres pelo método BCA (Pierce). Utilizou-se BSA como padrão.

A tre-halase neutra revelou-se constantemente activa durante a fermentação com alimentação descontínua, mesmo quando a acumulação de tre-halose se inicia aproximadamente após 9 horas de fermentação (vide Tabela 2). Este resultado não era esperado pois é suposto a tre-halase ser inactiva durante a síntese da tre-halose.

A ideia de baixar a actividade de tre-halase neutra da célula baseou-se neste resultado inesperado de a tre-halase ser activa ao longo do processo de fermentação descontínua.

Tabela 2

Horas	Tre-halose % (w/w)	Tre-halase (mU/g de peso seco)
2	0.3	5.1
3	0.3	6.2
4	-	6.0
5	0.4	5.4
6	0.1	6.8
7	0.1	6.2
8	0.1	5.9
9	0.3	6.1
10	0.6	7.0
11	1.8	6.3
12	2.7	7.2
13	3.6	7.5
14	4.1	7.8
14.5	5.2	7.7
15	5.1	7.3

EXEMPLO 2

ISOLAMENTO DOS CLONOS LAMBDA FAGOS CONTENDO PARTE DO GENE QUE
CODIFICA PARA A TRE-HALASE NEUTRA

Isolou-se o DNA que codifica a tre-halase neutra por imuno-selecção ("Screening") de uma biblioteca de expressão de cDNA lambda gtl1. Utilizou-se um anticorpo monoclonal (abreviado por 41-2F10) dirigido contra a subunidade de 80 kd da tre-halase neutra. Este anticorpo monoclonar foi registado em 14 de Dezembro de 1990 na "European Collection of Animal Cell Cultures" (ECACC), PHLS-Centre for Applied Microbiology and Research, Port Down, Salisbury, Wiltshire SP4, OJG, Reino Unido, com o nº. 90121901. Este anticorpo monoclonal reage com uma banda de 80kd num teste de "Western blot" preparado a partir de um gel SDS-PAGE ao qual se aplicou um extracto celular



livre de Saccharomyces cerevisiae. Assim, após incubação do anticorpo monoclonal acoplado a esferas de agarose (Afti-Gel Hz hidrazida, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca, USA) com um extracto celular livre de Saccharomyces cerevisiae a actividade de tre-halase neutra liga-se especificamente ao material do gel. Após centrifugar e sedimentar as esferas detecta-se menos de 1% de actividade de tre-halase neutra no sobrenadante.

A biblioteca de cDNA de levedura lambda gtl1 foi fornecida por Clontech laboratories, Inc. 4030 Fabian way, Palo Alto, California 94903 USA. Esta biblioteca (nº de catálogo YL 1005b, nº de lote 3411) seleccionou-se com o anticorpo monoclonal 41-2F10 de acordo com processos descritos no sistema de selecção imunológica Protoblot[®] de Promega (nº de catálogo S3710). Para outros processos de selecção veja-se também Huynh T.V., Young R.A. e Davis R.W. (1985) em: DNA cloning, A practical approach, vol. 1 (D.M. Glover, ed.), pag. 49-78, IRL Press, Oxford.

Isolaram-se vários clonos com reacção positiva. Avalisou-se posteriormente o lambda TRE16.1-1 (vide abaixo). Este clono fago foi registado no Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Oosterstraat 1, 3742 SA Baarn, the Netherlands on November 22, 1990 com o nº. CBS 512.90.

Um processo apropriado para propagar o clono fago registado encontra-se descrito em Huynh T.V. et al. (vide acima). Usou-se a estirpe de E. coli Y1090 (ATCC nº 37197) como hospedeira para a propagação do clono fago (vide também Huynh T.V., ibid).

EXEMPLO 3

CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

a) pTRE16.1.1

Clonou-se a inserção de levedura do lambda TRE16.1.1 no vector pTZ19R comercialmente disponível (Pharmacia). Este vector foi registado no "Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Holanda, com o nº 405.87. O processo de clonagem foi o seguinte:



Amplificou-se primeiro a inserção de le vedura. Tal efectuou-se essencialmente como descrito em "PCR Protocols, a guide to methods and applications (Eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky e T.J. White 1990), pag. 253-258", com as seguintes modificações: utilizaram-se áreas ("plaques") em vez de uma suspensão de fagos; o tampão 10 x Taq polimerase contém 20 mM MgCl₂; o ciclo térmico foi: 94º C durante 2 minutos, 55º C durante 2 minutos, 72º C durante 3 minutos. Os iniciadores ("primers") de oligonucleótido usados nesta reacção são complementários às sequências de DNA que rodeiam a posição de clonagem EcoRI do vector lambda gt11. As suas sequências são 5'-GGCGACGACTCCTGGAGCCCG-3' e 5'-CACCGACCAACTGGTAATGG-3'. Após incubação passou-se a mistura reaccional através de uma minicoluna BIO-RAD RDP para purificar o DNA (remoção de nucleótidos).

Em segundo lugar, digeriu-se o produto de PCR com EcoRI e clonou-se em pTZ19R x EcoRI para criar o plasmídeo pTRE16.1.1. Este clono registou-se no CBS com o nº 115.91 (em 19 de Fevereiro de 1991).

b) Construção de pTRE16G418-2

Para se guarnecer o pTRE16.1.1 com um marcador de selecção dominante, efectuou-se a seguinte ligação. Isolou-se um fragmento BglIII de 1.9 kb contendo o gene G418^{res}, sob controle do promotor ADHI, após digestão do plasmídeo pRBN3 com BglIII. O pRBN3 encontra-se completamente descrito no registo de patente europeu EP-A-306107. Clonou-se este fragmento BglIII de 1.9 kb na posição BamHI do pTRE16.1.1. Obteve-se assim o pTRE16G418-2 (vide Figura 1).

EXEMPLO 4

CONSTRUÇÃO DE ESTIRPES DE LEVEDURA COM UM GENE DE TRE-HALASE NEUTRA DISRUPCIONADO RESULTANDO NUMA MENOR ACTIVIDADE DA TRE-HALASE NEUTRA

• A inserção de levedura no pTRE16.1.1,
• quando presente num vector de expressão, dirige a síntese de um



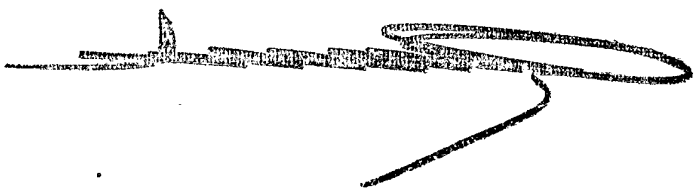
polipéptido imunologicamente activo contra um anticorpo monoclonal dirigido contra a tre-halase neutra. A inserção tem um tamanho de 1100 bp e é originária de um banco de cDNA (vide exemplos 2 e 3). Foi caracterizado com alguns enzimas de restrição como se mostra na Figura 1. Nesta altura ainda não era conhecido de que parte do gene esta inserção era originária. Considerando o peso molecular estimado da proteína tre-halase neutra num gel desnaturante (cerca de 80 kd (H. App e H. Holzer, J. Biol. Chem. 264, 17583, 1989), a inserção de levedura de 1100 bp muito provavelmente não contém o gene completo.

De acordo com uma forma de concretização da invenção obtém-se uma estirpe de levedura com uma actividade diminuída de tre-halase neutra. Uma maneira de obter tal levedura é disromper o gene que codifica a tre-halase neutra. Em geral, tendo-se clonado um gene ou parte de um gene, há vários métodos para disromper esse gene particular no genoma (vide "Methods in Enzymology, vol. 185, cap. 23: Manipulating yeast genome using plasmid vectors", por T. Stearns, H. Ma e D. Botstein, 1990, Academic Press).

Num dos métodos, a cópia do plasmídeo do gene (i.e. tre-halase neutra) é truncada de modo a que lhe falem os dois extremos (faltam as verdadeiras regiões aminoterminal e carboxiterminal). A integração desta construção no cromossoma na posição da tre-halase neutra leva a duas cópias não funcionais do gene, uma sem o seu extremo 5' e a outra sem o seu extremo 3'. Nesta invenção utilizou-se também este processo. Concluiu-se que a inserção de 1100 bp não contém muito provavelmente os verdadeiros extremos 5' e 3', mas apenas sequências internas do gene. Por isso, construiu-se o plasmídeo pTRE16G418-2 e digeriu-se com NsiI. O NsiI corta duas vezes no plasmídeo pTRE16G418-2, ambas as vezes na parte do gene da tre-halase neutra (vide Figura 1). Esta digestão gera extremos recombinogénicos e dirige a integração no local correspondente no genoma.

A análise dos transformantes obtidos está completamente descrita abaixo, mas neste ponto menciona-se ainda que os transformantes têm de facto uma actividade diminuída de tre-halase neutra. Isto prova que

1) a inserção de levedura é uma parte do gene da tre-halase neu



tra, e que

- 2) a inserção de levedura tal como está presente no pTRE16.1.1 (e no pTRE6G418-2) carece de facto de ambos os extremos da tre-halase neutra e que contém um segmento interno do gene. Neste contexto verifica-se que se isolou esta inserção de levedura a partir de um banco de cDNA. Quase todos os genes conhecidos em Saccharomyces cerevisiae não contêm intrões, e por isso admite-se que também o gene da tre-halase neutra não é cindido. Nesse caso, o clono de cDNA isolado é colinear com o segmento de gene genómico correspondente. No caso de o gene da tre-halase neutra não ter intrões, como parece, o método seguido resultará ainda para disromper o gene da tre-halase neutra.

O próprio processo de transformação efectuou-se como descrito no registo de patente europeu EP-A-306107. Utilizaram-se como hospedeiros duas estirpes de Saccharomyces cerevisiae: O Saccharomyces cerevisiae 237 Ng (registoado no CBS com o nº 158.86) e o Saccharomyces cerevisiae GRD 11-21, uma estirpe diploide (registado no CBS com o nº 154.91). Para a selecção dos transformantes utilizou-se o aminoglicósido G418.

Estas duas estirpes de Saccharomyces cerevisiae foram transformadas com pTRE16G418-2 x NsiI. De cada transformação analisou-se em detalhe um transformante. O transformante da estirpe 237 Ng abrevia-se por ApTRE-dis, o transformante da estirpe GRD 11-21 abrevia-se por GpTRE-dis.

Análises "Southern blot" do DNA genómico destes transformantes confirmaram que a integração ocorreu de facto no gene residente de tre-halase neutra. Em ambos os transformantes, disrompeu-se um alelo desta forma. Verifica-se também nos transformantes que pelo menos um alelo está ainda inalterado, uma vez que ambos os pais são pelo menos diploides (não mostrado).

Várias experiências confirmam a conclusão de que de facto o gene de tre-halase neutra foi disrompido nos transformantes (vide também Exemplo 5). Num conjunto de experiências mediram-se as actividades de tre-halase neutra da estirpe mãe A e do seu transformante ApTRE-dis. Procedeu-se do modo seguinte. Desenvolveram-se leveduras durante a noite em fras

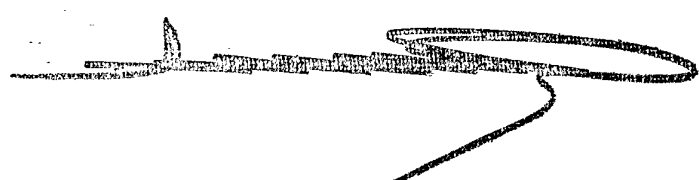
cos com agitação em glucose YEP a 2.5% ou em glicerol YEP a 2.5 %, 0.2% de glucose. Determinou-se a actividade de tre-halase neutra como descrito no Exemplo 1. As actividades medidas apresentam-se na Tabela 3. Pode concluir-se que a actividade de tre-halase neutra está significativamente diminuída em ApTRE-dis, que contém um gene de tre-halase neutra disrompido. Conclui-se que a inserção de levedura, isolada no clono lambda TRE16.1.1 contém parte do gene que codifica a tre-halase neutra.

Tabela 3

Actividade de tre-halase neutra na estirpe A e seu transformante ApTRE-dis (mU/mg de proteína de extracto celular livre)		
Estirpe	Glucose	Fonte de carbono Glicerol + Glucose
A	26.1	27.7
ApTRE-dis	12.2	14.7

O exemplo acima mencionado ilustra uma possibilidade para alterar o nível de tre-halase neutra. São também possíveis métodos alternativos. Algumas dessas possibilidades descrevem-se abaixo.

A inserção de levedura do clobo fafo isolado é adequada para efectuar experiências de disrupção de genes. Tal pode suceder do modo seguinte: em qualquer ponto de uma sequência desta levedura pode clonar-se um segmento de DNA contendo um gene que possa funcionar como marcador de selecção durante a transformação da levedura. Exemplos são o gene Ura3 (no caso da estirpe de levedura hospedeira recipiente ter uma auxotrofia ura³⁻) e os chamados marcadores de selecção dominantes. Estes conferem resistência a antibióticos tais como gentamicina, hygromicina B e phleomicina ou a herbicidas como sulfo-meturon-metil. Exemplos são o gene G418, que confere resistência à gentamicina, sob controle de um promotor de S. cerevisiae (vide por exemplo EP 0306107), e o gene SMR1-410 de S. cerevisiae, que confere resistência ao sulfometuron-metil (vide Casey



G., Xiao, W. e Rank G.H., J. Inst. Brew. 1988, 94, 93-97). Deste modo, podem construir-se plasmídeos contendo um gene de tre-halase disrompido, interrompido por DNA de marcador de selecção (vide acima). Uma cassette deste tipo pode remover-se da estrutura do vector e usar-se em experiências de transplantação de genes, bem descritas para leveduras (Rohstein, R.J., acima). Deste modo, pode destruir-se um gene de tre-halase, de que resulta uma menor actividade de tre-halase e consequentemente um maior teor em tre-halose. Deverá reconhecer-se que no caso da estirpe hospedeira conter vários genes de tre-halase, o processo da transplantação de genes pode repetir-se várias vezes (por exemplo usando marcadores de selecção diferentes). Os genes assim alterados podem integrar-se no genoma de uma levedura usando a técnica da transplantação de genes.

Utilizando a inserção de levedura 16.1.1 como sonda, pode seleccionar-se uma biblioteca genómica Saccharomyces cerevisiae. Daqui resultará finalmente o isolamento de clones contendo o gene completo de tre-halase neutra e as suas sequências de flanco (regiões promotor/terminador). Assim, usando técnicas padrão, pode substituir-se o promotor de tre-halase neutra por um promotor diferente, de preferência por um promotor homólogo. Os genes assim alterados podem integrar-se no genoma usando técnicas de substituição de genes (Rothstein R.J., acima). Isto permitirá mudar a expressão do gene de tre-halase neutra de tal modo que resulte finalmente um nível mais baixo de tre-halase. Usando procedimentos padrão, pode mutogenizar-se o gene de modo a codificar para uma tre-halase neutra alterada que já não possa ser fosforilada.

Deve compreender-se que os métodos acima mencionados não são de modo algum exaustivos.

EXEMPLO 5

NÍVEIS DE ACTIVIDADE DE TRE-HALASE EM ESTIRPES A E ApTRE-dis, DETERMINADAS EM CULTURA CONTÍNUA

Uma vez que a actividade de tre-halase neutra é provavelmente regulada pela velocidade de crescimento

das células, determinou-se o efeito da disrupção do gene da tre-halase neutra a duas velocidades de crescimento diferentes. Para comparar a espécie mãe e o mutante em condições idênticas, mediu-se a actividade de tre-halase neutra em células crescendo em estado estacionário, numa cultura contínuo.

Desenvolveram-se a estirpe A e a estirpe ApTRE-dis em descontínuo ("batch") durante 24 horas em fermentador Applikon (Applikon Dependable Instruments, Schiedam, Holanda) com um volume de trabalho de 2 litros. As condições de meio e de cultura foram as essencialmente descritas por E. Postma, W.A. Scheffers, J.P. Van Dijken (1989), Yeast 5, 159-165.

Após começar a alimentação a uma velocidade de diluição de 0.06 h^{-1} a cultura atingiu o estado estacionário ao fim de 65 horas, e permaneceu nesse estado durante um dia. No decorrer desse dia tiraram-se amostras. Aumentou-se então a alimentação para uma velocidade de diluição de 0.15 h^{-1} . 48 horas mais tarde atingiu-se o estado estacionário e retiraram-se amostras.

A actividade da tre-halase neutra é claramente dependente da velocidade de crescimento, como se pode ver na Tabela 4. Tanto a espécie mãe como o mutante de disrupção revelaram actividades mais elevadas a $D = 0.06 \text{ h}^{-1}$. Em ambas as velocidades de diluição a actividade de tre-halase neutra do mutante de disrupção era cerca de metade da actividade da estirpe mãe. Isto mostra que, independentemente da velocidade de crescimento, a diminuição da actividade da tre-halase neutra é maior ou menor equivalente ao número de cópias do gene.

Tabela 4

D (h^{-1})	Actividade de tre-halase (U/g de peso seco)	
	A	ApTRE-dis
0.06	11.6	4.8
0.15	7.9	3.3



EXEMPLO 6

TEORES EM TRE-HALOSE DE MUTANTES DE DISRUPÇÃO DE TRE-HALASE DA LEVEDURA DE PADEIRO

Para determinar o efeito da disrupção de uma cópia do gene que codifica a tre-halase neutra sobre os teores em tre-halose das células na fase estacionária, efectuou-se a experiência seguinte:

Desenvolveram-se as estirpes A, G, ApTRE-dis e GpTRE-dis, em experiências duplas, durante a noite, em frascos de 500 ml com agitação, contendo 100 ml de meio YEP com 5% de glucose. Recolheram-se as células na fase estacionária, reuniram-se e ressuspenderam-se a $t = 0$ minutos em 70 ml de meio YEP fresco contendo 0.5% de glucose. Retiraram-se amostras de 90 em 90 minutos até $7 \frac{1}{2}$ horas.

Determinou-se o teor em tre-halose das células, por HPLC, do seguinte modo: filtraram-se as amostras de fermentação, lavaram-se e ferveram-se a seguir. Após centrifugação para remover os fragmentos celulares maiores, injectou-se o sobrenadante directamente numa coluna Bio-Rad Aminex HPX 87-H. A temperatura da coluna era de 65°C e efectuou-se a eluição com $0.01 \text{ N H}_2\text{SO}_4$. Determinou-se o teor em tre-halose por meio de um detector de índice de refração e de um integrador.

Os extractos celulares livres prepararam-se como descrito no Exemplo 1, com a excepção de não se terem dialisado. Determinaram-se os níveis de tre-halase nos extractos celulares livres como descrito no Exemplo 1.

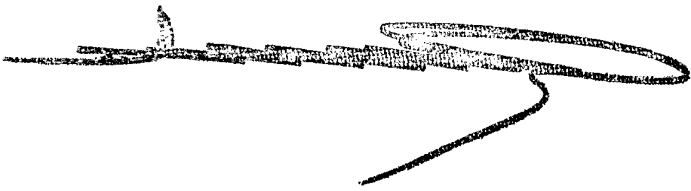
A Tabela 5 mostra a todos os tempos diferenças claras entre os níveis de tre-halose nas estirpes mãe e disrompidas. A estirpe A tem inicialmente um teor maior em tre-halose que é, nas condições das experiências, menos estável do que o teor em tre-halose da estirpe G inicialmente mais baixo.

A actividade da tre-halase neutra na estirpe G era claramente mais baixa comparada com a actividade na estirpe A (Tabela 5). Além disso, tanto na estirpe ApTRE-dis como na estirpe GpTRE-dis, os níveis de tre-halase eram mais baixos em relação aos das estirpes mães (Tabela 5).

Deste modo, baixando a actividade de tre-halase neutra por disrupção do gene estrutural que codifica a tre-halase neutra, é possível obter uma levedura com um maior teor em tre-halose. Esta levedura revelou-se muito útil para aplicação industrial.

Tabela 5

Horas	Tre-halose (% , w/w)				Tre-halase (U/g de peso seco)			
	A	ApTRE -dis	G	GpTRE -dis	A	ApTRE -dis	G	GpTRE -dis
0	5.7	7.9	2.6	3.5	4.4	3.0	1.3	0.2
1 1/2	3.7	6.0	2.7	3.6	5.5	3.2	1.3	0.9
3	2.1	5.3	2.7	3.3	3.9	3.8	1.5	1.4
4 1/2	1.2	3.1	2.6	3.5	5.3	4.8	2.1	1.6
6	0.6	2.8	3.1	4.0	5.0	5.0	2.0	1.6
7 1/2	0.1	2.5	3.2	4.3	5.4	4.6	2.7	2.0
Os dados representam valores médios de experiências duplas								



REIVINDICAÇÕES

- 1a -

Processo para a preparação de uma levedura transformada, com um teor em tre-halose diferente do da levedura mãe não transformada, caracterizado por se modificar pelo menos um gene que codifique a tre-halose neutra e/ou a síntese do 6-fosfato de tre-halose, de modo que este gene difira do gene nativo que codifica a tre-halose neutra e/ou a sintase do 6-fosfato de tre-halose.

- 2a -

Processo para a preparação de uma levedura transformada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter uma levedura com um maior teor em tre-halose comparada com a levedura mãe não transformada.

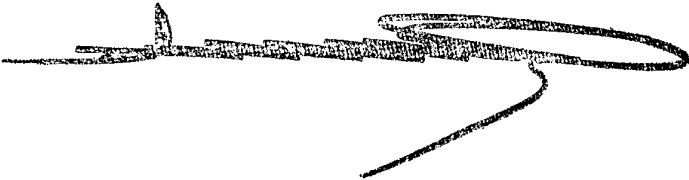
- 3a -

Processo para a preparação de uma levedura transformada, de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado por o gene que codifica a tre-halose neutra (pelo menos um) ter sido modificado por disrupção.

- 4a -

Processo para a preparação de uma levedura transformada, de acordo com as reivindicações 1 ou 2, ca-

- 27 -



racterizado por se modificar a expressão do gene que codifica a tre-halose neutra por meio de um promotor indutível.

- 5ª -

Processo para a preparação de uma levedura transformada, de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado por o gene que codifica a tre-halase neutra (pelo menos um) ter sido modificado de modo a alterar uma posição de fosforilação da tre-halase.

- 6ª -

Processo para a preparação de uma levedura transformada, de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5, caracterizado por o gene modificado (pelo menos um) ser menos activo do que o gene correspondente do tipo nativo na degradação da tre-halose durante a síntese da tre-halose.

- 7ª -

Processo para a preparação de uma levedura obtida por processos de melhoramento de estirpe, que não a transformação de DNA, caracterizado por se usar uma levedura de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6.

- 8ª -

Processo para a preparação de uma levedura transformada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizau

- 28 -

do por a referida levedura pertencer ao gênero Saccharomyces.

- 9a -

Processo para a preparação de uma levedura na forma de pasta, comprimido, congelada, seca ou instantânea, caracterizado por se utilizar uma levedura de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8.

- 10a -

Processo para a preparação de uma levedura, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por a referida levedura pertencer ao gênero Saccharomyces cerevisiae.

- 11a -

Processo para a preparação de uma massa para panificação, ou de um produto semelhante, caracterizado por se utilizar uma levedura transformada de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 9.

- 12a -

Processo para a preparação de tre-halose, caracterizado por se utilizar uma levedura de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8.

- 13a -

Processo para a preparação de um gene ou de uma parte de um gene, que codifique para a tre-halose neutra, caracterizado por se encontrar numa forma purificada e isolada e ser constituído por:

- i) a inserção de DNA 16.1.1 no plasmídeo pTRE 16.1.1 (CBS 115.91),
- ii) um DNA capaz de hibridizar em condições estritas com o DNA do i) ou
- iii) um DNA diferente dos DNA's de i) e ii) na sequência de codão, devido à degenerescência do código genético.

- 14a -

Processo para a preparação de um plasmídeo ou vector recombinante, contendo um gene de ter-halase neutra, caracterizado por se modificar opcionalmente o gene de tre-halase neutra de modo que o referido gene codifique para a tre-halase com uma actividade mais baixa do que a do gene correspondente do tipo nativo.

- 15a -

Processo para a preparação de um plasmídeo ou vector recombinante, contendo um gene de sintase de 6-fosfato de tre-halose, caracterizado por se modificar opcionalmente o gene de sintase de 6-fosfato de tre-halose de modo que o referido gene codifique para a sintase de 6-fosfato de tre-halose com uma actividade mais elevada do que a do gene correspondente do tipo nativo.

A requerente reivindica as prioridades dos pedidos de patente europeia apresentados em 28 de Março de 1990 e em 20 de Dezembro de 1990, sob os N.ºs 90200757.4 e 90203462.8, respectivamente.

Lisboa, 27 de Março de 1991.
CARLOS DE OLIVEIRA, advogado, P.º 1.º



RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVAS ESTIRPES DE
LEVEDURA COM TEORES REFORÇADOS EM TRE-HALOSE"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de uma levedura transformada, com um teor em tre-halose diferente do da levedura mãe não transformada, que compreende modificar-se pelo menos um gene que codifique a tre-halose neutra e/ou a sintase do 6-fosfato de tre-halose, de modo que este gene difira do gene nativo que codifica a tre-halase neutra e/ou a sintase do 6-fosfato de tre-halose.

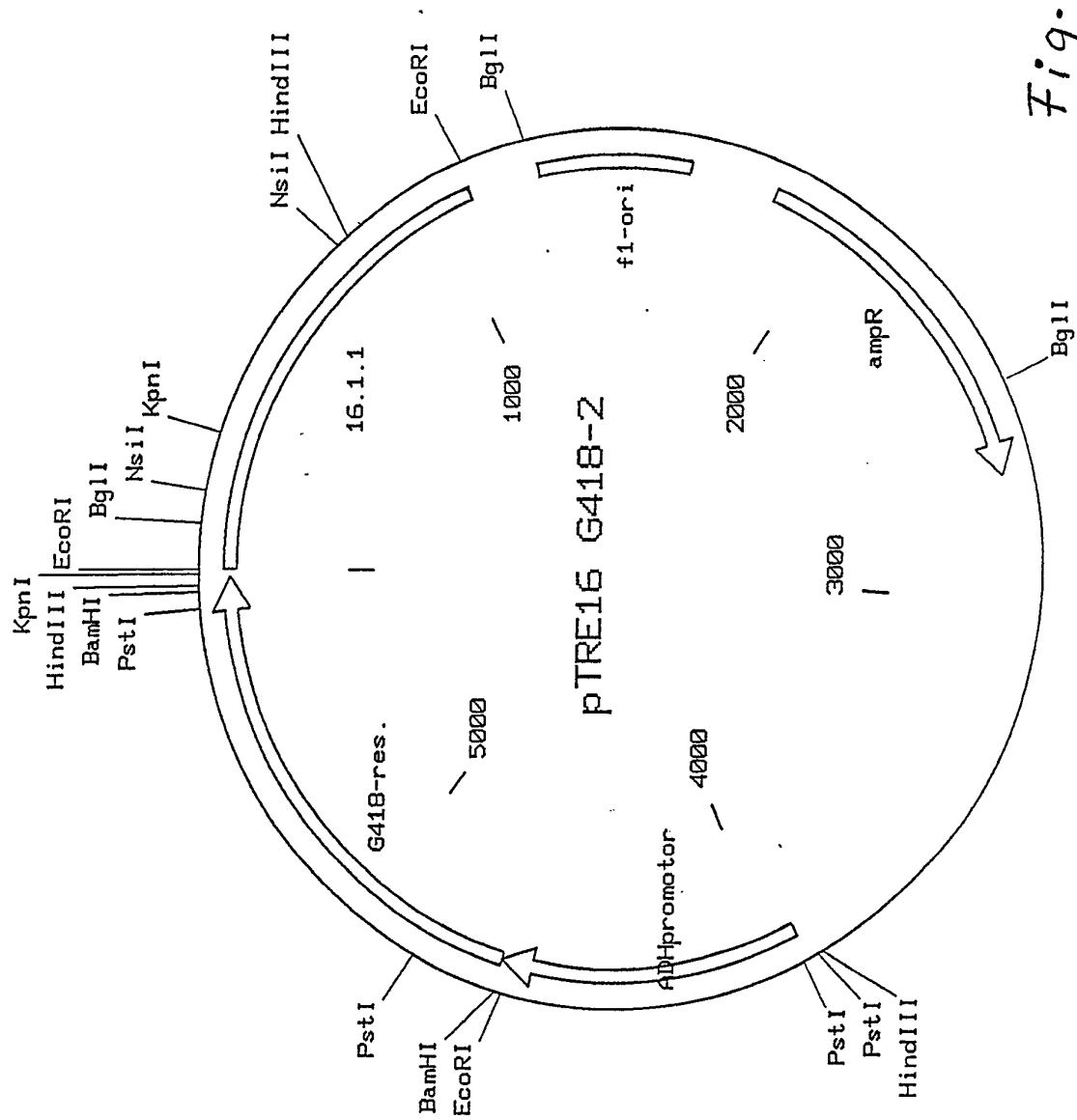


Fig. 1