



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

(11) PI 0613674-5 B1



(22) Data do Depósito: 24/07/2006

(45) Data de Concessão: 10/07/2018

(54) Título: PROCESSO PARA AUMENTAR O TEOR DE FOSFATO DOS AMIDOS DE CÉLULAS VEGETAIS GENETICAMENTE MODIFICADAS, AMIDO E FARINHA DE ARROZ

(51) Int.Cl.: C12N 15/84; A01H 5/00; A01H 5/10; A23L 7/143

(30) Prioridade Unionista: 06/01/2006 EP 06 090003.2, 06/01/2006 US 60/757,216, 10/01/2006 US 60/757,810, 22/07/2005 EP 05 090220.4, 22/07/2005 US 60/701,764, 23/12/2005 EP 05 090349.1

(73) Titular(es): BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH

(72) Inventor(es): CLAUS FROHBERG; RALF-CHRISTIAN SCHMIDT

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"PROCESSO PARA AUMENTAR O TEOR DE FOSFATO DOS
AMIDOS DE CÉLULAS VEGETAIS GENETICAMENTE
MODIFICADAS, AMIDO E FARINHA DE ARROZ".**

[001] A presente invenção se refere a um processo para aumentar o teor de fosfato de amidos de células vegetais modificadas geneticamente em comparação com os amidos de células vegetais do tipo selvagem não-modificadas geneticamente correspondentes, em que uma célula vegetal é modificada geneticamente através da introdução de uma molécula de ácido nucleico exógena que codifica uma amido sintase II solúvel e esta amido sintase II é superexpressa.

[002] Além disso, a presente invenção se refere ao amido de arroz e à farinha de arroz com propriedades com qualidade aumentada, a grãos de arroz que compreendem este amido de arroz e às plantas de arroz nas quais estes grãos de arroz crescem.

[003] O arroz é o alimento mais importante para mais da metade da população mundial. Em alguns países, o arroz corresponde até aproximadamente 80% de toda a ingestão alimentar. A produção anual em todo o mundo é de 550 milhões de toneladas de arroz.

[004] O grão de arroz consiste em aproximadamente 76% de amido e aproximadamente 7-8% de proteína. Contém apenas 1,3% de gordura e um grande número de elementos-traço (0,6%) tais como fósforo, ferro e magnésio.

[005] A espécie de arroz mais importante economicamente é *Oryza sativa*, cujas variedades básicas podem ser divididas em dois grupos: o grupo "indica", que inclui apenas arroz de grãos longos e o grupo "japonica", que contém arroz com grãos médios e curtos.

[006] O arroz de grãos longos (variedades de arroz cujos grãos são separados quando cozidos) vem principalmente da Índia ou de

Java; o arroz de grãos curtos (tal como "arroz doce", isto é, variedades de arroz cujos grãos ficam grudentos quando cozidos) vem primariamente do Japão. As variedades da China e do Sudeste da Ásia ficam no meio termo entre as anteriores.

[007] Em todas as variedades, por sua vez, há dois tipos principais: grão translúcido ou grão opaco. Estes diferem na composição de seu amido: o amido do arroz translúcido consiste em aproximadamente 20% de amilose e até 80% de amilopectina, enquanto que do arroz opaco, em contraste, consiste virtualmente apenas em amilopectina.

[008] A amilopectina apresenta uma estrutura em agrupamentos específica e é sintetizada por uma variedade de subunidades ou isoformas de quatro classes de enzimas: amido sintase solúvel (SS), enzimas de ramificação do amido (SBE), enzimas de desramificação do amido (SDE) e ADP glicose pirofosforilase (Nakamura 2002, Plant Cell Physiol. 43(7): 718-725).

[009] As características de cozimento e de alimentação são determinadas principalmente pelo teor de amilose do endosperma do arroz. As variedades com um baixo teor de amilose são úmidas e grudentas após o cozimento, enquanto que os grãos com um alto teor de amilose ficam secos e soltos após o cozimento (H. ten Have in Hoffmann Mudra Plarre (HMP) 1985: Lehrbuch der Züchtung landw. Kulturpflanzen, Volume 2, pp. 110-123).

[0010] A qualidade dos grãos é muito importante não somente para o consumidor, mas também para a indústria de moagem; as propriedades dos grãos tais como o tamanho do grão, o formato do grão e a qualidade do grão são características importantes uma vez que afetam o rendimento do arroz moído e a porcentagem de grãos quebrados (ten Have 1985, supra).

[0011] A farinha de arroz tem sabor relativamente neutro e, portanto, é muito adequada como a base para produtos com sabor suave ou

outros na forma de uma mistura. Graças a sua hipoalergenicidade, é também muito adequada para fórmulas para bebês ou como uma dieta para pessoas que sofrem de alergia.

[0012] Além dos óleos, das gorduras e das proteínas, os polissacáideos são os materiais brutos renováveis mais importantes das plantas. Além da celulose, o amido, que é um dos materiais de armazenamento mais importantes nas Plantas Superiores, é de grande importância entre os polissacáideos.

[0013] O polissacádeo amido é um polímero de unidades quimicamente uniformes, as moléculas de glicose. Entretanto, constitui uma mistura altamente complexa de formas diferentes de moléculas que diferem em relação a seu grau de polimerização e à ocorrência de ramificações das cadeias de glicose e seu comprimento de cadeia e, adicionalmente, pode ser derivatizado, por exemplo, fosforilado. O amido, portanto, não constitui um material bruto uniforme. Em particular, amilose amido, um polímero essencialmente não-ramificado de moléculas de glicose ligadas de forma α -1,4-glicosídica, difere de amilopectina amido, que por sua vez, é uma mistura complexa de cadeias de glicose diferencialmente ramificadas. As ramificações são formadas pela ocorrência de ligações α -1,6-glicosídicas adicionais. Nas plantas típicas utilizadas para a produção de amido industrial, por exemplo, milho, trigo ou batata, o amido sintetizado é aproximadamente 20% - 25% de amilose amido e aproximadamente 70% - 75% de amilopectina amido.

[0014] As propriedades funcionais do amido são afetadas enormemente não apenas pela proporção de amilose/amilopectina e pelo teor de fosfato, mas também pelo peso molecular, pelo padrão da distribuição de cadeias laterais, pelo teor iônico, pelo teor de lipídeos e de proteínas, pelo tamanho médio dos grãos de amido, pela morfologia dos grãos de amido e similares. As propriedades funcionais importan-

tes que podem ser mencionadas neste contexto são, por exemplo, a solubilidade, o comportamento de retrodegradação, a capacidade de ligação com a água, as propriedades formadoras de filmes, a viscosidade, as propriedades de formação de pasta, a estabilidade de congelamento-descongelamento, a estabilidade a ácidos, a concentração do gel e similares.

[0015] As vias sintéticas bioquímicas básicas que levam à síntese do amido são apenas pouco conhecidas. Entretanto, existe uma série de etapas em que os mecanismos detalhados que levam à síntese dos grânulos de amido e do amido não estão até agora elucidados e, portanto, são ainda o objetivo de pesquisa.

[0016] Não é possível atualmente influenciar o teor de fosfato do amido ligado covalentemente nas plantas através apenas do cruzamento de plantas.

[0017] Uma alternativa para os métodos de cruzamento de plantas é a modificação direcionada de plantas que produzem amido através de métodos recombinantes. O pré-requisito para isso, entretanto, é a identificação e a caracterização das enzimas que participam na síntese do amido e/ou na modificação do amido e o isolamento das moléculas de ácidos nucleicos que codificam estas enzimas e a análise funcional subsequente nas plantas transgênicas.

[0018] Nas células vegetais, a síntese do amido ocorre nos plastídeos, que são os cloroplastos no tecido fotossinteticamente ativo e os amiloplastos no tecido que armazena amido fotossinteticamente inativo. As enzimas importantes que desempenham uma função na síntese do amido são as proteínas R1 (= água diquinase alfa-glucana, E.C. 2.7.9.4; Lorberth e outros (1998) Nature Biotechnology 16: 473-477), amido sintases e as enzimas de ramificação (= BE; ver, por exemplo, Ponstein e outros, Plant Physiol. 29 (1990), 234-241; Kossmann e outros, 1991, Mol. Gen. Genet. 230, 39-44; Safford e outros, 1998, Car-

bohydrate Polymers 35, 155-168; Jobling e outros 1999, The Plant Journal 18(2): 163-171). As enzimas de ramificação catalisam a introdução de ramificações α -1,6 nas α -1,4-glucanas lineares. Nas amido sintases, foi descrita uma variedade de isoformas, das quais todas catalisam uma reação de polimerização através da transferência de um resíduo de glicosila da ADP-glicose para α -1,4-glucanas.

[0019] Uma visão geral dos amidos nativos isolados de várias espécies de plantas, em que variações das enzimas que desempenham uma função na biossíntese do amido são observadas, pode ser encontrada em Kossmann e Lloyd (2000, Critical Reviews in Plant Sciences 19(3): 171- 226).

[0020] As amido sintases (EC 2.4.1.21) podem ser divididas em duas classes: as amido sintases ligadas ao grânulo de amido ("amido sintases I ligadas ao grânulo"; GBSS I) e a amido sintase solúvel ("amido sintase solúveis"; SSS, também referida como "SS"). Esta distinção não é ambígua em cada caso uma vez que parte das amido sintases existe tanto na forma ligada ao grânulo de amido quanto na forma solúvel (Denyer e outros, Plant J. 4 (1993), 191-198; Mu e outros, Plant J. 6 (1994), 151-159).

[0021] Em contraste à GBSSI, que leva à síntese de amilose, pouco é conhecido ainda em relação à função enzimática precisa das várias classes de amido sintase solúvel na biossíntese do amido.

[0022] A caracterização bioquímica resultou na identificação das proteínas amido sintases solúveis com pesos moleculares entre aproximadamente 60 até aproximadamente 180 kDa. A clonagem dos cDNAs que codificam as amido sintases tornou possível distinguir classes diferentes que foram definidas como o resultado das homologias de sequência e como o resultado das características funcionais das amido sintases (solúveis).

[0023] Até hoje, oito classes de amido sintases foram identificadas

em plantas superiores (*inter alia* por Li e outros (2003) *Funct. Integr. Genomics* 3: 76-85):

- amido sintase I ligada ao grânulo de amido (Amido Sintase I Ligada ao Grânulo de Amido (Granule-Bound Starch Synthase I) = GBSS I) (arroz: por exemplo, Okagaki (1992) *Plant Mol Biol.* 19: 513-516; batata: van der Leij e outros (1991) *Mol. Gen Genet.* 228: 240-248; milho: por exemplo, Kloesgen e outros (1986) *Mol. Gen Genet.* 203: 237-244);
- amido sintase solúvel I (= SSI; arroz: Baba e outros (1993) *Plant Physiol.* 103: 565-573; batata: Kossmann e outros (1999) *Planta* 208: 503-511; milho: Knight e outros (1998) *Plant J.* 14: 613-622);
- amido sintase solúvel II (= SSII; ervilha: Dry e outros (1992) *Plant J.* 2: 193-202, batata: Edwards e outros (1995) *Plant J.* 8: 283-294, milho: Harn e outros, (1998) *Plant Mol. Biol.* 37(4): 639-649; trigo: Walter e outros (1996) Genbank Acc. U66377; arroz: Yamamoto e Sasaki (1997) *Plant Mol. Biol.* 35: 135-144 e cevada: Li e outros (2003), *Funct. Integr. Genomics* 3: 76-85);
- amido sintase solúvel III (= SSIII; batata: Abel e outros (1996) *Plant J.* 10:981-991; ervilha forrageira: GenBank Acc. No AJ225088);
- amido sintase solúvel IV (= SSIV; trigo: GenBank Acc. No AY044844);
- amido sintase solúvel V (= SSV; ervilha forrageira: GenBank Acc. No VUN006752; *Arabidopsis*: GenBank Acc. No AL021713; milho: WO 97/26362) e
 - dull (Gao e outros (1998) *Plant Cell* 10: 399-412);
 - amido sintase solúvel VI (= SSVI; milho: WO 01/12826).

[0024] O teor de amido fosfato ligado covalentemente varia, dependendo da espécie vegetal. Assim, por exemplo, certos mutantes de milho sintetizam amido com um maior teor de amido fosfato (milho ce-

roso 0,002% e milho com alto teor de amilose 0,013%), enquanto que as variedades de milho tradicionais contêm apenas traços de amido fosfato. Pequenas quantidades de amido fosfato são também encontradas no trigo (0,001%), enquanto não foi detectado amido fosfato em aveia e painço. Similarmente, menos amido fosfato foi encontrado em mutantes de arroz (arroz ceroso 0,003%) que nas variedades de arroz tradicionais (0,013%). Quantidades significativas de amido fosfato foram detectadas em plantas que sintetizam amido de reserva nos tubérculos ou nas raízes tais como, por exemplo, tapioca (0,008%), batata doce (0,011%), araruta (0,021%) ou batata (0,089%). Estas porcentagens para o teor de amido fosfato são em cada caso baseadas no peso seco de amido e foram determinadas por Jane e outros (1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832). Estudos sobre batatas com SSI antissenso revelaram que seu teor de fosfato era aumentado em 30-70% em relação ao tipo selvagem (WO 96/15248).

[0025] O WO 00/08184 descreve plantas em que as atividades tanto da amido sintase III (=SSIII) quanto da enzima de ramificação I (= BEI) são reduzidas. Em comparação com o amido de plantas do tipo selvagem, o amido de tais plantas revelou um teor maior de fosfato. As plantas de trigo que, como o resultado da superexpressão de um gene R1 da batata, possuem uma maior atividade de uma proteína R1 e um maior teor de amido fosfato são descritas no pedido de patente internacional WO 02/34923.

[0026] A distribuição de fosfato no amido que foi sintetizado pelas plantas (amido nativo) é geralmente distinguida pelo fato de que aproximadamente 30% até 40% dos resíduos de fosfato estão ligados covalentemente na posição C3 e aproximadamente 60% até 70% dos resíduos de fosfato na posição C6 das moléculas de glicose (Blennow e outros, 2000, Int. J. of Biological Macromolecules 27: 211-218). Em contraste, os amidos quimicamente fosforilados possuem adicional-

mente resíduos de fosfato ligados na posição C2 das moléculas de glicose uma vez que a reação química prossegue de uma maneira não direcionada.

[0027] O WO 03/023024 divulga amidos de arroz que possuem uma temperatura de início de DSC T de até 69,5°C e/ou uma temperatura máxima de DSC T de até 73,6°C; um total de aproximadamente 400 variedades de arroz dos grupos *japonica* e *indica* foi analisado em relação a estas características.

[0028] Umemoto e outros (2002, *Theor. Appl. Genet.* 104: 1-8) descrevem a análise de linhagens cultivadas de forma retrocruzada entre uma variedade *japonica* (*Nipponbare*) e uma variedade *indica* (*Kasalath*). Eles concluem partindo de seus resultados que os lóci alk(t), gel(t) e acl(t), que são responsáveis pelas temperaturas de início da gelatinização diferentes (início de DSC T) entre as variedades *japonica* e *indica*, poderiam ser a isoforma SSIIa da amido sintase.

[0029] O WO 03/023024 descreve um transformante de arroz (N° 78-1) da variedade *japonica* (*Kinmaze*) no qual foi transformado um gene de amido sintase IIa (SSIIa) da forma IR36 de *indica*. As alterações resultantes no perfil de cadeia lateral da amilopectina são mostrados e, como uma consequência, indicam uma modificação do perfil de *japonica* em direção ao da variedade *indica* (Figura 22 no WO 03/023024).

[0030] O WO 03/023024 não descreve os teores de fosfato, os teores de amilose nem as propriedades reológicas dos amidos ou das farinhas de arroz.

[0031] A relação entre a alteração no perfil de cadeia lateral da amilopectina, que é realizada pela SSIIa e a temperatura de início de DSC T dos amidos são novamente mostradas, em um artigo publicado recentemente (Nakamura e outros, (2005) PMB; 58(2): 213-27), com referência aos valores para os transformantes e para as linhagens "re-

ceptoras" e "doadoras" correspondentes (Figura 6B). A Figura 6B mostra as temperaturas para o início de DSC T dos amidos dos transformantes de SSIIa gerados. Em nenhum caso o início de DSC T é maior que 70°C. O valor de início de T mais alto detalhado aqui é de 69,5°C, como descrito também no WO 03/023024 (pp. 21-24).

[0032] Assim, nem o WO 03/023024 nem Nakamura e outros (2005) ensinam uma maneira em que podem ser gerados amidos de arroz cuja temperatura de início de DSC T excede 70°C.

[0033] Entretanto, uma temperatura de início de DSC T maior é desejada até onde esta seja uma característica importante de uma estabilidade térmica maior dos amidos e assim também para a alteração na estrutura cristalina como o resultado do efeito do calor.

[0034] Era um objetivo da presente invenção, portanto, fornecer amidos de arroz e farinhas de arroz com novas propriedades, em particular uma maior estabilidade térmica e meios e métodos para a preparação dos mesmos.

[0035] Como o aumento da expressão gênica da amido sintase solúvel II afeta as propriedades do amido nas plantas é desconhecido até agora. Um alto teor de fosfato é desejado uma vez que leva a características físico-químicas modificadas do amido e assim a novas aplicações do amido.

[0036] É, portanto, um objetivo adicional da presente invenção fornecer um processo através do qual o teor de fosfato dos amidos de plantas possa ser aumentado *in vivo*.

[0037] Estes objetivos são atingidos através do fornecimento das formas de uso especificadas nas reivindicações da patente.

[0038] A presente invenção se refere a um processo para aumentar o teor de fosfato dos amidos de células vegetais modificadas geneticamente para 150 até 500% em comparação com os amidos das células vegetais do tipo selvagem não-modificadas geneticamente cor-

respondentes (100%), em que

a) uma célula vegetal é modificada geneticamente através da introdução de uma molécula de ácido nucleico exógena que codifica uma amido sintase solúvel II e

b) esta amido sintase solúvel II é superexpressa.

[0039] No contexto da presente invenção, o termo "teor de fosfato do amido" é entendido como significando grupos fosfato que estão ligados covalentemente aos monômeros de glicose do amido.

[0040] No contexto da presente invenção, o termo "aumento no teor de fosfato dos amidos" é entendido como significando um aumento do teor de fosfato na posição C6 para 150-500%, preferencialmente para 160-400% e especial e preferencialmente para 170-380% em comparação com o amido das células vegetais do tipo selvagem correspondentes (100%).

[0041] No contexto da presente invenção, o termo "teor de fosfato na posição C6" é entendido como significando o teor nos grupos fosfato que são ligados na posição "6" dos átomos de carbono dos monômeros de glicose do amido. Em princípio, as posições C3 e C6 das unidades de glicose podem ser fosforiladas *in vivo*. No contexto da presente invenção, o teor de fosfato na posição C6 (= teor de C-6-P) é determinado através de uma determinação de glicose-6-fosfato através do ensaio visual com enzima descrito aqui abaixo (Nielsen e outros, 1994, Plant Physiol. 105, 111-117); (determinação do teor de fosfato na posição C6 (teor de C6-P)).

[0042] O que era extremamente surpreendente na presente invenção era que era possível aumentar o teor de fosfato até notavelmente mais que 150% em comparação com o do tipo selvagem (100%).

[0043] No contexto da presente invenção, a elevação do teor de fosfato dos amidos é realizada *in vivo*, não *in vitro*, tal como, por exemplo, através de fosforilação química de um amido pré-extraído.

Consequentemente, a vantagem da presente invenção é que os agentes químicos utilizados para a fosforilação química podem ser fornecidos juntamente.

[0044] No contexto da presente invenção, o termo "célula vegetal modificada geneticamente" significa que a célula vegetal é modificada geneticamente, a modificação genética levando a uma maior atividade de uma amido sintase solúvel II (=SSII) em comparação com a atividade de SSII de uma célula vegetal do tipo selvagem não-modificada geneticamente correspondente.

[0045] No contexto da presente invenção, o termo "célula vegetal do tipo selvagem" significa que são células vegetais que atuam como material de partida para o processo de acordo com a invenção, isto é, cuja informação genética, com a exceção da modificação genética que foi introduzida e que leva a uma maior atividade de uma amido sintase solúvel II (= SSII), corresponde àquela de uma célula vegetal modificada geneticamente.

[0046] No contexto da presente invenção, o termo "correspondente" significa, quando se compara um grande número de objetos, os objetos em questão, que são comparados um com os outros, são mantidos sob condições idênticas. No contexto da presente invenção, o termo "correspondente" no contexto de células vegetais do tipo selvagem significa que as células vegetais que são comparadas uma com a outra foram cultivadas sob condições de cultura idênticas e que possuem preferencialmente a mesma idade (em cultura).

[0047] O termo "idade em cultura" é entendido como significando o período ao longo do qual um organismo (planta) gasta/cresce em um meio de nutrientes. Este pode ser, por exemplo, o período de tempo desde a semeadura até a colheita ou ainda o período de tempo durante o qual as células vegetais são cultivadas em um meio de cultura de tecido até um certo estágio do desenvolvimento. No contexto da pre-

sente invenção, isto significa que as células vegetais que são comparadas com uma outra gastam o mesmo período de tempo de desenvolvimento sob as mesmas condições de cultura.

[0048] No contexto da presente invenção, o termo "molécula de ácido nucleico exógena" é entendido como significando tal molécula que não ocorre naturalmente nas células vegetais do tipo selvagem correspondentes ou que não ocorrem naturalmente nas células vegetais correspondentes na disposição espacial específica ou uma que é localizada em uma posição, no genoma de célula vegetal, em que não ocorre naturalmente. A molécula de ácido nucleico/polinucleotídeo estranho é preferencialmente uma molécula recombinante que consiste em vários elementos cuja combinação ou arranjo espacial específico não ocorre naturalmente nas células vegetais. Isto pode ser verificado, por exemplo, com o auxílio de uma análise de Southern blot.

[0049] Dentro do contexto da presente invenção, o termo "superexpresso" significa um aumento da atividade enzimática das proteínas SSII nas células vegetais modificadas geneticamente em comparação com as células vegetais do tipo selvagem não-modificadas geneticamente correspondentes. Para as finalidades da presente invenção, o termo "superexpresso" significa ainda, além disso, que as plantas ou as células vegetais que naturalmente não possuem qualquer atividade de SSI detectável, após a modificação genética de acordo com a invenção, em que uma molécula de ácido nucleico exógena que codifica uma amido sintase solúvel II é introduzida no genoma de uma célula vegetal, terão uma atividade de SSII que pode ser detectada através de um zimograma. O aumento da atividade enzimática das proteínas SSII nas células é preferencialmente determinado com o auxílio de zimogramas como descrito posteriormente aqui ("determinação da atividade de SSII através de gel").

[0050] Neste contexto, um aumento na atividade de SSII significa

um aumento na atividade de SSII em comparação com as células vegetais não-modificadas geneticamente correspondentes, para pelo menos 200%, em particular para 350-2000%, preferencialmente para 600-1500% e especial e preferencialmente para 700-1200%. No contexto da presente invenção, um "aumento da atividade de SSII" significa ainda que as plantas ou as células vegetais que não possuem atividade de SSII detectável, após a modificação genética de acordo com a invenção, em que uma molécula de ácido nucleico exógena que codifica uma amido sintase solúvel é introduzida no genoma de uma célula vegetal, terão uma atividade de SSII detectável.

[0051] No contexto da presente invenção, o termo "amido sintase solúvel II" é entendido como significando a classe II de proteínas amido sintases solúveis (ADP-glicose 1,4- α -D-glucana 4- α -D-glucosiltransferase; EC 2.4.1.21). As amido sintases solúveis catalisam uma reação de glicosilação em que os resíduos de glicose do substrato ADP-glicose são transferidos para cadeias de glucana ligadas a α -1,4 com a formação de uma ligação α -1,4 (ADP-glicose + {(1,4)- α -D-glucosil}(N) \leftrightarrow ADP + {(1,4)- α -D-glucosil}(N+1)).

[0052] A estrutura das proteínas SSII mostra uma sequência de domínios específicos. No terminal "N", as proteínas SSII possuem um peptídeo sinal para o transporte para dentro dos plastídeos. Uma região N-terminal e um domínio catalítico seguem na direção do terminal C (Li e outros, 2000, Plant Physiology 123, 613-624). Análises adicionais baseadas em comparações das sequências primárias (<http://hits.isb-sib.ch/cqi-bin/PFSCAN>) de uma variedade de proteínas SSII revelaram que as proteínas SSII possuem três domínios específicos. Estes domínios compreendem os aminoácidos que são codificados pelos nucleotídeos: pb 1190 até 1279 (= região 1), pb 1493 até 1612 (região 2) e pb 2147 até 2350 (região 3) da sequência do gene SSII do trigo que é mostrada na Seq ID No. 1.

[0053] No contexto da presente invenção, uma proteína SSII é, portanto, entendida como significando uma amido sintase solúvel cuja sequência de aminoácidos apresenta pelo menos 86%, preferencialmente pelo menos 93% e especial e preferencialmente 100% de identidade com a região 1 mostrada na Seq ID No. 3 e pelo menos 83%, preferencialmente pelo menos 86% e especial e preferencialmente 100% de identidade com a região 2 mostrada na Seq ID No. 4 e pelo menos 70%, preferencialmente pelo menos 82%, por preferência 86%, particular e preferencialmente 98% e especial e preferencialmente 100% de identidade com a região 3 mostrada na Seq ID No. 5.

[0054] No contexto da presente invenção, o termo "identidade" é entendido como significando a porcentagem de aminoácidos que concorda com a de aminoácidos de outras proteínas (identidade). A identidade é preferencialmente determinada com o auxílio de programas de computador. Se as sequências que são comparadas com cada outra são diferentes em comprimento, a identidade deve ser determinada de forma que o número de aminoácidos que a sequência mais curta compartilha com a sequência mais longa determina a porcentagem de identidade. A identidade pode ser determinada rotineiramente através de programas de computador conhecidos que estão disponíveis publicamente tal como, por exemplo, ClustalW (Thompson e outros, (1994) Nucleic Acids Research 22: 4673-4680).

[0055] ClustalW foi tornado público por Julie Thompson (Thompson@EMBL- Heidelberg.DE) e Toby Gibson (Gibson(5).EMBL- Heidelberq.DE). European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D - 69117 Heidelberg. ClustalW pode ser similarmente baixado partindo de várias páginas da internet, *inter alia* do IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B. P.163, 67404 Illkirch Cedex, França; <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/>) e do EBI (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>) e outras páginas da internet espelha-

da no EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, Reino Unido).

[0056] É preferido utilizar o programa de computador ClustalW Versão 1.8 para determinar a identidade entre as proteínas descritas aqui e outras proteínas. Devem ser ajustados os parâmetros a seguir: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAPOEN=10, GAPEXTEND=0,05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP.

[0057] É preferido utilizar o programa de computador ClustalW Versão 1.8 para determinar a identidade entre as sequências de nucleotídeos das moléculas de ácidos nucleicos descritas aqui e da sequência de nucleotídeos de outras moléculas de ácidos nucleicos. Devem ser ajustados os parâmetros a seguir: KTUPLE=2, TOPDIAGS=4, PAIRGAP=5, DNAMATRIX:IUB, GAPOEN=10, GAPEXT=5, MAXDIV=40, TRANSITIONS: não pesado.

[0058] No contexto da presente invenção, o termo "aumento da atividade de SSII" significa o aumento da atividade de SSII em comparação com as plantas de arroz do tipo selvagem ou células vegetais de arroz do tipo selvagem não-modificadas geneticamente em pelo menos 100%, em particular em 200% - 2000%, preferencialmente em 400% - 1400% e especial e preferencialmente em 500% - 900%. No contexto da presente invenção, a atividade de SSII é detectada utilizando o método descrito posteriormente aqui ("determinação da atividade de SSII através de gel"). No contexto da presente invenção, "aumento da atividade de SSII" significa ainda que as plantas ou as células vegetais que não possuem atividade de SSII detectável, após a modificação genética de acordo com a invenção, em que uma molécula de ácido nucleico exógena que codifica uma amido sintase solúvel é introduzida no genoma de uma célula vegetal, exibirão uma atividade de SSII detectável.

[0059] Em uma modalidade preferida, o processo de acordo com a invenção é, além disso, um em que a molécula de ácido nucleico exógena toma a forma da região codificadora de uma amido sintase solúvel II heteróloga.

[0060] No contexto da presente invenção, uma "amido sintase solúvel II heteróloga" é entendida como significando uma amido sintase solúvel II que não ocorre naturalmente na célula vegetal, mas cuja sequência de DNA codificadora é introduzida na célula através de métodos recombinantes, tal como, por exemplo, a transformação da célula. Neste contexto, a sequência de DNA codificadora se origina de uma espécie vegetal sem ser aquela da célula vegetal ou da planta transformada ou não está sob o controle de seu próprio promotor. A sequência codificadora de DNA se origina preferencialmente de um gênero de planta sem ser aquele da célula vegetal ou da planta transformada.

[0061] No contexto da presente invenção, o termo "gênero de planta" é entendido como significando um nível hierárquico de sistemáticas biológicas. Um gênero compreende uma ou mais de uma espécie. Um exemplo de um gênero é *Triticum* L. (trigo). Todas as espécies dentro de um gênero sempre possuem um nome binomial que, além do nome genérico, contém adicionalmente um epíteto de espécie. *Triticum aestivum* L. (trigo comum de panificação) é, consequentemente, uma espécie do gênero *Triticum*.

[0062] No contexto da presente invenção, o termo "gene SSII" é entendido como significando uma molécula de ácido nucleico ou um polinucleotídeo (DNA, cDNA) que codifica uma "amido sintase solúvel II". Em uma modalidade adicional, o gene SSII se origina de uma planta monocotiledônea. Em uma modalidade preferida, o gene SSII se origina do trigo.

[0063] Em uma modalidade preferida adicional, o processo de

acordo com a invenção é um em que é utilizada a amido sintase solúvel II de uma planta monocotiledônea. Em uma modalidade especialmente preferida, a SSII é codificada pela região codificadora da sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID No.1 ou apresenta a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID No. 2.

[0064] As plantas modificadas geneticamente cujo amido é modificado através do processo de acordo com a invenção podem pertencer a qualquer espécie de planta, isto é, tanto às plantas monocotiledôneas quanto às plantas dicotiledôneas. As plantas preferencialmente tomam a forma de plantas de cultivo agrícola, isto é, plantas que são cultivadas pelo ser humano com a finalidade de nutrição ou para finalidades técnicas, em particular, industriais e suas células. O processo de acordo com a invenção é preferencialmente aplicado em plantas que armazenam amido tais como, por exemplo, ervilhas, batata, batata doce, mandioca, milho e arroz.

[0065] Em uma modalidade especialmente preferida, o processo de acordo com a invenção é realizado em plantas de arroz.

[0066] A presente invenção se refere, além disso, a um amido de arroz com uma temperatura de início de DSC T entre 70°C e 80°C.

[0067] As características térmicas do amido do endosperma do arroz e das farinhas de arroz podem ser analisadas através da calorimetria por varredura diferencial = DSC. Estas são mostradas na forma da temperatura de gelatinização com os valores de início de DSC T (= temperatura de gelatinização mais baixa) e de máxima de DSC T (= temperatura de gelatinização mais alta).

[0068] No contexto da presente invenção, o termo "temperatura de início de DSC T" é, portanto, entendido como significando a temperatura que representa o início da fase de transição da amostra de amido ou de farinha. É caracterizada como a projeção da linha de base e da tangente desenhada no flanco ascendente do pico ao longo do ponto

de flexão.

[0069] Surpreendentemente, as plantas de arroz de acordo com a invenção sintetizam amidos com temperaturas de início de DSC T entre 70°C e 80°C, em particular, entre 77°C e 80 °C. O amido de arroz de acordo com a invenção, em particular, apresenta um início de DSC T entre 72 e 79°C, preferencialmente entre 74°C e 7 9°C, muito particular e preferencialmente entre 76°C e 78°C.

[0070] Em uma modalidade adicional, os amidos de arroz de acordo com a invenção possuem uma temperatura máxima de DSC T elevada (pico de DSC T).

[0071] Surpreendentemente, as plantas de arroz de acordo com a invenção sintetizam amidos com uma temperatura máxima de DSC T entre 80 e 87°C, preferencialmente entre 81 e 86°C. Um amido de arroz de acordo com a invenção com uma temperatura máxima de DSC T entre 82°C e 83°C é especialmente preferido.

[0072] No contexto da presente invenção, o termo "temperatura máxima de DSC T" é entendido como significando a temperatura em que a curva de DSC atingiu um máximo e a primeira diferenciação da curva é zero.

[0073] No contexto da presente invenção, as temperaturas "de início de DSC T" e "máxima de DSC T" são determinadas através do método descrito posteriormente aqui ("análise térmica da farinha/amido de arroz através de calorimetria por varredura diferencial").

[0074] O fato de que a temperatura de início de DSC T do amido de arroz de acordo com a invenção foi elevada a tal grau foi extremamente surpreendente para um versado na técnica, em particular por que o teor de amido fosfato dos amidos de arroz de acordo com a invenção era simultaneamente elevado. Isso porque foi postulado até hoje que um maior grau de fosforilação leva à desestabilização das duplas hélices e a ordem cristalina do grânulo de amido, que deveria

resultar em uma temperatura de início de DSC T reduzida (Safford e outros, (1998) Carbohydrate Polymers 35: 155-168). Os amidos nativos com um alto grau de fosforilação geralmente perdem sua característica de cristalização a temperaturas notavelmente menores que os amidos comparáveis com um baixo teor de fosfato.

[0075] Entretanto, o uso de amidos de arroz granulares é desejável em um grande número de etapas de processamento térmico e aplicações. O que é, portanto, particularmente vantajoso, é a temperatura de início de DSC T alta ou máxima de T dos amidos de arroz de acordo com a invenção, em outras palavras, a temperatura de formação de pasta surpreendentemente alta durante a análise de RV das farinhas de arroz de acordo com a invenção, uma vez que esta propriedade torna possível manter a estrutura dos grânulos de amido a temperaturas elevadas de processo.

[0076] Em uma modalidade adicional, o amido de arroz de acordo com a invenção apresenta um teor de fosfato na posição C6 (C-6-P) entre 0,70 e 2,5 nmols de fosfato por miligrama de amido hidrolisado.

[0077] Em uma modalidade preferida, o amido de arroz de acordo com a invenção apresenta um teor de fosfato na posição C6 entre 0,9 e 2,3 nmols de fosfato por miligrama de amido. Em uma modalidade especialmente preferida, o teor de fosfato da posição C6 fica entre 1,5 e 2,0 nmols de fosfato por miligrama de amido.

[0078] Além disso, a presente invenção se estende ao amido de arroz derivatizado que compreende o amido de arroz de acordo com a invenção.

[0079] No contexto da presente invenção, o termo "amido de arroz derivatizado" significa um amido de arroz de acordo com a invenção cujas propriedades foram modificadas com o auxílio, por exemplo, de processos térmicos, químicos, enzimáticos ou mecânicos após seu isolamento das células vegetais.

[0080] Os amidos de arroz de acordo com a invenção são melhor adequados como material de partida para a preparação de amidos de arroz derivatizados que os amidos convencionais uma vez que, como o resultado do maior teor de amido fosfato, contêm uma maior proporção de grupos funcionais reativos e uma vez que o amido de arroz de acordo com a invenção apresenta uma maior temperatura de formação de pasta ou maior estabilidade térmica, que os amidos com um teor de fosfato comparável.

[0081] A presente invenção, portanto, se refere ainda a métodos de produção de um amido de arroz derivatizado de acordo com a invenção, em que o amido de arroz de acordo com a invenção é subsequentemente modificado.

[0082] Em particular, o amido de arroz derivatizado de acordo com a invenção toma a forma do amido tratado térmicamente e/ou com ácido.

[0083] Em uma modalidade adicional, os amidos de arroz derivatizados tomam a forma de éteres de amido, em particular, alquil éteres de amido, O-alil éteres, hidroxilalquil éteres, O-carboxilmetyl éteres, éteres de amido contendo nitrogênio, éteres de amido contendo fosfato ou éteres de amido contendo enxofre.

[0084] Em uma modalidade adicional, os amidos de arroz derivatizados tomam a forma de amidos reticulados.

[0085] Em uma modalidade adicional, os amidos de arroz derivatizados tomam a forma de polímeros com enxerto de amido.

[0086] Em uma modalidade adicional, os amidos de arroz derivatizados tomam a forma de amidos oxidados.

[0087] Em uma modalidade adicional, os amidos de arroz derivatizados tomam a forma de ésteres de amido, em particular ésteres de amido que foram introduzidos no amido através da utilização de ácidos orgânicos. Especial e preferencialmente, tomam a forma de amidos

fosfato, nitrato, sulfato, xantato, acetato ou citrato.

[0088] Os amidos de arroz derivatizados de acordo com a invenção são adequados para uma variedade de usos na indústria farmacêutica, no setor de alimentos e/ou no setor sem ser de alimentos. Os métodos de preparação dos amidos derivatizados de acordo com a invenção são conhecidos pelo versado e descritos extensivamente na literatura geral. Uma visão geral da preparação de amidos derivatizados é encontrada, por exemplo, em Orthoefer (em Corn, Chemistry and Technology, 1987, eds. Watson e Ramstad, Capítulo 16, 479-499). A derivatização de amidos de arroz também é descrita, por exemplo, em Shih e Daigle (2003, Nahrung 47(1): 64-67).

[0089] A presente invenção se refere, além disso, ao uso de amidos de arroz de acordo com a invenção para a preparação de amido derivatizado.

[0090] O amido de arroz de acordo com a invenção, na forma nativa ou derivatizada, é adequado para uma variedade de aplicações no setor alimentício ou sem ser alimentício. Uma modalidade adicional compreende o uso do amido de arroz derivatizado de acordo com a invenção no setor industrial. Como o resultado do tamanho pequeno de grânulos do amido de arroz de acordo com a invenção, o último é também particularmente adequado para a produção de papel fotográfico.

[0091] A presente invenção se estende, além disso, a uma composição que compreende o amido de arroz de acordo com a invenção.

[0092] Em uma modalidade adicional, a presente invenção se estende à farinha de arroz que compreende o amido de arroz de acordo com a invenção.

[0093] Em uma modalidade adicional, as farinhas de arroz de acordo com a invenção possuem temperaturas de início de DSC T entre 72°C e 81 °C, preferencialmente entre 74°C e 80 °C, em particular,

entre 77°C e 80 °C. Uma farinha de arroz de acordo com a invenção com uma temperatura de início de DSC T entre 76°C e 79°C é especialmente preferida.

[0094] Em uma modalidade adicional, as farinhas de arroz de acordo com a invenção possuem temperaturas máximas de DSC T entre 81°C e 90°C, preferencialmente entre 82°C e 86 °C. Uma farinha de arroz com uma temperatura máxima de DSC T entre 82°C e 85°C é especialmente preferida.

[0095] Em uma modalidade adicional, as farinhas de arroz de acordo com a invenção possuem uma temperatura de formação de pasta RVA PT entre 75 e 90°C, preferencialmente entre 78°C e 88°C, em particular, entre 83°C e 86 °C e especial e preferencialmente entre 80°C e 85°C na análise de RVA (Rapid Visco Analyser).

[0096] No contexto da presente invenção, o termo "temperatura de formação de pasta" (RVA PT) significa que o valor medido no início do desenvolvimento da viscosidade de acordo com as análises de RVA é a temperatura em que a curva de viscosidade durante o processo de aquecimento deixa a linha de base e em que a viscosidade é alterada em mais que 36cP dentro de um período de 0,1 minuto.

[0097] No contexto da presente invenção, a "temperatura de formação de pasta RVA PT" é determinada com o auxílio do método "análise de farinha de arroz através do Rapid Visco Analyser (RVA)" que é descrito posteriormente aqui.

[0098] Em comparação com as farinhas de arroz das plantas de arroz do tipo selvagem correspondentes, a farinha de arroz de acordo com a invenção apresenta uma temperatura de formação de pasta (RVA PT) elevada.

[0099] No contexto da presente invenção, o termo "temperatura de formação de pasta (RVA PT) elevada" significa que a temperatura de formação de pasta (RVA PT) é 5°C até 15°C, em particular, 6°C até

14°C, preferencialmente 8 °C até 12°C, maior em comparação com a temperatura de formação de pasta RVA PT de farinhas de arroz de plantas de arroz do tipo selvagem correspondentes.

[00100] Em uma modalidade adicional, a farinha de arroz de acordo com a invenção apresenta um período reduzido entre atingir a temperatura de formação de pasta e atingir a viscosidade máxima.

[00101] No contexto da presente invenção, o termo "período reduzido entre atingir a temperatura de formação de pasta e atingir a viscosidade máxima" (tempo máximo – tempo de formação de pasta) significa que a diferença em termos de tempo de acordo com a análise de RVA como descrito aqui abaiixo atinge 40 segundos até 130 segundos, especial e preferencialmente 50-100 segundos e especial e preferencialmente 60-75 segundos.

[00102] Em uma modalidade adicional, a presente invenção se refere a um método de preparação de uma farinha de arroz de acordo com a invenção, em que os grãos de arroz de acordo com a invenção, preferencialmente grãos de arroz polidos de acordo com a invenção, são moídos. Os métodos para o polimento e a moagem dos grãos de arroz são conhecidos pelo versado e descritos, por exemplo, em Fitzgerald e outros (2003, J. of Agrocult. And Food Chemistry 51: 2295- 2299) ou em Ramesh e outros (1999, Carbohydrate Polymers 38: 337-347).

[00103] Um "grão de arroz" é tido pelo versado como significando a flor fertilizada madura de uma planta de arroz.

[00104] A presente invenção se estende ainda ao uso de uma farinha de arroz de acordo com a invenção para a preparação de matérias alimentícias e/ou alimentos para animais.

[00105] A presente invenção se refere, além disso, a uma composição que comprehende a farinha de arroz de acordo com a invenção.

[00106] Em uma modalidade adicional, a presente invenção se estende a um grão de arroz que comprehende o amido de arroz de acordo

com a invenção.

[00107] Em uma modalidade preferida, este toma a forma de um grão de arroz processado.

[00108] O processamento é entendido pelo versado como significando a conversão do arroz bruto (com casca) em arroz marrom ou branco; os métodos de processamento são conhecidos pelos versados e descritos, *inter alia*, em Fitzgerald e outros (2003, J. of Agrocult. And Food Chemistry 51: 2295-2299) ou em Ramesh e outros (1999, Carbohydrate Polymers 38: 337-347).

[00109] Em uma modalidade adicional da presente invenção, o grão de arroz de acordo com a invenção pode ser utilizado para cozimento.

[00110] Em uma modalidade adicional, o grão de arroz apresenta características alteradas após o cozimento.

[00111] No contexto da presente invenção, "características alteradas após o cozimento" é entendido como significando que as características do grão de arroz que se referem à qualidade, tais como, por exemplo, a textura ou a dureza dos grãos e a viscosidade dos grãos após o cozimento, em particular, após o resfriamento ou o reaquecimento do arroz cozido, são alteradas.

[00112] Em uma modalidade preferida, os grãos de arroz de acordo com a invenção possuem uma viscosidade de -10 até -200 g, preferencialmente de -12 g até -150 g, especial e preferencialmente de -15 g até -130 g (medida em g de força de tensão).

[00113] O termo "viscosidade" é entendido pelo versado como significando o efeito de captação de água e aquecimento durante o cozimento e a consistência dos grãos de arroz e a adesão dos grãos de arroz a outros grãos de arroz ou outras superfícies (por exemplo, garfo, hashi e similares) que este acarreta após o cozimento. No contexto da presente invenção, a viscosidade deve ser entendida como significando a força máxima negativa (força de tensão) que é medida atra-

vés de um analisador de textura após comprimir previamente os grãos de arroz cozidos de forma ótima, como descrito no método "determinação das características de cozimento e a textura dos grãos de arroz cozidos". Um valor negativo alto neste contexto significa uma maior viscosidade que um valor negativo mais baixo. No contexto da presente invenção, "grãos de arroz cozidos de forma ótima" são entendidos como significando grãos de arroz que são cozidos durante mais dois minutos adicionais após terem atingido o tempo de cozimento mínimo (quando 90% dos grãos não possuírem mais um centro branco, como é determinado no teste com lâminas de vidro que é descrito por Juliano 1984; J. of Tex. Studies 15: 357-376).

[00114] Na presente invenção, a viscosidade é medida em grãos de arroz cozidos de forma ótima, grãos de arroz que foram armazenados durante 22 horas a 4°C e então levados novamente à temperatura ambiente ou grãos de arroz que, após o armazenamento a 4°C (durante 22 horas), foram reaquecidos durante 5 minutos a 80°C em um forno ou que foram reaquecidos após o armazenamento a 4°C (22 horas) com o auxílio de um micro-ondas (600W/3 min).

[00115] O reaquecimento é entendido pelo versado como significando o reaquecimento uma até quatro vezes do arroz que foi cozido e, o reaquecimento intermediário, resfriado, por exemplo, permitindo que fique em repouso à temperatura ambiente, utilizando um micro-ondas, um forno, um banho de água ou uma estufa aquecida; preferencialmente, é entendido como significando uma única via de reaquecimento.

[00116] Uma vez que a "viscosidade" é um parâmetro de qualidade importante para o arroz, os grãos de arroz de acordo com a invenção oferecem usos vantajosos. Isto inclui, acima de tudo, o campo de aplicação de produtos semi-acabados que são apenas cozidos rapidamente quando produzidos, então secos novamente e reaquecidos ou

fervidos apenas rapidamente antes de seu consumo final (por exemplo, em recintos domésticos, em cantinas), sem qualquer efeito adverso sobre o sabor e a consistência.

[00117] Um parâmetro de qualidade adicional neste contexto é a extensão da dimensão dos grãos após a fervura em água na direção do eixo longitudinal. Tal alteração no formato é um parâmetro de qualidade visual importante, em particular no caso de arroz de grãos longos. Em uma modalidade adicional da presente invenção, os grãos de arroz de acordo com a invenção são distinguidos pelo fato de que possuem uma taxa de alongamento (ER) de 1,50 até 1,90, especial e preferencialmente de 1,55 até 1,80 e particular e preferencialmente de 1,60 até 1,70.

[00118] Em uma modalidade adicional da presente invenção, os grãos de arroz de acordo com a invenção possuem uma taxa maior de alongamento em comparação com os grãos de arroz de plantas de arroz do tipo selvagem correspondentes.

[00119] No contexto da presente invenção, uma maior taxa de alongamento é entendida como significando uma taxa de alongamento que é maior em 5% até 25%, preferencialmente em 10% até 20%, especial e preferencialmente em 14% até 18%.

[00120] No presente contexto, a "taxa de alongamento" é entendida como significando a proporção do comprimento de grão do grão de arroz cozido em relação ao comprimento de grão do grão de arroz não-cozido. O comprimento do grão é medido em mm, como é descrito, por exemplo, no método "medida da alteração nas dimensões dos grãos através do cozimento"; a medida é preferencialmente realizada utilizando um paquímetro.

[00121] Em uma modalidade adicional, os grãos de arroz de acordo com a invenção possuem um valor de CDC de 2,8 até 6,2, preferencialmente de 3,5 até 5,5 e especial e preferencialmente de 4,0 até 5,0.

[00122] O "valor de CDC" (CDC = coeficiente de alterações dimensionais) é entendido como significando a proporção da alteração dimensional ao longo do comprimento em relação à alteração dimensional ao longo da largura como o resultado do cozimento, isto é, a proporção do comprimento do grão no estado cozido (Lc) em relação ao estado não-cozido (Lu) em relação à proporção da largura do grão no estado cozido (Wc) em relação ao estado não-cozido (Wu) = $(Lc/Lu)/(Wc/Wu)$.

[00123] Um assunto de objeto adicional da presente invenção se refere a uma composição que compreende pelo menos um grão de arroz de acordo com a invenção.

[00124] A presente invenção compreende, além disso, uma planta de arroz em que pelo menos um grão de arroz de acordo com a invenção cresce e/ou que compreende o amido de arroz de acordo com a invenção.

[00125] Em uma modalidade adicional, a presente invenção compreende células vegetais de arroz e plantas de arroz modificadas geneticamente em que a modificação genética leva a uma maior atividade da amido sintase solúvel II (SSII) em comparação com as plantas de arroz do tipo selvagem ou as células vegetais de arroz do tipo selvagem não-modificadas geneticamente correspondentes.

[00126] Era, além disso, surpreendente que o amido de arroz de acordo com a invenção tivesse uma distribuição modificada de certas cadeias laterais em comparação com o amido de arroz de células vegetais do tipo selvagem ou de plantas do tipo selvagem correspondentes.

[00127] Em uma modalidade adicional da presente invenção, foi deduzido o grau de cadeias laterais de amilopectina com um dp (= grau de polimerização) de 20 até 25 é aumentado em 5-35% em comparação com o amido de arroz de plantas de arroz do tipo selvagem

correspondentes.

[00128] No contexto da presente invenção, o termo "aumento do conteúdo de cadeias laterais de amilopectina com um dp (= grau de polimerização) de 20 até 25" significa o aumento do conteúdo de cadeias laterais de amilopectina com um DP de 20-25 em 5%- 35%, preferencialmente em 6%-30%, especial e preferencialmente em 8%-24%, em comparação com o conteúdo de cadeias laterais com um DP de 20-25 de amilopectina de células vegetais de arroz do tipo selvagem ou de plantas de arroz do tipo selvagem correspondentes.

[00129] Em uma modalidade adicional da invenção, o conteúdo de cadeias laterais de amilopectina com um dp de 6 até 10 é reduzido.

[00130] No contexto da presente invenção, o termo "redução do conteúdo de cadeias laterais de amilopectina com um dp de 6 até 10" significa uma redução do conteúdo de cadeias laterais de amilopectina com um DP de 6-10 em 20%-60%, preferencialmente em 25%-55%, especial e preferencialmente em 30%-55%, em comparação com um conteúdo de cadeias laterais com um DP de 6-10 de amilopectina de células vegetais de arroz do tipo selvagem ou de plantas de arroz do tipo selvagem correspondentes.

[00131] No contexto da presente invenção, a determinação da distribuição de cadeias laterais é realizada através do método descrito aqui abaixo ("processamento da farinha/amido de arroz para a análise da distribuição de cadeias laterais de amilopectina através de cromatografia de troca aniônica em alta pressão"). A porcentagem de cadeias laterais curtas é determinada através da determinação da porcentagem de uma cadeia lateral específica do total de todas as cadeias laterais. O total de todas as cadeias laterais é determinado através da determinação da área total sob os picos que representam os graus de polimerização do DP de 6 até 48 no cromatograma de HPLC. A porcentagem da cadeia lateral específica do total de todas as cadeias la-

terais é determinada através da determinação da proporção da área sob o pico que representa esta cadeia lateral no cromatograma de HPLC em relação à área total. Para determinar as áreas dos picos, pode ser utilizado o programa Chromelion 6.60 da Dionex, EUA, por exemplo.

[00132] No contexto da presente invenção, o termo "planta de arroz do tipo selvagem" é tido como significando plantas de arroz que atuam como material de partida para as plantas de arroz de acordo com a invenção, isto é, cuja informação genética, à parte da modificação genética introduzida que leva a um aumento na atividade de uma amido sintase solúvel II (SSII), corresponde àquela de uma planta de arroz modificada geneticamente.

[00133] Preferencialmente, o termo "planta de arroz do tipo selvagem" se refere à variedade M202, uma variedade de arroz com amilopectina do tipo S com um valor de 25,2%, cujos grãos foram depositados em 17 de novembro de 2005, na NCIMB Ltd. depository, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Escócia, AB21 9YA, Reino Unido como o número da NCIMB 41352.

[00134] No contexto do processo de acordo com a invenção, a modificação genética compreende preferencialmente a introdução de pelo menos uma molécula de ácido nucleico exógena que codifica uma amido sintase solúvel II (SSII) dentro do genoma de uma célula vegetal, a dita introdução de pelo menos uma molécula de ácido nucleico exógena resultando no fato de que o amido que pode ser obtido partindo da célula vegetal modificada geneticamente e da planta regenerada partindo da mesma apresenta, como o resultado da expressão da SSII que foi introduzida, um maior teor de fosfato na posição C6 em comparação com as células vegetais do tipo selvagem não-modificadas geneticamente correspondentes.

[00135] Em uma modalidade adicional da presente invenção, a in-

trodução de pelo menos uma molécula de ácido nucleico exógena resulta na síntese de um amido de arroz de acordo com a invenção.

[00136] Em uma modalidade preferida, as plantas de arroz e as células vegetais de arroz de acordo com a invenção são aquelas em que a molécula de ácido nucleico exógena é a região codificadora de uma amido sintase solúvel II heteróloga.

[00137] Está disponível um grande número de técnicas para a introdução de DNA em uma célula vegetal hospedeira. Estas técnicas compreendem a transformação de células vegetais com T-DNA utilizando *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes* como o agente de transformação, a fusão de protoplastos, a injeção, a eletroporação de DNA, a introdução do DNA através da abordagem de biolística e outras possibilidades.

[00138] A transformação de plantas monocotiledôneas através de vetores baseados na transformação com *Agrobacterium* foi descrita, por exemplo, em Chan e outros, 1993, Plant Mol. Biol. 22: 491-506; Hiei e outros, 1994, Plant J. 6: 271-282; Deng e outros, 1990, Science in China 33: 28-34; Wilmink e outros, 1992, Plant Cell Reports 11: 76-80; May e outros, 1995, Bio/Technology 13: 486-492; Conner e Domisse, 1992, Int. J. Plant Sci. 153: 550-555 e em Ritchie e outros, 1993, Transgenic Res. 2: 252-265. Sistemas alternativos para a transformação de plantas monocotiledôneas são: a transformação através da abordagem de biolística (Wan e Lemaux, 1994, Plant Physiol. 104: 37-48; Vasil e outros, 1993, Bio/Technology 11: 1553-1558; Ritala e outros, 1994, Plant Mol. Biol. 24: 317-325; Spencer e outros, 1990, Theor. Appl. Genet. 79: 625- 631), a transformação de protoplastos, a eletroporação de células parcialmente permeabilizadas e a introdução de DNA através de fibras de vidro. A transformação bem-sucedida de várias espécies de cereais foi descrita, por exemplo, para a cevada (Wan e Lemaux, *supra*; Ritala e outros, *supra*; Krens e outros, 1982, Nature

296: 72-74), para o trigo (Nehra e outros, 1994, *Plant J.* 5: 285-297), arroz (Ishida e outros, 1996, *Nature Biotechnology* 14 (6): 745-750) e milho (Koziel e outros (1993), *Biotechnology* 11: 194-200).

[00139] A regeneração das células vegetais modificadas geneticamente do processo de acordo com a invenção resulta na produção de plantas modificadas geneticamente cuja informação genética corresponde àquela de uma planta do tipo selvagem não-modificada geneticamente correspondente e que contém a mesma modificação genética introduzida para aumentar a atividade de uma amido sintase solúvel II que já está presente nas células vegetais modificadas geneticamente do processo de acordo com a invenção.

[00140] Em uma modalidade preferida, a presente invenção se refere a plantas de arroz do grupo *japonica* (*Oryza sativa* var. *japonica*), que compreende variedades de arroz de grãos curtos e de grãos longos tais como, por exemplo, arroz pegajoso, arroz doce, arroz mochi, arroz nishiki, arroz ribe, arroz vermelho, arroz preto, arroz para sushi. Em uma modalidade especialmente preferida da presente invenção, as plantas de arroz do tipo selvagem do grupo *japonica* são utilizadas como o material de partida para a produção das plantas de arroz de acordo com a invenção.

[00141] Em uma modalidade muito especialmente preferida adicional, a presente invenção se refere a plantas de arroz com amilopectina do tipo S.

[00142] Na amilopectina do arroz, os tipos L e S podem ser distinguidos. A amilopectina do tipo L é predominantemente encontrada no arroz do grupo *indica*, enquanto que a amilopectina do tipo S, em contraste, é encontrada no arroz do grupo *japonica*. No contexto da presente invenção, a amilopectina do tipo S é distinguida pelo fato de que, em comparação com o tipo L, a quantidade das cadeias de alfa-1,4-glucana curtas (DP <=10) equivale até mais que 20% do total das ca-

deias de α -1,4-glucana de DP \leq 24 (Nakamura 2002, Starch 54: 117-131).

[00143] Em uma modalidade muito especialmente preferida, a presente invenção compreende plantas de arroz modificadas geneticamente (*Oryza sativa* var. *japonica*) dos transformantes GAOS0353-02301, GAOS0353-01301 e GAOS0353-01502. A semente do transformante M202 GAOS0353-01502 foi depositada em 17.11.2005 na NCIMB Ltd., Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Escócia, AB21 9YA, Reino Unido, sob o número da NCIMB 41353.

[00144] Em uma modalidade adicional, a farinha de arroz de acordo com a invenção apresenta um conteúdo menor de amilose aparente que a farinha de arroz de plantas de arroz do tipo selvagem correspondentes. No contexto da presente invenção, o conteúdo de amilose aparente é preferencialmente determinado com o auxílio do método "determinação do conteúdo de amilose aparente" descrito posteriormente aqui. Em uma modalidade preferida, o conteúdo de amilose aparente da farinha de arroz de acordo com a invenção é reduzido em 10% até 20%, especial e preferencialmente em 12% até 18% e muito especial e preferencialmente em 13% até 15% em comparação com o conteúdo de amilose aparente na farinha de plantas de arroz do tipo selvagem correspondentes.

[00145] Em uma modalidade adicional da invenção, a molécula de ácido nucleico exógena introduzida, que codifica uma amido sintase solúvel II, está sob o controle de um promotor específico ao endosperma. Os promotores específicos ao endosperma tornam possível aumentar especificamente a quantidade do produto da transcrição das moléculas de ácidos nucleicos exógenas que codificam uma amido sintase solúvel II no endosperma das plantas de acordo com a invenção em comparação com o endosperma de plantas do tipo selvagem

correspondentes.

[00146] É preferido utilizar promotores para uma expressão específica ao endosperma, tal como, por exemplo, o promotor da glutelina do arroz (Leisy e outros (1990) Plant Mol. Biol. 14: 41-50; Zheng e outros (1993) Plant J. 4: 357-366), o promotor HMWG do trigo (Anderson e outros (1989) Nucleic Acid Res 17: 461-462), os promotores GBSSII do trigo (WO 02/02785), o promotor USP (Bäumlein e outros (1991) Mol. Gen Genetics 225: 121- 128), o promotor da faseolina do feijão (Kawagoe e Murai (1992) Plant J 2 (6): 927-36), os promotores dos genes Zein do milho (Pedersen e outros, (1982) Cell 29: 1015-1026; Quattroccio e outros, (1990) Plant Mol. Biol. 15: 81-93), o promotor shrunken-1 (sh-1) do milho (Werr e outros (1985) EMBO J. 4: 1373-1380) ou os promotores da prolamina do arroz (Qu & Takaiwa (2004) Plant Biotechnology Journal, 2: 113-125).

[00147] É especialmente preferido utilizar o promotor da globulina do arroz (Nakase e outros (1996) Gene 170(2): 223-226).

[00148] Em uma modalidade adicional, a presente invenção se refere a um método de produção de uma planta de arroz de acordo com a invenção, em que uma planta de arroz de acordo com a invenção é regenerada de uma célula vegetal de arroz de acordo com a invenção e em que, após a regeneração, são selecionadas tais plantas de arroz em que a superexpressão da amido sintase solúvel II resulta em uma maior atividade de SSII.

[00149] No contexto da presente invenção, o termo seleção significa que, dentro de uma população, uma característica escolhida deliberadamente é o critério de acordo com o qual as plantas que exibem esta característica são cultivadas, enquanto que aquelas que não exibem a característica desejada são descartadas.

[00150] No contexto da presente invenção, as plantas que foram selecionadas eram aquelas que possuíam a característica de maior

atividade de SSII.

[00151] A presente invenção se refere, além disso, ao material de propagação das plantas de arroz modificadas geneticamente de acordo com a invenção, que contêm as células vegetais de arroz de acordo com a invenção.

[00152] Neste contexto, o termo "material de propagação" compreende aquelas partes da planta que são adequadas para a produção de progênie através da rota vegetativa ou sexual. Aquelas que são adequadas para a propagação vegetativa são, por exemplo, mudas ou culturas de calos. O material de propagação compreende, por exemplo, frutos, sementes, plantas jovens partindo de sementes, protoplastos, culturas de células e similares. O material de propagação é preferencialmente grãos contendo endosperma.

[00153] Os grãos de arroz de plantas de arroz de acordo com a invenção, que compreendem células vegetais modificadas geneticamente, constituem um assunto de objeto adicional da presente invenção.

[00154] Em uma modalidade adicional, a presente invenção compreende um método de produção de um amido de arroz modificado de acordo com a invenção, que compreende a extração do amido de uma planta de arroz de acordo com a invenção e/ou de grãos de arroz de acordo com a invenção e/ou da farinha de arroz de acordo com a invenção. Os métodos de extração são conhecidos pelos versados e descritos, por exemplo, em Wang e Wang (2004, Journal of Cereal Science 39: 291-296) ou Patindol e Wang (2003, J. Agric Food Chem. 51: 2777-2784).

[00155] Em uma modalidade adicional, a presente invenção se refere a amidos resistentes cuja digestibilidade é reduzida em comparação com a digestibilidade de amidos de plantas do tipo selvagem.

[00156] A digestibilidade de alimentos é determinada *inter alia* pelo tipo de amido que contêm. Muitos constituintes do alimento são degra-

dados mesmo em seu caminho para, assim como dentro, do estômago e do intestino delgado. Alguns amidos são, entretanto, degradados apenas no intestino grosso e são, portanto, referidos como amidos resistentes (= RS). Estes podem ser divididos em quatro tipos. O primeiro tipo (RS 1) inclui o amido inserido dentro de células intactas. Sua acessibilidade para as enzimas digestivas é, portanto, apenas fraca. Isto se aplica, por exemplo, ao amido dentro de grãos de cereais inteiros ou grosseiramente moídos e à parte do amido nos legumes. O segundo tipo (RS 2) inclui o amido que não é digerido na forma nativa no intestino delgado. A razão neste caso é a estrutura dos grãos de amido e a distribuição das moléculas de amido no grão de amido. É incluído aqui, por exemplo, o amido as batatas cruas, nas bananas verdes ou nas variedades de milho ricas em amilose (amilomilho). O terceiro tipo (RS 3) abrange o assim chamado amido retrodegradado. Este é produzido após o resfriamento de produtos alimentícios contendo amido aquecidos tais como pão e batatas cozidas. Durante esse processo, parte das moléculas de amido se rearranja e zonas cristalinas são formadas e ficam inacessíveis para as enzimas digestivas (por exemplo, amiloses). O quarto tipo (RS 4) inclui amido modificado quimicamente que não pode ser digerido que é produzido, por exemplo, através da reticulação ou da esterificação (acetilação etc.).

[00157] O efeito promotor de saúde dos amidos resistentes consiste, em particular, de suas reações bacterianas que influenciam a fermentação, aumentando o peso das fezes e levando à produção de ácidos graxos de cadeia curta que representam o suprimento de energia principal para as células da mucosa do intestino grosso. Em adição, uma função importante na inibição de tumores é atribuída ao butirato (detalhes adicionais devem ser encontrados *inter alia* em Wisker (2001), UGB-Forum 01: 75-77).

[00158] Os níveis de glicose e/ou de insulina, por exemplo, nos

consumidores de pão contendo uma alta proporção de grãos de cereais inteiros (e assim RS1) são menores que com o pão feito de cereais finamente moídos. Um aumento menor na glicose do sangue foi similarmente observado com muitos legumes. Isto indica que o amido resistente do tipo 1 influencia no efeito que um produto alimentício apresenta sobre a glicose do sangue. Além da glicose e da insulina no sangue, são também muito importantes para a queima de gorduras os carboidratos. Um nível de insulina continuamente flutuante interfere com a queima de gorduras e leva adicionalmente a um aumento da sensação de fome. Por esta razão, os carboidratos cuja digestibilidade é baixa ou diminuída e que levam assim a apenas um ligeiro aumento no nível de insulina são vantajosos. É assim possível que tais amidos, em produtos apropriados, satisfaçam todos os requerimentos de uma dieta que envolve a absorção de pequenas quantidades de carboidratos (= "Baixo Teor de Carboidratos").

[00159] Deduziu-se que os amidos do método de acordo com a invenção exibem uma digestibilidade distintamente reduzida em comparação com o amido do tipo selvagem. Isto era evidente quando o amido isolado (figura 3) foi investigado. Assim, os amidos produzidos através do método de acordo com a invenção exibem uma alta qualidade nutricional que torna possível o uso tanto para uma dieta com maior quantidade de fibras quanto na área de "Baixo Teor de Carboidratos" e além.

[00160] O versado na técnica distingue os amidos de acordo com o tempo necessário para a digestão: o amido que leva 20 minutos para ser digerido é chamado de "amido digerido rápido (RDS)", o amido que leva 60 minutos é chamado de "amido que é digerido lentamente (SDS)" e o amido que é mantido após 120 minutos é chamado de "amido resistente (RS)".

[00161] Surpreendentemente, a digestibilidade do amido isolado é

reduzida. São preferidos os amidos com uma redução de 10 até 65% na digestibilidade comparado com o do tipo selvagem, uma redução na digestibilidade de 10 até 55% é particularmente preferida, uma redução de 12 até 45% é muito particularmente preferida e uma redução de 15 até 30% é mais particularmente preferida.

[00162] Isto significa, que a porcentagem de amido resistente RS nos amidos de acordo com a invenção é maior em comparação com o amido do tipo selvagem. O conteúdo de RS é determinado como a diferença partindo do peso seco total do amido (100%) menos a porcentagem da glicose calculada partindo do amido total após 120 minutos (como descrito no método 15 abaixo). Neste contexto, um aumento significa um aumento do conteúdo de RS para 100-750%, preferencialmente para 150-700% e especial e preferencialmente para 200-600%.

[00163] Em uma outra modalidade, os amidos de arroz de acordo com a invenção exibem um conteúdo de RS de 15%-45%, preferencialmente a 17%-40% e mais preferido de 20%-38%.

[00164] A presente invenção abrange ainda plantas e células vegetais que compreendem um amido que foi produzido através do método de acordo com a invenção e que exibe uma digestibilidade reduzida em comparação com o amido das plantas do tipo selvagem correspondentes ou das plantas do tipo selvagem.

Materiais e métodos

[00165] Os métodos a seguir foram utilizados nos exemplos. Estes métodos podem ser utilizados para a realização dos métodos de acordo com a invenção; estes representam modalidades específicas da presente invenção, mas não limitam a presente invenção a estes métodos. Os versados sabem que a invenção pode ser realizada igualmente através da modificação dos métodos descritos e/ou através da substituição das seções metodológicas individuais por seções metodo-

lógicas alternativas. Uma exceção é apenas o método "determinação do conteúdo da glicose-6-fosfato ligada ao amido", que, no contexto da presente invenção, é somente realizada da maneira descrita abaixo sob 14.

1) Material vegetal e cultivo

[00166] Plantas de arroz: *Oryza sativa*, grupo *japonica*, variedade M202.

[00167] A semente foi depositada na NCIMB Ltd. (National Collection of Industrial Bacteria, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn; Aberdeen, AB21 9YA, Reino Unido) em 17.11.2005. O tipo selvagem da variedade de semente M202 recebeu o número de depósito da NCIMB 41352; a semente do transformante M202-GAOS0353-01502 recebeu o número de depósito da NCIMB 41353.

[00168] As plantas de arroz foram cultivadas na estufa sob as seguintes condições de regime: Semeadura: substrato: mistura de 100% de turfa sfagno e 100 L de areia/qm e argila: 180 kg/qm em vasos de rosa de 1,6 L (fabricante: H. Meyer, Alemanha). pH: 5,4-6,2: Adubo dos grãos: Hakaphos (Compo, Alemanha) 14% de N - 16% de P - 18% de K + 2% de Mg; 2 kg/qm; Alimentação: 3,5 g/planta até o florescimento: NH₄NO₃ (1,75 g) e Flory 2 Basis (fabricante: Euflor, Alemanha): 1,75 g; 3% de N - 16% de P - 15% de K + 5% de Mg. Temperatura: dia 28°C/noite: 24°C (16 h/8 h); umidade atmosférica relativa: 85-95%; Luz: 16 h, 350μEinstein/s x qm

2) Origem das sequências e das construções utilizadas para a transformação

[00169] A sequência Ta_SSIIa do trigo foi utilizada para a transformação do arroz. O isolamento e a clonagem foram realizados como descrito no WO 97-45545 (então sob o nome "pTaSS1"). O vetor de transformação utilizado, AH32-191, é descrito no Exemplo 1.

3) Transformação e regeneração de plantas de arroz

[00170] As plantas de arroz foram transformadas e regeneradas através do método descrito por Ishida e outros (1996, *Nature Biotechnology*, 14 (6): 745-750).

4) Processamento de grãos de arroz

[00171] Para gerar quantidades suficientes de materiais para estudo, as plantas de arroz foram cultivadas sob condições de estufa e colhidas quando completamente maduras. Para a secagem adicional, os grãos de arroz maduros (isto é, completamente desenvolvidos) foram armazenados durante 3-7 dias a 37°C.

[00172] Depois disso, os grãos são liberados das cascas através de um descascador (Laboratory Paddy sheller, Grainman, Miami, Flórida, EUA) e o arroz marrom resultante é processado através do polimento durante 1 minuto (Pearlest Rice Polisher, Kett, Villa Park, CA) para fornecer o arroz branco. O último é utilizado como o material de partida para as análises do grão inteiro tal como, por exemplo, o valor de espalhamento em álcali, as dimensões dos grãos, o peso dos grãos e similares.

[00173] Para estudar a composição dos grãos e as características do amido e da farinha, os grãos brancos são moídos através de um moinho de laboratório (Cyclotec, Amostra mill, Foss, Dinamarca) para fornecer uma farinha de arroz. O princípio do moinho de laboratório é que o estoque do moinho deixa a câmara de moagem somente quando um tamanho de particulado menor que 0,5 mm foi atingido. O processo de moagem está completo quando todo o material da amostra tiver deixado da câmara de moagem.

5) Análise do nível de expressão da amido sintase II através de Northern blot

[00174] A expressão da amido sintase II do trigo no arroz foi analisada através de Northern blot. Para este fim, três grãos de arroz imaturos (aproximadamente 15 dias após o florescimento) foram estuda-

dos para cada evento transgênico independente. Com a finalidade de homogeneização, os grãos de arroz congelados foram agitados em um moinho Retsch (modelo MM300) em uma placa de 96 poços com uma bola de aço de 4,5 mm durante 30 segundos na frequência de 30 hertz. Depois disso, o RNA foi isolado através do kit de extração de RNA da Promega na escala de 96 poços seguindo as instruções do fabricante (SV 96 Total RNA Isolation System, Order No. Z3505, Promega, Mannheim).

[00175] 2 µg de RNA por amostra foram levados para um volume uniforme e tratados com um volume idêntico de tampão de amostra de RNA (65% (v/v) de formamida, 8% de formaldeído, 13% (v/v) de tampão de gel (ver acima), 50 µg/mL de brometo de etídio). Após o aquecimento (10 min, 65°C) e o resfriamento imediato em gelo, o RNA foi separado durante aproximadamente 2 horas a uma amperagem constante de 50-80 mA em um gel de agarose a uma concentração de 1,2% (p/v) (MOPS a 20 mM pH 8,0, acetato de Na a 5 mM, EDTA a 1 mM, 6% (v/v) de formaldeído), utilizando tampão de corrida de RNA (MOPS a 20 mM pH 8,0, acetato de Na a 5 mM, EDTA a 1 mM).

[00176] Depois disso, o RNA foi transferido para uma membrana Hybond N através de um "blot" por difusão utilizando 10x SSC (NaCl a 1,5 M, citrato de Na a 150 mM pH 7,0) e imobilizado sobre a membrana através de irradiação com UV.

[00177] Um fragmento de aproximadamente 1 kb de Spel/BspHI do plasmídeo AH32-191 (Bp 4568-5686), que constitui a região a 5' do cDNA de SSII, foi utilizado para a hibridização do Northern blot. O fragmento de DNA foi marcado radioativamente através do kit "Random primed DNA labeling" da Roche (Order No. 1004 760) utilizando ^{32}P - α -dCTP de acordo com as instruções do fabricante.

[00178] O Northern blot foi pré-incubado durante 4 horas a 60°C com agitação suave em um banho de água com tampão de hibridiza-

ção (tampão fosfato de Na a 250 mM pH 7,2, EDTA a 1 mM, 6% (p/v) de SDS, 1% (p/v) de BSA) antes do DNA marcado radioativamente ter sido adicionado para a hibridização. Após a incubação durante 16 horas, a solução de hibridização foi removida e a membrana foi lavada no banho de água em sucessão ao 3xSSC e ao 2xSSC (ver acima) a 60°C com agitação suave para remover as moléculas de DNA ligadas de forma inespecíficas. Para detectar o RNA marcado, a membrana foi autorradiografada em um filme de raio X durante um até três dias a -70°C.

6) Determinação da atividade de SSII através de gel

[00179] As atividades diferentes da amido sintase nos grãos de arroz imaturos foram detectadas através de géis de atividade (zimogramas), nos quais os extratos de proteína são separados em um gel de poliacrilamida sob condições nativas e subsequentemente incubados com substratos adequados. O produto de reação formado (amido) foi corado através de uma solução de Lugol (2% (p/v) de KI; 0,2% (p/v) de I₂) no gel.

[00180] Os grãos de arroz imaturos isolados (aproximadamente 15 dias após o florescimento, medido partindo do dia do início da fluorescência) foram congelados para choque em nitrogênio líquido e homogeneizados em 150-200 µL de tampão de extração gelado (Tris/HCl a 50 mM pH 7,6, EDTA a 2,5 mM, DTT a 2 mM, PMSF a 4 mM, 0,1% (p/v) de glicogênio, 10% (v/v) de glicerol). Após a centrifugação (15 min, 13 000 g, 4°C), o sobrenadante translúcido foi transferido para um recipiente de reação novo e uma alíquota do extrato foi utilizada para determinar o teor de proteína através do método de Bradford (1976, Anal Biochem 72: 248-254).

[00181] Os extratos de proteína foram separados através de um gel de poliacrilamida com concentração contínua de 7,5% (7,5% de AA/BAA 37,5:1; Tris/HCl a 25 mM pH 7,6, glicina a 192 mM, 0,1% (p/v)

de APS, 0,05% (v/v) de TEMED) utilizando tampão de corrida a uma concentração (Tris/HCl a 25 mM, glicina a 192 mM). Antes de carregar no gel, foi realizada uma pré-corrida para a remoção de radicais livres durante 30 minutos a 8 mA e 4°C. 15 µg de proteína foram aplicados para cada amostra e submetidos à eletroforese durante 2-2,5 horas a 4°C.

[00182] Depois disso, os géis foram incubados durante a noite à temperatura ambiente em 15 mL de tampão de incubação (citrato de sódio a 0,5 M pH 7,0, acetato de potássio a 25 mM, EDTA a 2 mM, DTT a 2 mM, 0,1% (p/v) de amilopectina, tricina/NaOH a 50 mM pH 8,5, ADP- glicose a 1 mM), com agitação contínua. O amido formado foi corado através de uma solução de Lugol.

[00183] Para determinar a extensão do aumento da atividade de SSII através de zimogramas, os extratos de proteína das linhagens modificadas geneticamente foram diluídos em etapas e utilizados de acordo com o método descrito anteriormente. Após corar os zimogramas com a solução de Lugol, a extensão do aumento na atividade foi determinada através da comparação visual da intensidade da banda de SSII para as diluições diferentes com o tipo selvagem não-diluído.

7) Extração do amido de arroz da farinha de arroz

[00184] A extração do amido de arroz da farinha de arroz foi realizada através de um método similar ao descrito por Wang e Wang (2004; Journal of Cereal Science 39: 291-296).

[00185] 10 g de farinha de arroz foram incubados com 40 mL a 0,05% (p/v) de NaOH durante 16-18 horas em um agitador à temperatura ambiente. Depois disso, a suspensão foi transferida para dentro de um misturador Warring para completar a digestão e misturada durante 15 segundos à velocidade baixa e então durante 45 segundos à velocidade alta. Para remover os constituintes mais grosseiros (por exemplo, parede celular), a suspensão foi passada através de uma

peneira de tamanho de mescla de 125 µm e então por uma peneira de tamanho de mescla 63 µm. Após a centrifugação a 1500 rpm durante 15 minutos (Microfuge 3.OR; Heraeus), o sobrenadante foi extraído por decantação e a camada de proteína, que estava na superfície do pélete, foi removida utilizando uma espátula. O restante do pélete foi ressuspenso em 0,05% (p/v) de NaOH e o procedimento descrito anteriormente foi repetido. Depois disso, o pélete foi ressuspenso em água e o pH da suspensão foi levado para 6,5-7 utilizando HCl. O amido de arroz obtido foi lavado com água (3 vezes no total), cada etapa de lavagem compreendendo sedimentação (1500 rpm, 15 min, à temperatura ambiente), descarte do sobrenadante e ressuspensão em água fresca. Antes da última etapa de lavagem, o pH foi verificado novamente e, se apropriado, levado a pH 7 com HCl. o pélete de amido de arroz da última etapa de lavagem foi ressuspensa em acetona e sedimentada e o sobrenadante foi descartado. Após o pélete ter sido novamente ressuspenso em acetona, a suspensão foi vertida dentro de uma placa de Petri à temperatura ambiente em uma câmara de emanção de gases durante pelo menos 18 horas.

[00186] Em uma última etapa, o amido de arroz foi triturado em um pilão e almofariz para fornecer um pó fino, que foi empregado diretamente em todas as análises adicionais.

8) Processamento de farinha/amido de arroz para estudo da distribuição de cadeias laterais de amilopectina através de cromatografia de troca aniônica em alta pressão

[00187] Para cada amostra, 10 mg de farinha de arroz ou de amido de arroz foram pesados em uma cuba Eppendorf de 2 mL e tratados com 250 µL de 90% (v/v) de DMSO. Após a amostra ter sido dissolvida com agitação a 60°C, 375 µL de água foram adicionados e a mistura foi incubada durante uma hora a 95°C. 300 µL de acetato de sódio a 16,7 mM, pH 3,5 e 0,5 U de isoamilase de *Pseudomonas* sp. (Me-

gazyme; Bray, Irlanda) foram adicionados a 200 µL da mistura de reação. Após a incubação durante 24 horas a 37°C, mais 0,5 U de isoamilase foi adicionada e a incubação foi continuada durante mais 24 horas.

[00188] Para a cromatografia, 100 µL da mistura de reação foram diluídos 1:5 com água e subsequentemente filtrados através de tubos de filtro Ultrafree-MC (Millipore). Aproximadamente 90 µL do filtrado foram injetados.

Cromatografia:

Método:

- [00189] Sistema de HPLC: GP 50 Dionex Gradient Pump
- [00190] ED 50 Dionex Electrochem. Detector/ PAD
- [00191] AS 50 Autosampler
- [00192] Forno de coluna
- [00193] Coluna: Dionex CarboPac PA 100 4 x 250 mm (P/N 046110) com coluna guarda 1004 x 50 mm (P/N 046115)
- [00194] A configuração do equipamento é descrita na Figura 4.

Programa de HPAEC:

```

Pressão LimiteInferior = 50
Pressão LimiteSuperior = 3500
% A.Equacionar = "NaOH a 0,15 M"
% B.Equacionar = "NaOAc a 1,0 M"
% C.Equacionar = "NaOAc a 1,0 M em NaOH a 0,15 M"
% D.Equacionar = "Água Milipore"
ECD.Taxa_de_Coleta_de_Dados = 1,0
Forma da onda Tempo = 0,00, Potencial = 0,05
Forma da onda Tempo = 0,20, Potencial = 0,05, Integração
= Inicio
Forma da onda Tempo = 0,40, Potencial = 0,05, Integração
= Fim

```

Forma da onda Tempo = 0,41, Potencial = 0,75
Forma da onda Tempo = 0,60, Potencial = 0,75
Forma da onda Tempo = 0,61, Potencial = -0,15
Forma da onda Tempo = 1,00, Potencial = -0,15
Célula = Ligada
Volume de Fluxo = 500
Espera Estado de Fluxo
Altura da Agulha = 2
Volume do Segmento de Corte = 10
Velocidade da Seringa = 4;
Ciclo = 0
Espera Pela Temperatura = Falso
Espera Amostra Pronta

0,000 Fluxo = 1,00
 %B = 0,0
 %C = 0,0
 %D = 0,0
 curva= 5
 Carga
 Injeção
 Espera
 ECD Autozero
 ECD_1.AcqOn
 Fluxo = 1,00
 %B = 0,0
 %C = 0,0
 %D = 0,0
 Curva = 5

5,000 Fluxo = 1,00
 %B = 11,0

%C = 0,0
%D = 0,0
Curva = 5
Fluxo = 1,00
%B = 11,0
%C = 0,0
%D = 0,0
Curva = 4
130,000 Fluxo = 1,00
%B = 35,0
%C = 0,0
%D = 0,0
Curva = 4
132,000 Fluxo = 1,00
%B = 0,0
%C = 100,0
%D = 0,0
Curva = 5
133,000 Fluxo = 1,00
%B = 0,0
%C = 100,0
%D = 0,0
Curva = 5
142,000 Fluxo = 1,00
%B = 0,0
%C = 0,0
%D = 0,0
Curva = 5
143,000 Fluxo = 1,00
%B = 0,0

%C = 0,0
 %D = 95,0
 Curva = 5
 152,000 Fluxo = 1,00
 %B = 0,0
 %C = 0,0
 %D = 95,0
 Curva = 5

ECD_1.AcqOff

Fim

[00195] A avaliação de dados é realizada utilizando Dionex Chromeleon v6.60 (Dionex Corporation, Sunnyvale, Califórnia, EUA). A Versão 6.60 do "Manual Tutorial e do Usuário", março de 2004, pode ser obtida na Dionex ou baixada na home page (<http://www.dionex.com>).

[00196] Para comparar os cromatogramas contra um outro, os picos identificados, dos maltooligossacarídeos diferentes, foram normalizados para cada cromatograma (soma de todas as áreas de pico = 1). A avaliação se baseava na "linha de base com força comum", como descrito em Dionex Chromeleon v.6.60 para "linha de base em log". Para fazê-lo, a linha de base em log é colocada logo antes do primeiro pico de cadeia lateral e até o último pico que possa ser avaliado do cromatograma mais curto de uma distância de medida; isto forma a base para o cálculo do último pico que pode ser avaliado para todos os cromatogramas.

9) Determinação das características de cozimento e da textura dos grãos de arroz cozidos

[00197] Os grãos de arroz brancos que foram processados como descrito sob 4) "Processamento de grãos de arroz" foram utilizados para a determinação das características de cozimento. Antes do cozi-

mento, as dimensões dos grãos e o peso dos grãos foram determinados. O cozimento acarretou em uma proporção de água-arroz de 20:1.

[00198] A água foi levada até a fervura, o arroz foi adicionado e a entrada de calor foi reduzida de forma que a água foi mantida em fervura suavemente (durante este processo, o arroz foi misturado a cada 3 minutos). O tempo de cozimento mínimo foi determinado através do teste com lâminas de vidro como descrito por Juliano (1984; J. of Tex. Studies 15: 357-376). Para fazê-lo, em cada caso 10 grãos foram espremidos entre duas lâminas de vidro em intervalos de 1 minuto. O tempo de cozimento mínimo foi atingido no ponto de tempo em que 90% dos grãos não exibiam mais um centro branco. O tempo de cozimento ótimo foi atingido através do prolongamento do processo de cozimento em dois minutos adicionais. O arroz foi forçado através de uma peneira e resfriado à temperatura ambiente. Depois disso, as dimensões dos grãos e o peso dos grãos cozidos foram novamente determinados. A textura foi medida utilizando grãos de arroz recém-cozidos (aproximadamente 1 h após o cozimento), em grãos de arroz que foram armazenados durante 22 horas a 4°C e reaquecidos até a temperatura ambiente e em grãos de arroz que foram armazenados a 4°C (durante 22 horas) e então reaquecidos utilizando um forno ou um micro-ondas. Para reaquecer os grãos de arroz cozidos no forno, os primeiros foram colocados em um prato de alumínio que foi selado com folha de alumínio para evitar perdas na umidade. O prato foi incubado no forno durante 20 minutos a 80°C. O reaquecimento dos grãos no micro-ondas foi realizado em um recipiente para micro-ondas adequado durante 3 minutos a 360 watts. Após os dois processos de reaquecimento, os grãos foram armazenados durante 30 minutos à temperatura ambiente para garantir a temperatura uniforme dos grãos durante a medida.

[00199] A textura do arroz cozido proveniente dos experimentos

descritos anteriormente foi medida utilizando um Texture Analyser TAXT2 (Stable Micro Systems, Godalming, Reino Unido) com uma sonda circular de 2,5 cm de diâmetro e um teste de compressão dupla como o método de medida (adaptado de Champagne e outros (1998) Cereal Chem. 75 (2): 181-186). Para fazê-lo, os grãos de arroz foram comprimidos em um primeiro ciclo, então descomprimidos e recomprimidos, a força que os grãos aplicam sobre a sonda (pressão ou tração) sendo registrada continuamente. Cada amostra que seria analisada foi submetida a dez medidas sobre, em cada caso, três grãos, os grãos de arroz sendo colocados sob a sonda de tal maneira que não toquem um ao outro nem se estendam além das extremidades da sonda. Os parâmetros registrados eram a dureza (H) dos grãos de arroz cozidos (força máxima durante a primeira etapa de compressão) e a pegajosidade (-H) (força mínima após a primeira etapa de compressão), ver a figura 2. Todas as medidas de uma amostra foram avaliadas separadamente e forma estabelecidas depois disso médias para os parâmetros em questão.

10) Medida da alteração na dimensão dos grãos como o resultado do cozimento

[00200] As dimensões dos grãos (comprimento, largura e área) foram determinadas utilizando o software "SigmaScan Pro" Versão 5.0.0 da Systat (Erkrath, Alemanha). Para fazê-lo, em cada caso 30 grãos de arroz (não-cozidos e cozidos) sofreram varredura e a imagem formada foi avaliada através do software. Foram registrados ou calculados os parâmetros a seguir:

L_u - Comprimento do grão de arroz não-cozido

W_u - largura do grão de arroz não-cozido

L_c - Comprimento do grão de arroz não-cozido

W_c - largura do grão de arroz não-cozido

Proporção de $L/W = L_u/W_u$ ou L_c/W_c

ER - taxa de alongamento = L_c/L_u

CDC - Coeficiente de alteração dimensional = $(L_c-L_u)/(W_c-W_u)$

11) Análise térmica de farinha/amido de arroz através de calorimetria por varredura diferencial (= DSC)

[00201] Aproximadamente 10 mg (peso seco) de farinha de arroz ou de amido de arroz foram pesados em cubas de aço inoxidável (Perkin Elmer, "Large Volume Stainless Steel Pans" [03190218], Volume 60 μ L) em um excesso de água duplamente destilada (preferencialmente 30 μ L) e as cubas foram seladas hermeticamente. A amostra foi aquecida em um aparelho DSC, tipo Diamond (Perkin Elmer), de 20°C até 150°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/minuto. Uma cuba de aço inoxidável selada vazia foi utilizada como referência. O sistema foi calibrado utilizando quantidades definidas de índio.

[00202] Os dados foram analisados através de um programa de software da Pyris (Perkin Elmer, Versão 7.0). Os dados brutos que podiam ser avaliados foram processados através da análise de picos individuais das transições de fase de primeira ordem para o início de T (°C), máximo de T (°C), final de T (°C) e dH (J/g) (o padrão sendo a linha de base reta).

[00203] O início de DSC T é caracterizado como a projeção da linha de base e da tangente desenhada no flanco ascendente do pico ao longo do ponto de flexão. Isto caracteriza o início da transição de fase.

[00204] A temperatura máxima do pico de DSC T se refere à temperatura máxima em que a curva de DSC atingiu um máximo (isto é a temperatura em que a primeira diferenciação da curva é zero).

[00205] Para a função utilizada em Pyris (área máxima calculada), uma temperatura de início e uma temperatura final são introduzidas manualmente para o ajuste da linha de base.

12) Determinação do conteúdo de amilose aparente

[00206] O conteúdo de amilose aparente foi determinado através de

um método adaptado de Juliano (1971, Cereal Science Today 16 (10): 334-340).

[00207] Para cada amostra, 50 mg de farinha de arroz foram pesados em frascos Erlenmeyer de 100 mL (duas vezes) e umedecidos em sucessão com 1 mL de etano à concentração de 95% e 9 mL de NaOH a 1 M.

[00208] Em paralelo, frascos com quantidades definidas de amilose pura são tratados identicamente às amostras de farinha para estabelecer uma curva padrão. Os frascos foram inflados sucintamente para misturar a amostra e subsequentemente incubados durante 20 minutos em um banho de água em ebulação com agitação suave. Após o resfriamento à temperatura ambiente durante 5-10 minutos, o volume foi levado até 100 mL com água.

[00209] Uma alíquota de 100 µL foi tratada com 1 mL da solução de teste (ácido acético a 10 mM, 0,004% (p/v) de I₂; 0,04% (p/v) de KI), misturada vigorosamente e a absorção foi determinada em 620 nm contra um valor de branco correspondente. O conteúdo de amilose foi calculado com o auxílio dos padrões de amilose que são utilizados para o estabelecimento de uma curva de calibração.

13) Análise de farinha de arroz através do Rapid Visco Analyser (RVA)

[00210] O princípio desta análise se baseia em submeter uma suspensão de água e farinha de arroz a uma temperatura definida e a um protocolo de cisalhamento, durante o qual a viscosidade da suspensão é registrada continuamente. O instrumento de medida utilizado é um RVA Super3 da Newport Scientific (Macclesfield, Reino Unido) com o software correspondente "Thermocline for Windows", Versão 2.3.

[00211] Para a análise, 3 g de farinha de arroz (pesados na forma do peso seco puro do material de amostra, corrigido para 0% de umidade) foram pesados em um suporte analítico, tratados com 25 mL de água e o suporte analítico foi introduzido no aparelho após o último ter

recebido um agitador.

[00212] Foi aplicado o perfil de temperatura e cisalhamento a seguir:

Tempo	Tipo	Valor
00:00:00	Temp	50°C
00:00:00	Velocidade	960 rpm
00:00:10	Velocidade	160 rpm
00:01:00	Temp	50°C
00:04:48	Temp	95°C
00:07:18	Temp	95°C
00:11:06	Temp	50°C
00:12:30	Final do teste	

[00213] Após a medida ter terminado, foram determinados os parâmetros a seguir:

[00214] Viscosidade máxima (viscosidade mais alta durante o período de medida 2 até 7 minutos)

[00215] Viscosidade mínima (viscosidade mais baixa durante o período de medida 7 até 12 minutos)

[00216] Viscosidade final (viscosidade no final da medida)

"Breakdown" = Máxima - Mínima

"setback" = Final - Mínima

[00217] Temperatura de formação de pasta (temperatura em que a viscosidade muda em mais de 36 cp durante um intervalo de tempo de 0,1 minuto).

[00218] Tempo máximo (tempo em que a viscosidade máxima é atingida).

14) Determinação do teor de fosfato na posição C6 (conteúdo de C6-P)

[00219] No amido, as posições C3 e C6 das unidades de glicose podem estar fosforiladas. Para determinar o conteúdo de C6-P do

amido (método modificado de Nielsen e outros, 1994, Plant Physiol. 105: 111-117), 50 g de farinha de arroz foram hidrolisados durante 4 horas a 95°C em 500 µL de HCl a 0,7 M, com agitação contínua. Depois disso, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 15500 g e a turbidez foi removida dos sobrenadantes através de uma membrana de filtro (0,45 µM). 20 µL do hidrolisado translúcido foram misturados com 180 µL de tampão imidazol (imidazol a 300 mM, pH 7,4; MgCl₂ a 7,5 mM, EDTA a 1 mM e NADP a 0,4 mM). A medida foi realizada em um fotômetro a 340 nm. Após a absorção da base ter sido registrada, a reação enzimática foi iniciada através da adição de 2 unidades de glicose-6-fosfato desidrogenase (da *Leuconostoc mesenteroides*, Boehringer Mannheim). A alteração na absorção é causada por uma conversão equimolar de glicose-6-fosfato e NADP em 6-fosfogluconato e NADPH, a formação do NADPH sendo registrada no comprimento de onde mencionado acima. A reação foi monitorada até um platô ter sido atingido. O resultado desta medida fornece o conteúdo de glicose-6-fosfato no hidrolisado. O grau de hidrólise foi determinado partindo do hidrolisado idêntico com referência ao conteúdo na glicose liberada. O grau de hidrólise é utilizado para relacionar o conteúdo de glicose-6-fosfato com a porcentagem de amido hidrolisado partindo da quantidade de peso fresco. Para este fim, 10 µL de hidrolisado foram neutralizados com 10 µL de NaOH a 0,7 M e subsequentemente diluídos 1:100 com água. 4 µL dessa diluição foram tratados com 196 µL de tampão de medida (imidazol a 100 mM pH 6,9; MgCl₂ a 5 mM, ATP a 1 mM, NADP a 0,4 mM) e utilizados para a determinação da absorção da base. A reação foi monitorada através adição de 2 µL da mistura de enzimas (hexoquinase 1:10; glicose-6-fosfato desidrogenase de levedura 1:10 em tampão de medida) e a 340 nm até o platô ter sido atingido. O princípio da medida corresponde àquele da primeira reação.

[00220] O resultado desta medida fornece a quantidade de glicose (em mg) que foi liberada durante a hidrólise partindo do amido presente no material de partida.

[00221] Depois disso, os resultados das duas medidas são relacionados um ao outro para expressar o conteúdo de glicose-6-fosfato por mg de amido hidrolisado. Oposto de quando se relacionada a quantidade de glicose-6-fosfato com o peso fresco da amostra, este cálculo se refere à quantidade de glicose-6-fosfato apenas até a parte do amido que foi hidrolisada completamente para fornecer glicose e que pode assim ser também configurada como a fonte da glicose-6-fosfato.

15) Determinação do teor de amido resistente (digestibilidade)

[00222] O teor de amido resistente é determinado através de um método baseado no que foi descrito por Englyst e outros (1992, Europ. J. of Clinical Nutrition, 46/2: 33-50) com as modificações que são descritas abaixo.

[00223] A solução de enzima é preparada através da extração de 1,2 g de pancreatina (Merck) em 8 mL de água a 37°C durante 10 minutos. Após a centrifugação (3000 rpm; temperatura ambiente, 10 minutos), 5,4 mL do sobrenadante são misturados com 84 U de amiloglucosidase (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) e levados até um volume final de 7 mL com água.

[00224] Em paralelo, 10 mg de amido de arroz por amostra (peso fresco) são misturados em um recipiente de reação de 2 mL com 0,75 mL de tampão acetato de sódio (acetato de sódio a 0,1 M, pH 5,2; CaCl₂ a 4 mM) e incubados a 37°C durante 5 minutos para a quecer a mistura.

[00225] A digestão do amido é iniciada através da adição de 0,25 mL de solução de enzima a cada mistura. Uma mistura de controle apresenta água ao invés da solução de enzima adicionada. Alíquotas de 100 µL são removidas após 20, 60 e 120 minutos e adicionadas

diretamente a quatro vezes o volume de etanol, inativando assim as enzimas. Esta diluição é utilizada para medir o conteúdo de glicose.

[00226] Para esta finalidade, 2 µL de amostra diluída são misturados com 200 µL de tampão de medida (imidazol/HCl a 100 mM pH 6,9, MgCl₂ a 5 mM, ATP a 1 mM, NADP a 2 mM) e é medida a absorção da amostra em 340 nm. A conversão de glicose é iniciada através da adição de 2 µL de mistura de enzima (10 µL de hexoquinase, 10 µL de glicose-6-fosfato desidrogenase, 80 µL de tampão de medida) e a conversão equimolar de NADP em NADPH é seguida em 340 nm até um platô ser atingido. A relação entre as quantidades medidas de glicose e o peso seco de amido (calculado partindo do peso úmido menos o teor de água) fornece a proporção da amostra que foi liberada na forma de glicose após o período apropriado.

[00227] A quantidade de amido resistente foi calculada como a seguir:

$$RS [\%] = 100 \times \text{glicose liberada (mg)} / \text{peso seco de amido (mg)}$$

Exemplos

Exemplo 1: Vetor de transformação para a expressão de uma amido sintase IIa de trigo em arroz

[00228] Foram utilizados o vetor de transformação de arroz IR103-123 (descrito no WO 05/030941) e o plasmídeo CF31-191 (descrito na WO 97/45545 sob o nome pTaSSI). O vetor de transformação de arroz IR103-123 serve para a expressão específica ao endosperma do gene-alvo através do promotor da globulina do arroz. Em uma primeira etapa a), o vetor IR103-123 é linearizado utilizando as enzimas de restrição EcoRV e Xhol. O plasmídeo CF31-191 contém o cDNA de uma amido sintase II (SSII) de trigo (*Triticum aestivum*). Em uma segunda etapa b), o cDNA da SSII é cortado do plasmídeo CF31-191 utilizando as enzimas de restrição *Ecl136II* e *Xhol*. A ligação do vetor IR103-123

que foi linearizado na etapa a) e o fragmento, obtido na etapa b), do plasmídeo CF 31-191 fornecem o vetor AH32-191.

Exemplo 2: Produção de plantas de arroz modificadas geneticamente com uma maior atividade de SSII

[00229] Para gerar plantas modificadas geneticamente com uma maior atividade da amido sintase II (SSII), o T-DNA do plasmídeo AH32-191 foi transferido para plantas de arroz com o auxílio de agrobactéria como descrito por Ishida e outros (1996, *Nature Biotechnology* 14 (6): 745-750). O aumento da atividade de SSII é determinado através de zimogramas.

[00230] A Figura 1 mostra zimogramas de três linhagens de arroz modificadas geneticamente para a determinação da atividade de SSII em comparação com o tipo selvagem. O material utilizado era o extrato de proteínas totais de grãos imaturos (15 dias após o início do florescimento) do tipo selvagem e das respectivas linhagens modificadas geneticamente, em cada caso em quantidades idênticas. Os extratos de proteínas das linhagens modificadas geneticamente foram diluídos em etapas e a extensão até a qual a atividade era maior foi determinada através da comparação visual da intensidade da banda de SSII nestas faixas com a da "faixa do tipo selvagem". A atividade de SSII da linhagem GAOS0353-01502 é dez vezes mais alta que a nos grãos do tipo selvagem, a da linhagem GAOS0353-01301 seis vezes mais alta e a da linhagem GAOS0353-02301 duas vezes mais alta.

Exemplo 3: Características do amido de arroz de linhagens transgênicas diferentes com um nível de atividade de SSII diferente

[00231] Os grãos de arroz foram colhidos de plantas geradas como descrito no exemplo 2 e subsequentemente processados através do método descrito anteriormente ("4 Processamento de grãos de arroz") para fornecer farinha de arroz. O componente de amido da farinha de arroz foi subsequentemente analisado através do método descrito an-

teriormente ("7 Determinação do teor de fosfato na posição C6 (conteúdo de C6-P)") em relação ao seu teor de fosfato na posição C6.

Tabela 1: Características do amido de arroz com maior atividade de SSII

Linhagem	Expressão de SS2 (x vezes do tipo selvagem)	C-6-P (em % do tipo selvagem)
Tipo selvagem	1	100
GAOS0353-01301	6	184
GAOS0353-02501	10	358

Tabela 1: Características do amido de arroz com maior atividade de SSII em comparação com o tipo selvagem (wt). Os dados mostrados são a atividade de SSII (na forma de um múltiplo do tipo selvagem) e o conteúdo de glicose-6-fosfato (C-6-P) ligada ao amido.

[00232] Pode ser observado que o nível de atividade da amido sintase II se correlaciona com o nível do teor de fosfato na posição C6. A expressão da linhagem GAOS0353-01301 é aumentada em um fator de 6 e o conteúdo de C-6-P quase duplicou em comparação com o tipo selvagem. O efeito mais pronunciado é mostrado pela linhagem GAOS0353-02501, cuja expressão de SSII é aumentada em um fator de 10 e cujo conteúdo de C6-P é aumentado para mais de 350% em comparação com o tipo selvagem (100%).

Exemplo 4: Lista das propriedades de grãos de arroz, amido de arroz e farinha de arroz de linhagens modificadas geneticamente diferentes com níveis de expressão de SSII diferentes

Tabela 2: Propriedades do amido de arroz de grãos de arroz com expressão de SSII modificada em comparação com o tipo selvagem:

Linhagem	Expressão de SSII (x vezes do tipo selvagem)	Faixa aumentada de AP-SC	Faixa reduzida de AP-SC	C6P (nmol/mg de amido)	DSC T _{início}	DSC T _{máxima}	DSC T _{início} (%)	DSC T _{máxima} (%)
Tipo selvagem	1	X	X	0,50	64,1	69,5	100	100
GAOS0353-02301	2	10-26	6-9	0,74	76,2	80,8	119	116
GAOS0353-01301	6	11-29	6-9	0,92	N.D.	N.D.	N.D.	ND.D
GAOS0353-01502	10	12-31	6-10	1,80	77,6	82,5	121	119

[00233] Os dados fornecidos são a atividade de SSII no grão de arroz imaturo (na forma de múltiplos do tipo selvagem), as faixas das cadeias laterais de amilopectina do amido (AP-SC) que são modificadas significativamente em relação ao tipo selvagem, o teor de fosfato (C6P) e os valores de DSC em °C e em % de amido de arroz (em comparação com o tipo selvagem), (n.d. = não detectado).

[00234] O teor de fosfato na posição C6 dos amidos de linhagens modificadas geneticamente é significativamente aumentado em comparação com o tipo selvagem como uma função do nível de atividade de SSII.

Tabela 3: Propriedades da farinha de arroz de grãos de arroz com expressão de SSII modificada em comparação com o tipo selvagem.

Linha-gem	Expressão de SSII (x vezes do tipo selvagem)	DSC T _{início}	DSC T _{máxima}	DSC T _{início} (%)	DSC T _{máxima} (%)	Amilose (%)	Amilose (%) do tipo selvagem)
Tipo selvagem	1	65,6	71,5	100	100	14,0	100
GAOS03 53-02301	2	77,4	82,0	118	115	12,5	89
GAOS03 53-01301	6	77,6	82,5	118	115	12,5	89
GAOS03 53-01502	10	78,8	84,6	120	118	11,7	84

[00235] Os dados fornecidos são a expressão de SSII expressão no grão de arroz imaturo (como múltiplos do tipo selvagem), as alterações nos valores de DSC de farinha de arroz, em °C e em porcentagem (%)

do tipo selvagem.

[00236] O conteúdo de amilose aparente das linhagens modificadas geneticamente exibe apenas poucas modificações; as quais são todas ligeiramente menores que aquelas do tipo selvagem.

[00237] A estabilidade térmica, tanto das farinhas de arroz quanto dos amidos isolados das mesmas, aumenta gradualmente nas linhagens modificadas geneticamente diferentes como uma função da atividade de SSII (comparar a figura 1 e as tabelas 1 e 2). A maior manifestação do maior início de DSC T e da máxima DSC T é mostrada pela linhagem cuja atividade de SSII é maior dez vezes. Os dados são em cada caso de aproximadamente 120%, com base no tipo selvagem.

Exemplo 5: Comparação de linhagens de arroz modificadas geneticamente diferentes em relação ao nível de atividade e às cadeias laterais de amilopectina em comparação com o tipo selvagem (WT).

[00238] A Tabela 4 mostra a distribuição das cadeias laterais de amilopectina de linhagens de arroz modificadas geneticamente diferentes em comparação com o tipo selvagem. As curvas mostradas são o resultado da representação gráfica do comprimento de cadeia (em DP = Grau de Polimerização) das glucanas analisadas versus a porcentagem de DP particular do total de todos os DPs testados.

Tabela 4: Distribuição do perfil das cadeias laterais de amilopectina das linhagens modificadas geneticamente em comparação à farinha do tipo selvagem (WT), dividido em grupos com graus de polimerização diferentes.

Grau de polimerização (dp)	% baseada na farinha do tipo selvagem		
	GAOS0353-2301	GAOS0253-1301	GAOS0 0253-1502
Dp 6-10	81,4	66,3	47,0
Dp 20-25	108,7	115,7	123,8

[00239] Pode ser observado que um aumento na atividade de SSII acarreta uma alteração distinta na distribuição de cadeias laterais de amilopectina. Um aumento na atividade de SSII resulta em uma redução diferentemente pronunciada gradualmente das cadeias laterais com um DP entre 6-10 e um aumento nas cadeias laterais com um DP de 20-25.

Exemplo 6: Textura dos grãos de arroz cozidos

[00240] Os grãos de arroz de linhagens modificadas geneticamente diferentes e do tipo selvagem correspondente foram cozidos durante até o tempo de cozimento ótimo em questão (ver o método "determinação das características de grãos de arroz cozidos"). A textura é determinada em grãos de arroz que, após o cozimento, foram armazenados durante 22 horas a 4°C (tabela 5a, os dados mos trados são as médias de 10 medidas por amostra (em cada caso 3 grãos)) ou em grãos de arroz recém-cozidos (aproximadamente 1 hora após o cozimento) e em grãos de arroz que foram armazenados no frio (4°C, 22 h) e então reaquecidos em um forno ou um micro-ondas (tabela 5b).

Tabela 5a: Textura de grãos de arroz que foram armazenados durante 22 horas a 4°C após o cozimento

Amostra	Força 2 (pegajosidade em g)	Força 1 (dureza do grão em g)
Média do tipo selvagem M202	-239.5	1164.6
Média de GAOS0353- 02301	-137.0	1393.0
Média de GAOS0353- 01301	-82.0	1775.4
Média de GAOS0353- 01502	-18.3	1735.3

[00241] A pegajosidade dos grãos de arroz cozidos diminui com o

aumento da atividade de SSII (tabela 5a). A redução da pegajosidade na linhagem GAOS0353-02301 é reduzida até aproximadamente a metade, na linhagem GAOS0353-01301 em aproximadamente um fator de 3 e na linhagem GAOS0353-01502 aproximadamente em um fator de 13.

Tabela 5b: Textura de grãos de arroz recém-cozidos ou reaquecidos

Processamento dos grãos de teste	Amostra	Pegajosidade (g)	Pegajosidade (%)
Recém-cozidos	Tipo selvagem M202	-235,8	100,0
	GAOS0353-01502	-121,4	51,5
Reaquecidos no forno, 80°C/5 min	Tipo selvagem M202	-230,5	100,0
	GAOS0353-01502	-95,0	41,2
Reaquecidos em um micro-ondas 600 W/3 min	Tipo selvagem M202	-182,2	100,0
	GAOS0353-01502	-85,3	46,8

[00242] A compilação dos dados para a determinação da pegajosidade dos grãos de arroz cozidos após o cozimento e o reaquecimento no forno ou no micro-ondas (após armazenamento durante 22 horas a 4°C). Em cada variação do processamento, a pegajosidade da linhagem GAOS0353-01502 é notavelmente menor que a do tipo selvagem.

Exemplo 7: Determinação das dimensões do grão dimensions de grãos de arroz não-cozidos ou cozidos

[00243] As dimensões do grão de grãos de arroz não-cozidos ou cozidos de linhagens modificadas geneticamente e do tipo selvagem correspondente foram determinadas utilizando o software SigmaScan. Os resultados e os parâmetros derivados dos mesmos são mostrados

nas tabelas 5a e b.

Tabela 6a: Compilação dos dados para a determinação das dimensões do grão de grãos de arroz não-cozidos e cozidos.

	Tipo selvagem	GAOS0353-02301	GAOS0353-01301	GAOS0353-01502
Lu (in mm)	5,36	4,81	4,94	4,87
Wu (in mm)	2,60	2,58	2,65	2,50
Lc (in mm)	7,59	7,50	8,18	7,87
Wc (in mm)	3,74	3,61	3,23	3,26
ER	1,41	1,56	1,65	1,62
Lc/Wc	2,05	2,10	2,56	2,43
CDC	2,20	2,95	4,92	4,39

[00244] Os dados mostrados são as médias de 30 medidas independentes (L = comprimento do grão; W = largura do grão; u = não-cozido; c = cozido; ER = taxa de alongamento (Lc/Lu): CDC = coeficiente de alterações dimensionais ($Lc/Lu)/(Wc/Wu)$).

Tabela 6b: Alterações relativas das dimensões do grão em comparação com o tipo selvagem

	Tipo selvagem	GAOS0353-02301	GAOS0353-01301	GAOS0353-01502
Lu	0	-10,3	-7,8	-9,1
Wu	0	-0,8	1,9	-3,8
Lc	0	-1,2	7,8	3,7
Wc	0	-3,5	-13,6	-12,8
ER	0	10,6	17,0	14,9
Lc/Wc	0	2,4	24,9	18,5
CDC	0	34,1	123,6	99,5

[00245] Todos os dados em porcentagem: % de alteração = (amostra - tipo selvagem)/tipo selvagem*100).

[00246] Em relação às dimensões do grão de grãos de arroz cozi-

dos, a maior atividade de SSII no arroz resulta em um alongamento significativamente maior dos grãos durante o cozimento ao longo do eixo longitudinal. Isso é evidente partindo da maior taxa de alongamento (ER) e da maior proporção de comprimento/largura (Lc/Wc). Novamente, a linhagem cuja atividade de SSII é maior duas vezes (GAOS0353-02301) mostra um grau menor de alteração em relação aos parâmetros descritos anteriormente, enquanto que as duas linhagens cujas atividades de SSII são seis vezes (GAOS0353-01301) ou dez vezes (GAOS0353-01502) maiores exibem manifestações muito mais pronunciadas.

Exemplo 8: Análise das características físico-químicas da farinha de arroz através do Rapid Visco Analyzer (RVA)

[00247] As farinhas de arroz de linhagens modificadas geneticamente diferentes e do tipo selvagem correspondente foram analisadas em relação as suas características físico-químicas como descrito no método "análise da farinha de arroz através de RVA".

[00248] A viscosidade da suspensão farinha de arroz/água foi registrada ao longo de uma temperatura definida e um programa de cisa-lhamento. Os gráficos e os dados analíticos das linhagens diferentes são mostrados nas tabelas 6a+b.

Tabela 7a: Compilação dos dados obtidos na determinação do comportamento da viscosidade de farinhas de arroz feitas com grãos de arroz de linhagens modificadas geneticamente com atividades de SSII diferentes

Amostra:	Tipo selvagem	353-02301	353-01301	353-01502
Viscosidade máxima (cP)	4767	4626	4322	3787
Mínima (cP)	2122	1755	1647	1515
"Breakdown" (cP)	2645	2871	2675	2272

Viscosidade final (cP)	2934	2338	2249	2065
"setback" (cP)	812	583	602	550
"setback" de arroz (cP)	-1833	-2288	-2073	-1722
Tempo máximo (min)	5,36	5,02	5,04	4,56
Temperatura de formação de pasta (°C)	72,8	82,3	81,7	83,9
Tempo de formação de pasta (min)	2,56	3,36	3,4	3,48
Tempo máximo – tempo de formação de pasta (s)	144,0	73,2	76,8	64,8

Tabela 7b: Alterações relativas dos parâmetros de RVA em comparação com o tipo selvagem

Amostra:	Tipo selvagem	353-02301	353-01301	353-01502
Viscosidade máxima (cP)	0,0	-3,0	-9,3	-20,6
Mínima (cP)	0,0	-17,3	-22,4	-28,6
"Breakdown" (cP)	0,0	8,5	1,1	-14,1
Viscosidade final (cP)	0,0	-20,3	-23,3	-29,6
"setback" (cP)	0,0	-28,2	-25,9	-32,3
"setback" de arroz (cP)	0,0	24,8	13,1	-6,1
Tempo máximo (min)	0,0	-9,5	-9,5	-12,0
Temperatura de formação de pasta (°C)	0,0	13,0	12,2	15,2
Tempo de formação de pasta (min)	0,0	32,8	31,3	35,9
Tempo máximo – tempo de formação de pasta (s)	0,0	-49,2	-46,7	-55,0

(todos os dados em porcentagem) % de alteração = (amostra - tipo selvagem)/tipo selvagem*100

[00249] O curso da viscosidade de farinhas do tipo selvagem e das linhagens modificadas geneticamente difere em um grande número de parâmetros. As amostras modificadas geneticamente começam a formação de pasta em um ponto no tempo notavelmente posterior, que pode ser observado partindo da maior "temperatura de formação de pasta". O desenvolvimento subsequente da viscosidade até a viscosidade maxima procede muito rapidamente, como pode ser observado partindo do "tempo máximo" mais curto das amostras modificadas geneticamente. Todos os outros parâmetros de viscosidade (máxima, **mínima**, final) são inferiores no caso das amostras modificadas geneticamente que no caso do tipo selvagem. Tem que ser mencionado aqui que a extensão das alterações ao longo do curso do tipo selvagem se refere ao nível da atividade de SSII. A linhagem com a atividade mais alta de SSII (GAOS0353-1502) exibe as viscosidades máxima, **mínima** e final mais baixas e, com um valor de mais de 10°C, a diferença mais alta na temperatura de formação de pasta.

[00250] Um outro aspecto muito óbvio é o desenvolvimento rápido da viscosidade das amostras modificadas geneticamente, que é refletido em um intervalo muito rápido entre o início da formação de pasta e o tempo da viscosidade máxima. Novamente, este parâmetro mostra uma dependência pronunciada do efeito sobre o grau em que a atividade de SSII é aumentada.

Exemplo 9: Digestibilidade do amido isolado

[00251] Os amidos dos transformantes GAOS353-2501 e GAOS 353-1301 exibem uma digestibilidade distintamente reduzida comparada com os do tipo selvagem.

[00252] A degradação enzimática do amido isolado no caso do transformante GAOS 353-1301 em relação ao do tipo selvagem é de

53% após 20 minutos, 67% após 60 minutos e 84% após 120 minutos.

[00253] A degradação enzimática do amido isolado no caso do transformante GAOS 353-2501 em relação ao tipo selvagem é de 39% após 20 minutos, 49% após 60 minutos e 68% após 120 minutos (Figura 3).

Tabela 8: Conteúdo de RS de amidos de arroz

	Conteúdo de RS (%)
Tipo selvagem	6,2
353-2501	35,8
353-1301	20,8

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para aumentar o teor de fosfato, na posição C6 de amidos de células vegetais geneticamente modificadas, de 160 a 400%, em comparação aos amidos de células vegetais do tipo selvagem não geneticamente modificadas correspondentes (100%), caracterizado pelo fato de que:

(a) uma célula vegetal é geneticamente modificada através da introdução de uma molécula de ácido nucleico exógena, que codifica uma amido sintase solúvel II, e

(b) a atividade enzimática de amido sintase solúvel II é aumentada de 600 a 1200% em comparação a células vegetais não geneticamente modificadas.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido nucleico exógena é a região codificadora de uma amido sintase solúvel II heteróloga.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amido sintase solúvel II é uma amido sintase solúvel II de uma planta monocotiledônea.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amido sintase solúvel II é uma amido sintase solúvel II de trigo.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amido sintase solúvel II mostrada apresenta a sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID No. 1.

6. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que as células vegetais modificadas geneticamente são células vegetais de batata, milho ou arroz.

7. Amido de arroz, caracterizado pelo fato de que apresenta uma temperatura de início de DSC T entre 70°C e 80°C e um teor de

fosfato, na posição C6, entre 0,9 e 2,5 nmol de fosfato por miligrama de amido.

8. Amido de arroz, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a temperatura de início de DSC T está 5 entre 72°C e 79°C.

9. Farinha de arroz, caracterizada pelo fato de que compreende o amido de arroz, como definido na reivindicação 7 ou 8.

Determinação da atividade de SSII em linhagens modificadas geneticamente

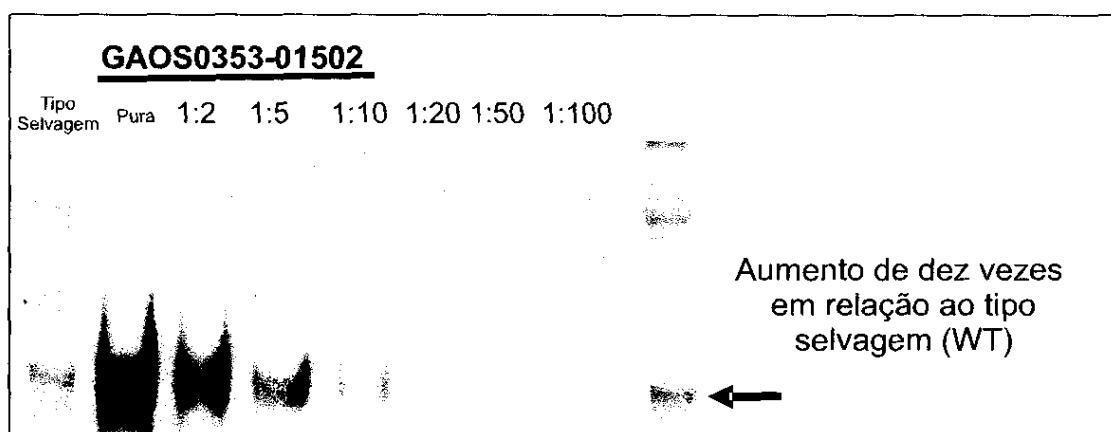
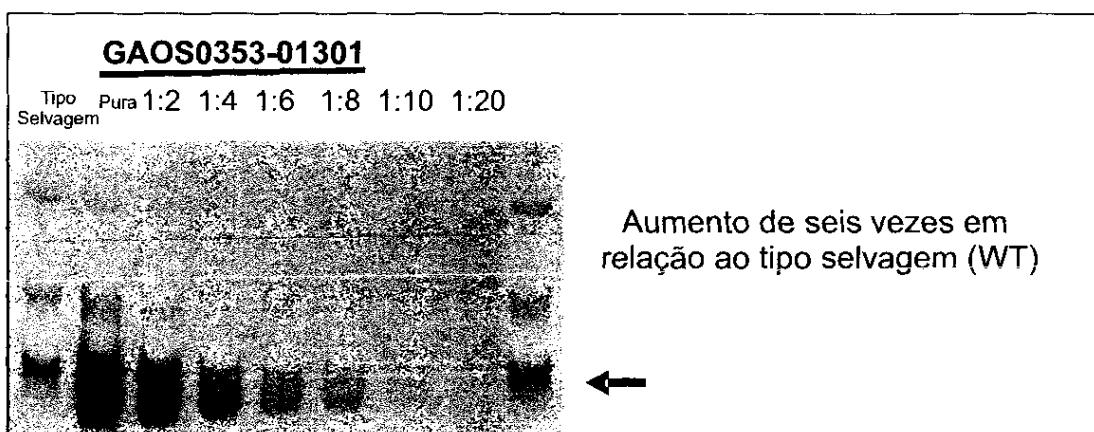
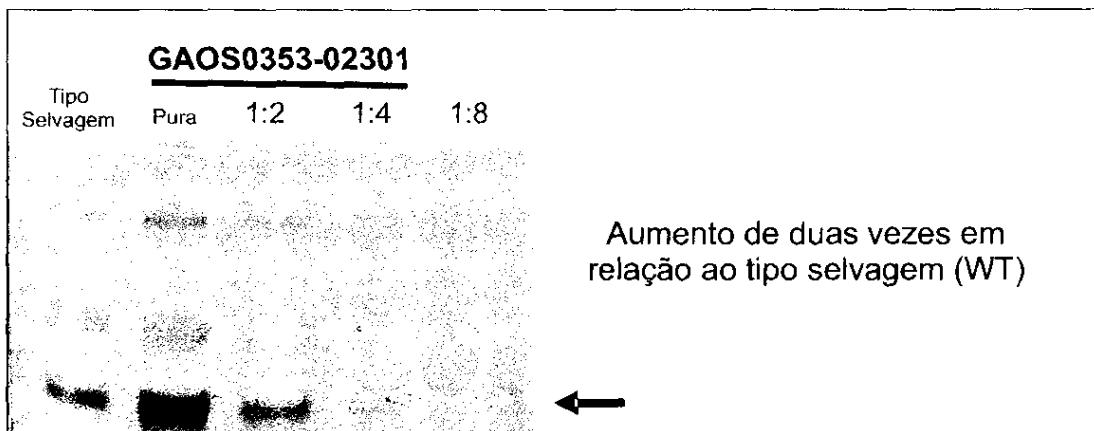
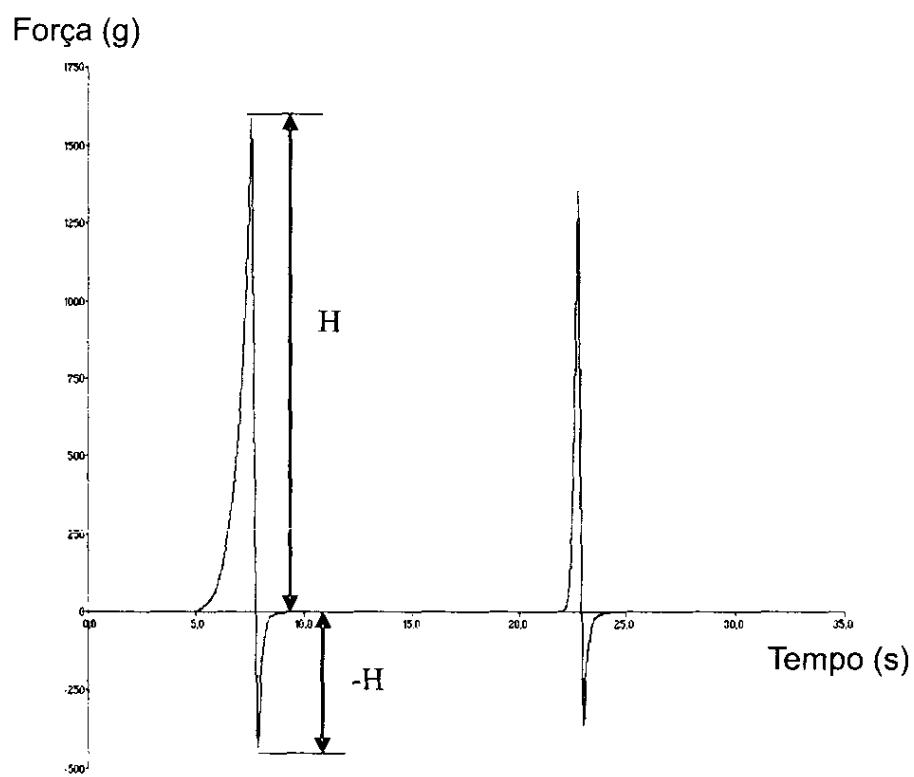


FIG. 1

Brasil - Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Fis. - Rub.: 184
Câmara de Comércio Exterior - Gabinete do Presidente



Determinação da textura dos grãos de arroz

FIG. 2

Circular da Propriedade Industrial - Série
 183
 Rub: 183
 183

Digestibilidade de amidos de arroz diferentes

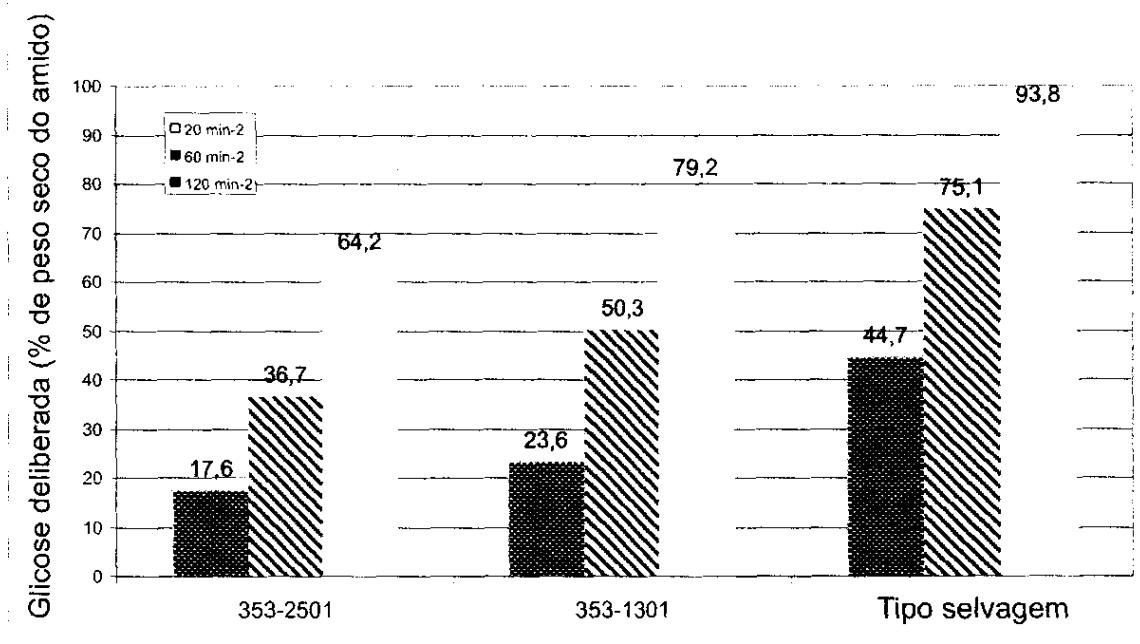


FIG. 3

Digestibilidade de amido isolado de farinha de arroz após 20, 60 e 120 minutos (medida como a glicose liberada na forma da porcentagem do peso seco do amido). Comparaçāo entre o tipo selvagem e os transformantes GAOS353-1301 e GAOS353-2501.

Nacional da Propriedade
Fls. 184
Rub: V

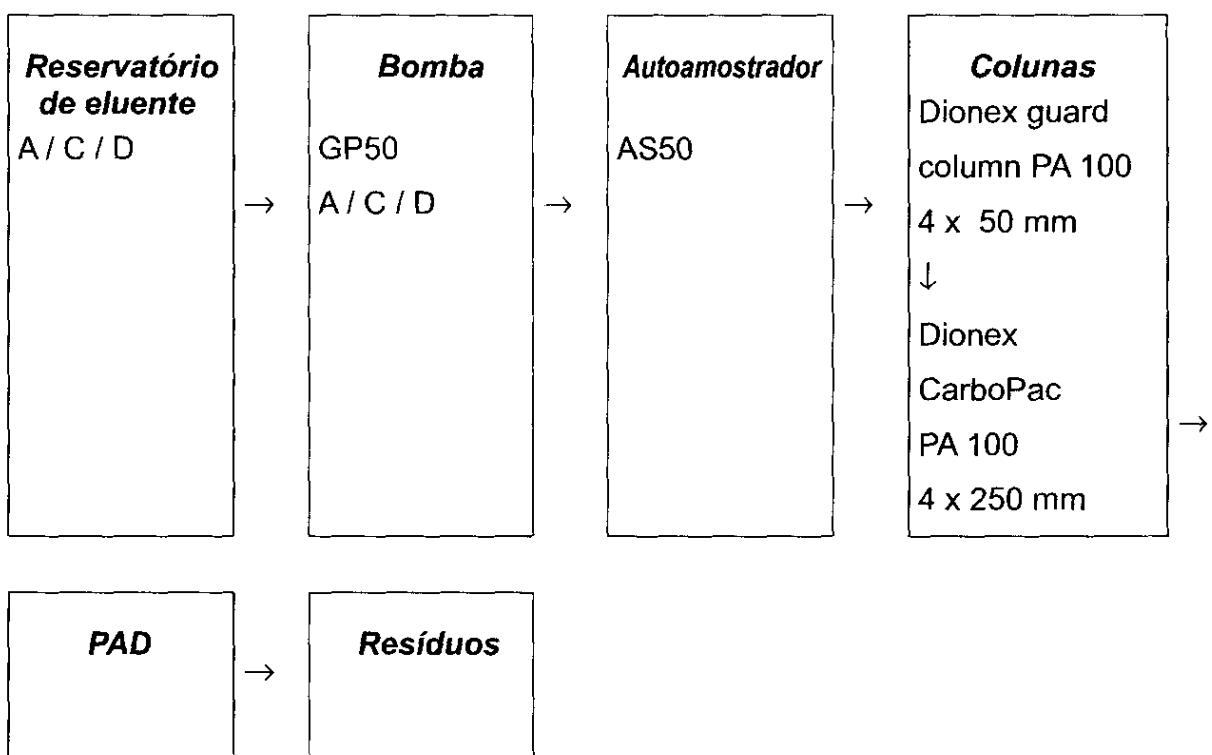


FIG. 4