

(11) Número de Publicação: PT 839211 E

(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)

C12P025/00 A C12N015/60 B
 C12N015/31 B

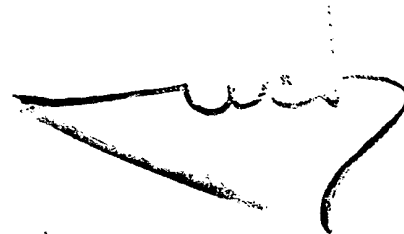
(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1996.07.10	(73) Titular(es): BASF AKTIENGESELLSCHAFT - D-67056 LUDWIGSHAFEN DE
(30) Prioridade: 1995.07.13 DE 19525281 1995.12.06 DE 19545468	FORSCHUNGSZENTRUM JULICH GMBH POSTFACH 19 13 52428 JULICH DE
(43) Data de publicação do pedido: 1998.05.06	(72) Inventor(es): BRUNO KASLER HERMANN SAHM KLAUS-PETER STAHMANN GEORG SCHMIDT THEO BODDECKER DE DE DE DE DE
(45) Data e BPI da concessão: 2001.06.06	(74) Mandatário(s): MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO 50, 5º AND. 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE RIBOFLAVINA POR MEIO DE MICROORGANISMOS COM ACTIVIDADE DE ISOCITRATOLIASSE MODIFICADA

(57) Resumo:

PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE RIBOFLAVINA POR MEIO DE MICROORGANISMOS COM ACTIVIDADE DE ISOCITRATOLIASSE MODIFICADA



DESCRIÇÃO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE RIBOFLAVINA POR MEIO DE MICROORGANISMOS COM ACTIVIDADE DE ISOCITRATOLIASSE MODIFICADA"

A presente invenção refere-se a um processo para a preparação de riboflavina por meio de microorganismos com actividade de isocitratoliase modificada.

A vitamina B₂, também designada por riboflavina, é essencial para o homem e para os animais. Nos casos de carência de vitamina B₂ surgem inflamações das mucosas da boca e da faringe, gretas nos cantos da boca, prurido e inflamações nas pregas da pele, entre outras lesões da pele, inflamações da conjuntiva, capacidade de visão reduzida e turvação da córnea. No caso de crias de mamíferos e de crianças podem surgir paragens de crescimento e perda de peso. Por conseguinte, a vitamina B₂ tem importância económica, em especial como preparado de vitamina para carências vitamínicas, bem como como aditivo para rações. Além disso, é igualmente empregue como corante de produtos alimentares, por exemplo, em maionese, gelados, pudins, etc.

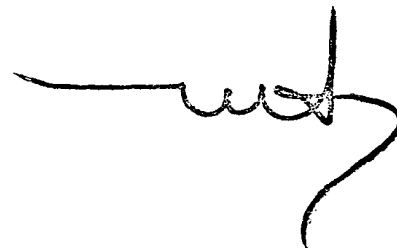
A preparação da riboflavina é realizada ou quimicamente, ou por via microbiana. No processo químico de preparação a riboflavina é obtida, regra geral, como produto final puro, em processos em vários passos nos quais têm que ser utilizados produtos de partida relativamente onerosos — como por exemplo, a D-ribose.

A preparação desta substância por meio de microorganismos oferece uma alternativa à preparação da riboflavina por via química. Como produtos de partida para a síntese microbiana podem ser utilizadas matérias primas renováveis, como por exemplo, óleos vegetais.

É conhecida a preparação da riboflavina por fermentação de fungos, como *Ashbya gossypii* ou *Eremothecium ashbyii* (The Merck Index, Windholz et al., eds. Merck & Co., pág. 1183, **1983**); todavia, para a produção da riboflavina também são apropriadas leveduras, como por exemplo, *Candida* ou *Saccharomyces*, e bactérias, como *Clostridium*. Estão descritas, por exemplo, na Patente EP 405370, estirpes de bactérias superprodutoras de riboflavina, tendo as estirpes sido obtidas a partir de *Bacillus subtilis*, por transformação do gene da biossíntese de riboflavina. Estes genes procariontes não são, no entanto, apropriados para um processo recombinante de preparação da riboflavina com eucariontes, como *Saccharomyces cerevisiae* ou *Ashbya gossypii*.

No documento WO 93/03183 é descrita a clonagem dos genes específicos para a biossíntese da riboflavina, a partir do organismo eucariótico *Saccharomyces cerevisiae*. Por meio deste gene podem ser construídos microorganismos eucarióticos recombinantes, que conseguem alcançar uma produção eficiente de riboflavina.

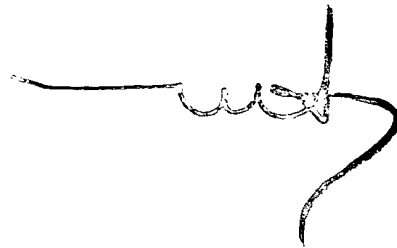
Frequentemente, no entanto, os produtos de partida e o substrato do enzima da biossíntese da riboflavina ocorrem no microorganismo em quantidade limitada, de modo que, apesar do aumento da actividade da biossíntese da riboflavina, não se consegue alcançar qualquer aumento da produção de riboflavina.



Punha-se, pois, o problema de se desenvolver um processo microbiano aperfeiçoado para a produção de riboflavina, que utilizasse microorganismos que não possuam qualquer limitação do substrato, ou, quando muito, uma reduzida limitação, e que permita, por conseguinte, uma produção maior de riboflavina.

O problema foi solucionado de acordo com a invenção de forma que os microorganismos utilizados possuam uma modificação na sua actividade endógena de isocitratoliase. A modificação é definida em relação à estirpe inicial não modificada. Existe uma série de possibilidades de se obterem microorganismos desta natureza com actividade ICL modificada.

Uma dessas possibilidades consiste no facto de se modificar o gene endógeno de ICL de tal modo que este codifique para um enzima com actividade ICL mais intensa em relação ao enzima de partida. Pode ser alcançado um aumento da actividade enzimática, por exemplo, realizando-se uma maior reacção de substrato por alteração do centro catalítico, ou fortalecendo-se a acção de inibidores de enzimas. Também se pode promover uma actividade enzimática mais intensa por aumento da síntese do enzima, por exemplo, por amplificação do gene, ou por eliminação de factores que reprimem a biossíntese do enzima. A actividade ICL endógena é elevada, de preferência, por mutação do gene endógeno de ICL. As mutações desta natureza podem ser produzidas, de forma não dirigida, quer por métodos clássicos, como por exemplo, por meio de radiação UV, quer por meio de agentes químicos que desencadeiam a mutação, ou de forma precisa por meio de métodos da técnica genética, tais como eliminações, inserções ou substituições.



A expressão do gene de ICL é aumentada através do aumento do número de cópias do gene de ICL e/ou através do reforço de factores de regulação que influenciam positivamente a expressão do gene de ICL. Assim, pode ser realizado um reforço de elementos reguladores de preferência no plano da transcrição, sendo utilizados sinais de transcrição fortes, como promotores e intensificadores. Além disso, porém, é igualmente possível um reforço da translação, por exemplo, melhorando-se a estabilidade do m-RNA. Para o aumento do número de cópias do gene, o gene de ICL é inserido num constructo de gene ou num vector, que de preferência contém a sequência genética reguladora que corresponde ao gene de ICL, em especial as que reforçam a expressão do gene. Em seguida um microorganismo que produz riboflavina é transformado com o constructo de gene que contém o gene de ICL.

O gene de ICL é de preferência isolado de microorganismos, em especial do fungo *Ashbya gossypii*. No entanto, para o isolamento do gene interessam também todos os outros organismos cujas células contêm a sequência anaplerótica do ciclo do glioxilato e, por consequência, a isocitratoliase, e, por conseguinte, também plantas. O isolamento do gene pode ser realizado por complementação homóloga ou heteróloga de um mutante defeituoso no gene de ICL, ou também por sondagem heteróloga, ou PCR com "*primers*" heterólogos. Para a subclonagem, o inserto do plasmídeo complementante pode em seguida ser minimizado no tamanho, por cortes apropriados com enzimas de restrição. Depois da sequenciação e identificação do gene suposto é realizada uma subclonagem exactamente adaptada por fusão-PCR. Plasmídeos que transportam como inserto os fragmentos assim obtidos são introduzidos no mutante de gene de ICL-defeito, que é ensaiado quanto à funcionalidade do gene de ICL. Os constructos funcionais são

em seguida utilizados para a transformação de um organismo produtor de riboflavina.

Depois do isolamento e sequenciação são susceptíveis de obtenção genes de isocitratoliase com sequências de nucleótidos que codificam para as sequências de aminoácidos indicadas em SEQ ID NO:2 ou para as suas variações alélicas. As variações alélicas compreendem em especial derivados funcionais que são susceptíveis de obtenção por eliminação, inserção ou substituição de nucleótidos da sequência representada em SEQ ID NO:1, mantendo-se, no entanto, a actividade de ICL.

A preceder os genes de isocitratoliase é ligado em especial um promotor da sequência nucleotídica dos nucleótidos 176 até 550, de acordo com a SEQ ID NO:1, ou uma sequência de ADN de acção essencialmente idêntica. Assim, por exemplo, o gene pode ser antecedido de um promotor, que se distingue do promotor com a sequência de nucleótidos indicada por uma ou várias permutas de nucleótidos, por inserção(inserções) e/ou eliminação(eliminações), sem que, no entanto, a funcionalidade ou a eficácia do promotor seja prejudicada. Além disso, o promotor pode também ser aumentado na sua eficácia por modificação da sua sequência, ou ser permutado completamente com promotores mais eficazes.

Para além disso, podem ainda ser colocadas a seguir ao gene de ICL sequências genéticas reguladoras, ou genes reguladores, que aumentam em especial a actividade do gene de ICL. Assim, podem ser colocadas a seguir ao gene de ICL, por exemplo, os chamados "*intensificadores*", que, através de uma acção recíproca melhorada entre

a RNA-polimerase e o ADN, originam uma maior expressão do gene de ICL.

Podem anteceder ou seguir-se ao gene de isocitratoliase, com ou sem o promotor colocado antes, ou com ou sem reguladores, uma ou mais sequências de ADN, de modo que o gene esteja contido numa estrutura genética.

Por clonagem do gene de ICL podem ser obtidos plasmídeos ou vectores que contêm o gene de ICL e que — como já foi citado anteriormente — são apropriados para a transformação de um organismo produtor de riboflavina. As células obtidas por transformação, em cujo caso se trata de preferência de células transformadas de *Ashbya gossypii*, contêm o gene numa forma replicável, isto é, em cópias adicionais sobre o cromossoma, sendo as cópias do gene integradas em qualquer posição do genoma e/ou sobre um plasmídeo ou vector, por recombinação homóloga.

Uma outra possibilidade de se produzirem microorganismos com actividade de ICL modificada consiste no facto de se produzirem microorganismos com uma resistência em relação a substâncias com acção de inibição de ICL, e seleccionarem-se estes. As substâncias inibidoras da isocitratoliase (ICL) são conhecidas dos peritos na técnica e estão indicadas, por exemplo, no Handbook of Enzyme Inhibitors, Editor: Hellmut Zollner, Verlag Chemie, Weinheim, 1993, na página 291. As substâncias inibidoras especialmente apropriadas são o fosfoenolpiruvato (PEP), 6-P-gluconato, maleato, mas em especial o itaconato e o oxalato.

Surpreendentemente, prova-se que, se forem agora cultivadas, na presença destas substâncias inibidoras, estirpes de microorganismos que produzem riboflavina, a formação da riboflavina é inibida. Isto manifesta-se, nas placas de cultura, na formação de colónias que não são amarelas, mas que permanecem antes brancas. Com este sistema podem, por conseguinte, ser facilmente reconhecidas estirpes que são resistentes contra uma inibição de isocitratoliase, visto que estas estirpes também formam riboflavina na presença de inibidores e, por conseguinte, formam colónias coradas de amarelo. As estirpes desta natureza podem aparecer ou por mutação espontânea, ou induzindo-se as correspondentes mutações através de métodos correntes, como por exemplo, métodos químicos, ou por radiação UV. Por conseguinte, podem ser obtidas estirpes de micro-organismos que segregam uma quantidade mais elevada de riboflavina no meio de cultura. Como estirpe mais resistente, com maior formação de riboflavina, foi obtida em especial a estirpe de *Ashbya gossypii* depositada no DSM sob o n.º 10067.

São utilizados como microorganismo, no processo de acordo com a invenção, de preferência fungos. Os fungos apropriados são, por exemplo, os que são indicados em Indian Chem. Engr. Section B, Vol. 37, n.º 1,2 (1995), na pág. 15, quadro 6.

São apropriados, em especial, os das espécies *Pichia*, *Eremothetium* e *Ashbya*, em especial *Ashbya gossypii*.

No entanto, podem igualmente ser utilizados outros microorganismos em vez de fungos, por exemplo, bactérias, em especial as que são indicadas em Indian Chem. Engr. Section B, Vol. 37, n.º 1,2 (1995), na pág. 16, quadro 6.

Exemplo 1:

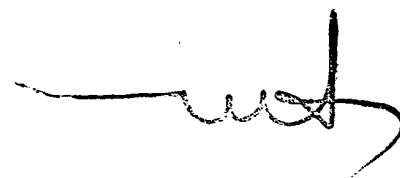
Preparação de um banco genómico de genes de *Ashbya gossypii*

Para a preparação de um banco de ADN genómico foi isolado ADN de cromossomas, de acordo com o método de Wright e Philippsen (1991, Gene 109: 99-105). O ADN foi digerido parcialmente com *Sau 3A* e fraccionado com um gradiente de densidade de sacarose. Os fragmentos maiores (figura 4) foram ligados com o vector "*vaivém*" de *E. coli*, *S. cerevisiae* YEp 352, cortado com *Bam HI* (J.E. Hill et al., 1993, Yeast 2: 163-167). Com este preparado de ligação foi transformado *E. coli* DH5 a. A partir de placas com ampicilina e X-Gal foram isoladas 3600 colónias que, pela sua cor branca, podiam ser reconhecidas como clones com plasmídeos que transportam insertos. A pesquisa de trinta destes clones escolhidos aleatoriamente revelou que, de facto, todos transportavam um plasmídeo, que estes tinham insertos numa gama de tamanho de 7 a 18 kb, e que todos os insertos eram diferentes, o que podia ser reconhecido com base na amostra de restrição. Em virtude de um tamanho do genoma de 7×10^3 kb para a *Ashbya gossypii*, a probabilidade de cada gene estar contido neste banco de genes situa-se em 97% a 99,99%. Fracções de 100 clones cada foram cultivadas numa placa de agar, em grande extensão, e em seguida os plasmídeos foram preparados como "*pool*". Em conformidade, o banco genético consistia em 36 "*pools*" de plasmídeo.

Exemplo 2:

Seleção do fragmento do banco genético que transporta *icl1*

Com as preparações de plasmídeo do banco genético foi transformada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ICL1d *ura3(fs)* (E. Fernández et al., 1992, Eur. J. Biochem. 204: 983-990). Este mutante é



disrupto no gene ICL1 e possui no gene ura3 uma mutação nos campos de leitura. Este genótipo conduz a que a estirpe não possa ser cultivada em etanol como fonte de carbono e apresente uma auxotrofia de uracilo. No primeiro passo as células da levedura, transformadas com o banco genético, foram seleccionadas em meio mínimo, com glucose como única fonte de carbono. Em virtude do gene ura3, existente no plasmídeo, só puderam ser cultivadas as células que tinham absorvido um plasmídeo, uma vez que o meio mínimo não continha uracilo. Neste passo foram obtidos 1900 clones. Estes foram transferidos, por replicação em placa, para um meio mínimo com etanol como única fonte de carbono. Como, para a cultura em etanol, é absolutamente necessária a isocitratoliase como enzima anaplerótico, só puderam ser cultivados os clones que transportavam no plasmídeo o gene ICL. Foi possível isolar dois clones que foram cultivados em etanol.

Exemplo 3:

Verificação da funcionalidade do fragmento do banco genético isolado

Para se verificar se a complementação do defeito de ICL do cromossoma era codificado pelo plasmídeo, os clones de *Saccharomyces* seleccionados foram cultivados duas vezes com uracilo em meio completo e as células obtidas foram isoladas sobre placas. A partir de 16, ou de 13, clones escolhidos ao acaso 7, ou 5, respectivamente, já não cresceram em meio mínimo com glucose. Precisamente estes clones também já não cresceram em meio mínimo com etanol. A cura do plasmídeo estava, pois, correlacionada com a perda da complementação de ICL1d.

A partir de um dos dois clones foi de novo isolado o plasmídeo. Este continha um inserto de cerca de 8 kb. Uma nova transformação do

mutante de *Saccharomyces* conduziu à complementação de todos os clones encontrados. O fragmento de 8 kb pôde ser encurtado por Sph I para 2,9 kb, que era totalmente funcional.

No extracto bruto dos transformandos cultivados em etanol a isocitratoliase podia ser medida com uma actividade específica de 0,3 U/mg de proteína. Além disso, a calda Western com anticorpos policlonais apresentava um sinal nítido contra o ICL de Ashbya.

PCR com *primers* provenientes de peptídeos tripticos de ICL produziu sinais fortes de grandeza esperada. A partir de um gel de electroforese bidimensional foi isolada uma proteína, foi decomposta em peptídeos com tripsina e foi sequenciada por degradação de Edmann. A comparação da sequência peptídica com os bancos de dados forneceu uma identidade de mais de 70% com a isocitratoliase de *Saccharomyces cerevisiae*. Os *primers* dela derivados foram utilizados para PCR. Do fragmento de gene complementar com cerca de 8 kb de tamanho foram sequenciados 3,3 kb (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467). Na sequência determinada, por comparação de dados, foi possível encontrar duas regiões codificantes. Um campo de leitura de 1680 bases (SEQ ID NO:1) apresenta uma identidade de 65% com o gene ICL1 de *Saccharomyces cerevisiae*. O gene de ICL situava-se 375 bases a montante de uma sequência que apresenta 84% de identidade com um Ser-tRNA de *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO:1).

Exemplo 4:

Funcionalidade de ICL subclonado num vector "*vaivém*" E.coli/-levedura/Ashbya

Dois fragmentos obtidos por digestão de restrição e um produto PCR do fragmento isolado do banco genético (figura 5) foram clonados no plasmídeo pAG 100 (figura 6) construído por Steiner e Philippsen (1994, Mol. Gen. Genet 242: 263-271). Quanto aos fragmentos, trata-se de um fragmento Sph I de 2,9 kb (pAG 100 icl.4) e de um fragmento Bgl 1/Eco RV de 2,2 kb (pAG 100 icl.6). Ambos os fragmentos continham o Ser-tRNA. Foi realizada, por isso, adicionalmente, uma amplificação PCR do gene suposto com pontos de corte Bam HI nele fundidos (pAG 100 icl.8). Os três ADNs foram clonados no sítio Bam HI do plasmídeo pAG 100. Com os plasmídeos obtidos foi transformado o mutante de levedura *Saccharomyces cerevisiae* ICL1d ura3 (fs). Os três constructos conduziram à complementação completa da disrupção ICL1d, isto é, transportavam genes funcionais.

Exemplo 5:

Acção dos plasmídeos que transportam ICL sobre a formação de riboflavina por *Ashbya gossypii*

A transformação de *Ashbya gossypii* (método: Wright e Philippsen, 1991, Gene 109: 99-105) com os plasmídeos apresentados acima conduziu a aumentos significativos da formação de riboflavina. Foram cultivados em balões com agitação, de 500 ml, com duas chicanas, que continham 50 ml de um meio composto por 10 g/l de óleo de soja, 10 g/l de extracto de levedura e 200 µg/ml de geneticina. A estirpe de controle, *A. gossypii* pAG 100, que continha um plasmídeo sem inserto, produziu em dois dias $18,7 \pm 0,1$ mg/l de riboflavina. As estirpes *A. gossypii* pAG 100.4 e *A. gossypii* pAG 100.6 produziram $31,2 \pm 6,1$ mg/l e $31,0 \pm 2,0$ mg/l, respectivamente, de riboflavina (figura 7). Não foi mensurável uma modificação significativa da actividade específica da isocitratoliase, devido à forte dispersão. A estirpe *A. gossypii* pAG 100.8

produziu, num meio que foi ainda suplementado por 3 g/l de glicina, no decurso de três dias, $65 \pm 5,6$ mg/l de riboflavina. Pelo contrário, a estirpe de controle *A. gossypii* pAG 100 formou, em comparação directa, apenas $29,9 \pm 1,8$ mg/l de riboflavina (figura 8). Nem na actividade específica de isocitratoliase, nem no peso em seco de micélio, foram medidas diferenças significativas.

Exemplo 6:

Purificação de uma isocitratoliase (ICL)

Para a identificação de substâncias com acção de inibição de ICL foi primeiro purificado o ICL de *Ashbya gossypii*. O isolamento e a purificação do enzima foram realizados depois do crescimento do micélio do fungo em óleo vegetal. Os passos individuais da purificação estão resumidos no quadro 1: em conformidade, um extracto bruto típico, preparado a partir de cerca de 25 g de micélio, que foi obtido por desagregação das células com uma prensa "*French*", contém 220 unidades de actividade de ICL. Após a centrifugação a cerca de 40 000 g, são ainda detectadas dissolvidas no sobrenadante cerca de 78% das mesmas. Uma precipitação fraccionada subsequente com sulfato de amónio conduz a uma acumulação tripla do enzima. Depois de uma filtração por gel com uma coluna de Sephacryl S-300 o TCL é ligado ao permutador de catiões mono-S-Sepharose e é eluído com NaCl. O preparado assim obtido é homogéneo na electroforese por gel de SDS-poliacrilamida e tem uma actividade específica de 18,4 U/mg.

Exemplo 7:

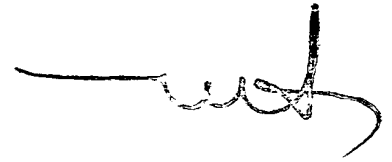
Identificação de inibidores de ICL

Com o enzima purificado podem-se medir, num ensaio colorimétrico (Dixon, H. e Kornberg, H.L. (1959), Biochem. J. 72, 3: Assay Methods for Key Enzymes of the Glyoxylate Cycle), as influências de substâncias sobre a actividade. No quadro 3 e na figura 1 são apresentados e representados, respectivamente, os efeitos das substâncias ensaiadas sobre o enzima. Foram ensaiadas, por um lado, substâncias que, como metabolitos nas células do fungo, poderiam ter um efeito inibidor sobre o enzima. Entre estas o 6-P-gluconato e o fosfoenolpiruvato exibiram as acções inibidoras mais nítidas, com mais de 50%, para uma concentração de 10 mM. No entanto, o itaconato e o oxalato, que provavelmente não ocorrem no metabolismo do fungo, actuaram ainda consideravelmente melhor. Uma concentração de 1 mmol conduziu já a 78% e a 95%, respectivamente, de inibição.

Exemplo 8:

Caracterização de um mutante seleccionado com itaconato

Através da acção de radiação UV sobre esporos isolados do fungo conseguiram-se produzir mutações no património genético. Com uma dose de radiação à qual sobreviveram 10 a 20% dos esporos utilizados, obtêm-se mutantes que são resistentes contra uma inibição, por itaconato, da formação de riboflavina. Um mutante assim isolado exhibe, na cultura em óleo de soja, uma formação de riboflavina 25 vezes superior, em comparação com a estirpe de partida (figura 2). A actividade específica de ICL cresce até 15% (figura 2) durante a fase de formação da riboflavina. Pode-se mostrar, com anticorpos, que a quantidade de proteína aumenta. O ICL do mutante exhibe o mesmo comportamento de inibição por itaconato que a estirpe de partida.



Exemplo 9:

Correlação da formação de riboflavina com a actividade específica de ICL

A observação de que o fungo, se for oferecida glucose como substrato, só começa a produção depois do consumo da glucose, fornece uma prova surpreendente sobre uma dependência causal entre a ICL e a formação da riboflavina. A ICL, que anteriormente era reprimida pela glucose, pode também, precisamente então, ser medida no extracto bruto e cresce até actividades como as que são encontradas em culturas em óleo (figura 3).

PROTOCOLO DE SEQUÊNCIA

(1) INFORMAÇÃO GERAL

(i) REQUERENTE:

- (A) NOME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) RUA: Carl-Bosch-Strasse 38
- (C) LOCALIDADE: Ludwigshafen
- (E) PAÍS: República da Alemanha
- (F) CÓDIGO POSTAL: D-67056
- (G) TELEFONE: 0621/6048526
- (H) TELEFAX: 0621/6043123
- (I) TELEX: 1762175170

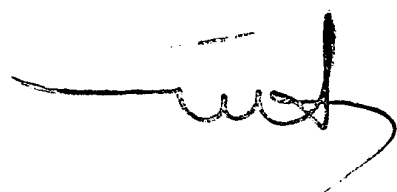
- (A) NOME: Forschungszentrum Juelich GmbH
- (B) RUA: Leo-Brandt-Strasse
- (C) LOCALIDADE: Juelich
- (E) PAÍS: Alemanha
- (F) CÓDIGO POSTAL: D-52425
- (G) TELEFONE: 02461-61 3004

- (ii) TÍTULO DO PEDIDO: Processo para a preparação de riboflavina por meio de microorganismos com actividade de isocitratoliase modificada

- (iii) NÚMERO DAS SEQUÊNCIAS: 2

- (iv) FORMA A LER PELO COMPUTADOR:

- (A) SUPORTE DE DADOS: "disquete"
- (B) COMPUTADOR: PC compatível com IBM
- (C) SISTEMA DE TRABALHO: PC-DOS/MS-DOS



(D) *SOFTWARE*: PatentIn Release #1.0; versão #1.25 (EPA)

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 2364 pares base
- (B) NATUREZA: ácidos nucleicos
- (C) FORMA DE ESPIRAL: dupla
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) NATUREZA DA MOLÉCULA: cADN a mRNA

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iii) SENTIDO INVERSO: NÃO

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOME/CHAVE: 5'UTR
- (B) POSIÇÃO: 1...550

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOME/CHAVE: CDS
- (B) POSIÇÃO: 551...2233

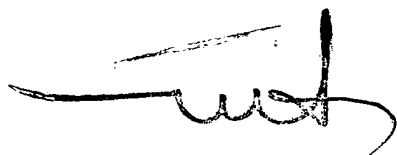
(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOME/CHAVE: 3'UTR
- (B) POSIÇÃO: 2234...2364

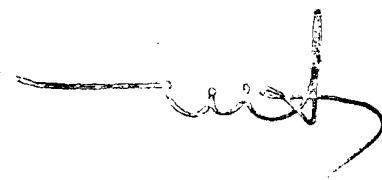
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 1:

CGAAAGCGCC AAATACCGGA AACGGCACAG GCGCAGCTCT AATAGCCGTT CCACGATAAC 60
 TTTGGAAGTT ATGGCACTAT GGCCGAGTGG TTAAGGCGAC AGACTTGAAA TCTGTTGGGC 120
 TCTGCCCCGCG CTGGTTCAAA TCCTGCTGGT GTCGTTATTT TTGCCGTTTC TTTTATAGATG 180
 AAACTCAGGG GCCTTTAGTC CGCCCTTTTG CCCGCTGATT CATCGCCCGC CAGCAACACC 240
 GGTGAGCCG ATCAGCGCAA GAACGCGCAA AGTCACGTAT GGCCCCTAAG AGTTGAGCTC 300
 TCCCCCTCGG CTCCTTCCGG GCGCGGAAAA GCCTGCGTCA CCCCATTAAAG TCCGAAACCG 360
 CGTTCAAGTG TACTTGGTCC GGGCCAATGT GGTGCGCTCA TCCGAGTCAC CGATACGCGAG 420
 GTGCGCCCCGT CGAGTCACCA TTAGGAGTAG AGCATCTGAT TATATATAGG CCTAGTTACA 480
 GCGGTAACAT AGACTGATAG CTCCAGCTCC AGCACTAGCT TGTAGGACAT CTGCGCGACA 540
 CCCAGTGAAC ATG TCC CCT TCC GTC AGA GAC GCC CGC AAC GAC CTT GCC 589
 Met Ser Pro Ser Val Arg Asp Ala Arg Asn Asp Leu Ala
 1 5 10
 AGC CTG CAA CAG CAG GCA GCC GCC GAA GCC GAG GAT ATT AGG AGA TGG 637
 Ser Leu Gln Gln Gln Ala Ala Ala Glu Ala Glu Asp Ile Arg Arg Trp
 15 20 25
 TGG AGC CAG CCA CGG TGG GCG GGC ACC AAG CGC GTC TAC ACG GCC GAG 685
 Trp Ser Gln Pro Arg Trp Ala Gly Thr Lys Arg Val Tyr Thr Ala Glu
 30 35 40 45
 GAC ATC GTC AAG CGC CGC GGC ACG TTC CCT GTC GTC GAA TAC CCA TCT 733
 Asp Ile Val Lys Arg Arg Gly Thr Phe Pro Val Val Glu Tyr Pro Ser
 50 55 60
 TCC GTA ATG GCG GAC AAG CTC GTG GAG ACA TTG GCG CGG CAC TCG CGC 781
 Ser Val Met Ala Asp Lys Leu Val Glu Thr Leu Ala Arg His Ser Arg
 65 70 75
 AAC GGC ACG GTT TCA CAG ACG TTC GGA GTG CTC GAC CCA GTG CAA ATG 829
 Asn Gly Thr Val Ser Gln Thr Phe Gly Val Leu Asp Pro Val Gln Met
 80 85 90
 ACG CAA ATG GTG AAG TAT CTG GAC ACG ATT TAC GTG TCT GGC TGG CAA 877
 Thr Gln Met Val Lys Tyr Leu Asp Thr Ile Tyr Val Ser Gly Trp Gln
 95 100 105
 TGC AGC GCC ACG GCT TCG ACC TCG AAC GAG CCT GGG CCC GAT CTC GCG 925
 Cys Ser Ala Thr Ala Ser Thr Ser Asn Glu Pro Gly Pro Asp Leu Ala
 110 115 120 125
 GAC TAT CCG ATG GAC ACC GTG CCA AAC AAG GTC GAG CAC CTG TTC ATG 973
 Asp Tyr Pro Met Asp Thr Val Pro Asn Lys Val Glu His Leu Phe Met

130								135				140				
GCG	CAG	CTG	TTC	CAC	GAC	CGG	AAA	CAG	CGC	GAG	GCC	CGC	CTG	TCG	TGC	1021
Ala	Gln	Leu	Phe	His	Asp	Arg	Lys	Gln	Arg	Glu	Ala	Arg	Leu	Ser	Cys	
			145					150					155			
ACT	ACC	CAG	CGC	GAG	CTC	GAC	CAA	TTG	GGG	CCT	GAG	ATT	GAC	TAC	TTG	1069
Thr	Thr	Gln	Arg	Glu	Leu	Asp	Gln	Leu	Gly	Pro	Glu	Ile	Asp	Tyr	Leu	
		160					165					170				
AGG	CCG	ATT	GTC	GCT	GAC	GCA	GAC	ACC	GGC	CAC	GGC	GGG	CTA	ACA	GCC	1117
Arg	Pro	Ile	Val	Ala	Asp	Ala	Asp	Thr	Gly	His	Gly	Gly	Leu	Thr	Ala	
	175					180					185					
GTC	TTT	AAA	CTC	ACG	AAG	ATG	TTC	ATC	GAG	CGC	GGT	GCA	GCC	GGT	ATC	1165
Val	Phe	Lys	Leu	Thr	Lys	Met	Phe	Ile	Glu	Arg	Gly	Ala	Ala	Gly	Ile	
190					195				200						205	
CAC	ATG	GAG	GAC	CAG	TCC	TCC	AGC	AAC	AAA	AAG	TGC	GGG	CAC	ATG	GCG	121
His	Met	Glu	Asp	Gln	Ser	Ser	Ser	Asn	Lys	Lys	Cys	Gly	His	Met	Ala	
				210				215						220		
GGC	CGC	TGC	GTG	ATC	CCT	GTT	CAG	GAG	CAC	ATT	AGT	CGT	TTA	GTG	ACT	1261
Gly	Arg	Cys	Val	Ile	Pro	Val	Gln	Glu	His	Ile	Ser	Arg	Leu	Val	Thr	
			225				230						235			
GTG	CGC	ATG	TGT	GCG	GAC	GTG	ATG	CAC	TCG	AAC	CTG	GTG	CTT	GTC	GCG	1309
Val	Arg	Met	Cys	Ala	Asp	Val	Met	His	Ser	Asn	Leu	Val	Leu	Val	Ala	
		240				245						250				
AGA	ACA	GAC	TCG	GAG	GCC	GCC	ACC	TTA	CTT	AGC	TCG	AAC	ATT	GAC	GCG	1357
Arg	Thr	Asp	Ser	Glu	Ala	Ala	Thr	Leu	Leu	Ser	Ser	Asn	Ile	Asp	Ala	
	255					260					265					
CGC	GAT	CAT	TAC	TAC	ATT	GTC	GGG	GCC	TCG	AAC	CCT	GAG	GTA	ACT	GTA	1405
Arg	Asp	His	Tyr	Tyr	Ile	Val	Gly	Ala	Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Thr	Val	
270					275					280					285	
CCG	CTG	ATC	GAA	GTT	TTG	GAC	GCC	GCG	CAG	CAG	GCC	GGC	GCC	TCA	GGT	1453
Pro	Leu	Ile	Glu	Val	Leu	Asp	Ala	Ala	Gln	Gln	Ala	Gly	Ala	Ser	Gly	
				290				295						300		
GAC	AGA	TTG	GCT	CAG	CTA	GAG	GAG	GAC	TGG	TGC	AAG	AAG	GCC	AAG	TTG	1501
Asp	Arg	Leu	Ala	Gln	Leu	Glu	Glu	Asp	Trp	Cys	Lys	Lys	Ala	Lys	Leu	
			305				310						315			
AGG	CTC	TTC	CAC	GAG	GCA	TTT	GCC	GAC	CAG	GTG	AAT	GCC	AGC	CCT	TCG	1549
Arg	Leu	Phe	His	Glu	Ala	Phe	Ala	Asp	Gln	Val	Asn	Ala	Ser	Pro	Ser	
		320				325						330				
ATC	AAA	GAC	AAG	GCG	GGC	GTT	ATT	GCC	AAA	TTT	AAC	TCA	CAG	ATC	GGG	1597
Ile	Lys	Asp	Lys	Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Lys	Phe	Asn	Ser	Gln	Ile	Gly	
	335					340					345					
CCA	CAG	ACA	GGC	GCG	TCG	ATC	AGA	GAG	ATG	CGC	AAA	CTG	GGC	CGC	GAG	1645
Pro	Gln	Thr	Gly	Ala	Ser	Ile	Arg	Glu	Met	Arg	Lys	Leu	Gly	Arg	Glu	
350					355					360					365	



CTG CTC GGG CAG GAC GTC TAC TTC GAC TGG GAC CTG CCT CGC GCT AGA Leu Leu Gly Gln Asp Val Tyr Phe Asp Trp Asp Leu Pro Arg Ala Arg 370 375 380	1693
GAG GGC TTG TAC CGC TAC AAG GGC GGC ACC CAG TGC GCG ATC ATG CGC Glu Gly Leu Tyr Arg Tyr Lys Gly Gly Thr Gln Cys Ala Ile Met Arg 385 390 395	1741
GCA CGC GCG TTC GCG CCG TAC GCC GAC CTG GTC TGG TTC GAA TCC AAC Ala Arg Ala Phe Ala Pro Tyr Ala Asp Leu Val Trp Phe Glu Ser Asn 400 405 410	1789
TTC CCT GAC TTC CAG CAG GCT AAG GAG TTT GCG CAG GGC GTG CGC GAG Phe Pro Asp Phe Gln Gln Ala Lys Glu Phe Ala Gln Gly Val Arg Glu 415 420 425	1837
AAG TTC CCC AAC AAG TGG ATG GCC TAC AAC TTG TCG CCC AGC TTC AAC Lys Phe Pro Asn Lys Trp Met Ala Tyr Asn Leu Ser Pro Ser Phe Asn 430 435 440 445	1885
TGG CCG AAG GCC ATG CCT CCC AAG GAG CAG GAG AAC TAC ATC CAA CGG Trp Pro Lys Ala Met Pro Pro Lys Glu Gln Glu Asn Tyr Ile Gln Arg 450 455 460	1933
CTG GGC GAG ATC GGA TAT GTG TGG CAG TTC ATC ACG CTA GCC GGC CTG Leu Gly Glu Ile Gly Tyr Val Trp Gln Phe Ile Thr Leu Ala Gly Leu 465 470 475	1981
CAT ACC AAT GCC TTG GCC ATC GAC AAC TTC TCG CGC GAA TTC AGC AGG His Thr Asn Ala Leu Ala Ile Asp Asn Phe Ser Arg Glu Phe Ser Arg 480 485 490	2029
TTC GGA ATG CGT GCG TAT GCA CAA GGC ATC CAG CAG AGG GAG ATG GAC Phe Gly Met Arg Ala Tyr Ala Gln Gly Ile Gln Gln Arg Glu Met Asp 495 500 505	2077
GAG GGC GTC GAT GTC CTA AAA CAC CAG AAG TGG GCC GGC GCA GAG TAT Glu Gly Val Asp Val Leu Lys His Gln Lys Trp Ala Gly Ala Glu Tyr 510 515 520 525	2125
GTT GAC AGC ATT CTC AAG CTT GCC CAG GGC GGT GTG TCT TCG ACA GCC Val Asp Ser Ile Leu Lys Leu Ala Gln Gly Gly Val Ser Ser Thr Ala 530 535 540	2173
TCG ATG GGT AAG GGT GTA ACC GAA GAG CAG TTC GGC TCC TCA AAC GGT Ser Met Gly Lys Gly Val Thr Glu Glu Gln Phe Gly Ser Ser Asn Gly 545 550 555	2221
GCC AAA CTA TGATATCATC TCTGAGTCAT TTCTCTCGAC AAGATCCTCG Ala Lys Leu 560	2270
GCCAGACTTC TGGAATATAT ATAACATCGG GTACCCCGAC ATCCCTGCCT TCCGCAACGT	2330
GCGAAGCAGC TGATACGTAT ACTTTAAACG CACA	2364



(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 560 aminoácidos

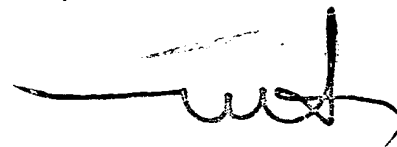
(B) NATUREZA: aminoácidos

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) NATUREZA DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Pro Ser Val Arg Asp Ala Arg Asn Asp Leu Ala Ser Leu Gln
 1 5 10 15
 Gln Gln Ala Ala Ala Glu Ala Glu Asp Ile Arg Arg Trp Trp Ser Gln
 20 25 30
 Pro Arg Trp Ala Gly Thr Lys Arg Val Tyr Thr Ala Glu Asp Ile Val
 35 40 45
 Lys Arg Arg Gly Thr Phe Pro Val Val Glu Tyr Pro Ser Ser Val Met
 50 55 60
 Ala Asp Lys Leu Val Glu Thr Leu Ala Arg His Ser Arg Asn Gly Thr
 65 70 75 80
 Val Ser Gln Thr Phe Gly Val Leu Asp Pro Val Gln Met Thr Gln Met
 85 90 95
 Val Lys Tyr Leu Asp Thr Ile Tyr Val Ser Gly Trp Gln Cys Ser Ala
 100 105 110
 Thr Ala Ser Thr Ser Asn Glu Pro Gly Pro Asp Leu Ala Asp Tyr Pro
 115 120 125
 Met Asp Thr Val Pro Asn Lys Val Glu His Leu Phe Met Ala Gln Leu
 130 135 140
 Phe His Asp Arg Lys Gln Arg Glu Ala Arg Leu Ser Cys Thr Thr Gln
 145 150 155 160
 Arg Glu Leu Asp Gln Leu Gly Pro Glu Ile Asp Tyr Leu Arg Pro Ile
 165 170 175
 Val Ala Asp Ala Asp Thr Gly His Gly Gly Leu Thr Ala Val Phe Lys
 180 185 190



Leu Thr Lys Met Phe Ile Glu Arg Gly Ala Ala Gly Ile His Met Glu
 195 200 205
 Asp Gln Ser Ser Ser Asn Lys Lys Cys Gly His Met Ala Gly Arg Cys
 210 215 220
 Val Ile Pro Val Gln Glu His Ile Ser Arg Leu Val Thr Val Arg Met
 225 230 235 240
 Cys Ala Asp Val Met His Ser Asn Leu Val Leu Val Ala Arg Thr Asp
 245 250 255
 Ser Glu Ala Ala Thr Leu Leu Ser Ser Asn Ile Asp Ala Arg Asp His
 260 265 270
 Tyr Tyr Ile Val Gly Ala Ser Asn Pro Glu Val Thr Val Pro Leu Ile
 275 280 285
 Glu Val Leu Asp Ala Ala Gln Gln Ala Gly Ala Ser Gly Asp Arg Leu
 290 295 300
 Ala Gln Leu Glu Glu Asp Trp Cys Lys Lys Ala Lys Leu Arg Leu Phe
 305 310 315 320
 His Glu Ala Phe Ala Asp Gln Val Asn Ala Ser Pro Ser Ile Lys Asp
 325 330 335
 Lys Ala Gly Val Ile Ala Lys Phe Asn Ser Gln Ile Gly Pro Gln Thr
 340 345 350
 Gly Ala Ser Ile Arg Glu Met Arg Lys Leu Gly Arg Glu Leu Leu Gly
 355 360 365
 Gln Asp Val Tyr Phe Asp Trp Asp Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gly Leu
 370 375 380
 Tyr Arg Tyr Lys Gly Gly Thr Gln Cys Ala Ile Met Arg Ala Arg Ala
 385 390 395 400
 Phe Ala Pro Tyr Ala Asp Leu Val Trp Phe Glu Ser Asn Phe Pro Asp
 405 410 415
 Phe Gln Gln Ala Lys Glu Phe Ala Gln Gly Val Arg Glu Lys Phe Pro
 420 425 430
 Asn Lys Trp Met Ala Tyr Asn Leu Ser Pro Ser Phe Asn Trp Pro Lys
 435 440 445
 Ala Met Pro Pro Lys Glu Gln Glu Asn Tyr Ile Gln Arg Leu Gly Glu
 450 455 460
 Ile Gly Tyr Val Trp Gln Phe Ile Thr Leu Ala Gly Leu His Thr Asn
 465 470 475 480

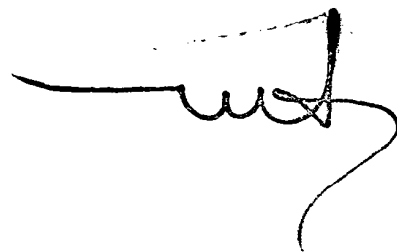
Ala	Leu	Ala	Ile	Asp	Asn	Phe	Ser	Arg	Glu	Phe	Ser	Arg	Phe	Gly	Met
				485					490					495	
Arg	Ala	Tyr	Ala	Gln	Gly	Ile	Gln	Gln	Arg	Glu	Met	Asp	Glu	Gly	Val
			500					505					510		
Asp	Val	Leu	Lys	His	Gln	Lys	Trp	Ala	Gly	Ala	Glu	Tyr	Val	Asp	Ser
		515					520					525			
Ile	Leu	Lys	Leu	Ala	Gln	Gly	Gly	Val	Ser	Ser	Thr	Ala	Ser	Met	Gly
	530					535					540				
Lys	Gly	Val	Thr	Glu	Glu	Gln	Phe	Gly	Ser	Ser	Asn	Gly	Ala	Lys	Leu
545					550					555					560

Lisboa, 24 JUL. 2001

Ana Silva Carvalho

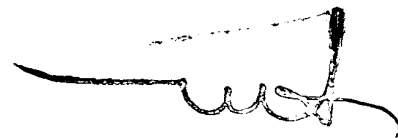
ANA SILVA CARVALHO
Adjunto

Dra. Maria Silvina Ferreira
Agente Oficial de Propriedade Industrial
R. Castilho, 50 - 2º - 1209 - 163 LISBOA
Telefs. 213 851 539 - 213 8150 50



REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação microbiana de riboflavina, por cultura de microorganismos que produzem riboflavina num meio nutriente e em seguida o isolamento da riboflavina produzida, caracterizado por serem utilizados microorganismos nos quais a actividade endógena de isocitratoliase (ICL) foi modificada.
2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os microorganismos, por mutação do gene de ICL endógeno, possuírem um enzima com alta actividade de ICL.
3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os microorganismos, através de um aumento do número de cópias do gene de ICL, possuírem uma elevada expressão do gene de ICL.
4. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o gene de ICL ter sido acoplado funcionalmente com sequências reguladoras de ADN, que permitem uma expressão genética reforçada do gene de ICL.
5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por serem utilizados microorganismos com resistência em relação a substâncias com acção de inibição de ICL.
6. Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por os microorganismos serem resistentes em relação às substâncias itaconato ou oxalato.



7. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado por ser utilizado um fungo como microorganismo.
8. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por ser utilizado o fungo da espécie Ashbya.
9. Gene de ICL que codifica para a sequência de aminoácidos representada em SEQ ID NO: 2.
10. Constructo genético contendo um gene de ICL de acordo com a reivindicação 9.
11. Constructo genético de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por o gene de ICL ter sido acoplado funcionalmente com um ou mais sinais de regulação, para o aumento da expressão do gene.

Lisboa, 24 JUL. 2001



ANA SILVA CARVALHO
Adjunto

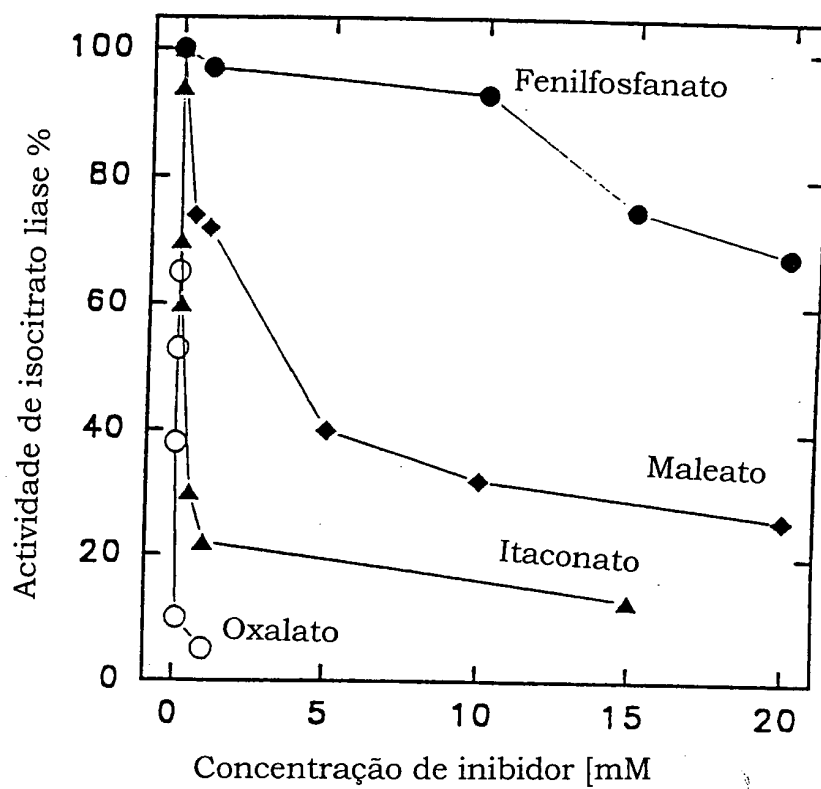
Dra. Maria Silvina Ferreira
Agente Oficial de Propriedade Industrial
R. Castilho, 50 - 5.º - 1200 - 163 LISBOA
Telefs. 213 851339 - 2138150 50

Fracção	Actividade total (Unidades)	Proteína total (mg)	Actividade específica (U/mg de proteína)	Factor de purificação (vezes)	Rendimento (%)
Extracto bruto	220	1310	0.17	1.0	100
Sobrenadante a 40 000 g	170	730	0.23	1.3	78
Sobrenadante de (NH ₄) ₂ SO ₄ a 35%	160	630	0.25	1.5	72
Grânulos de (NH ₄) ₂ SO ₄ a 60%	160	300	0.53	3.1	72
Eluído de Sephacryl S-300	52	5	10.8	63	23
Eluído de mono-S	35	0.5	18.4	108	16

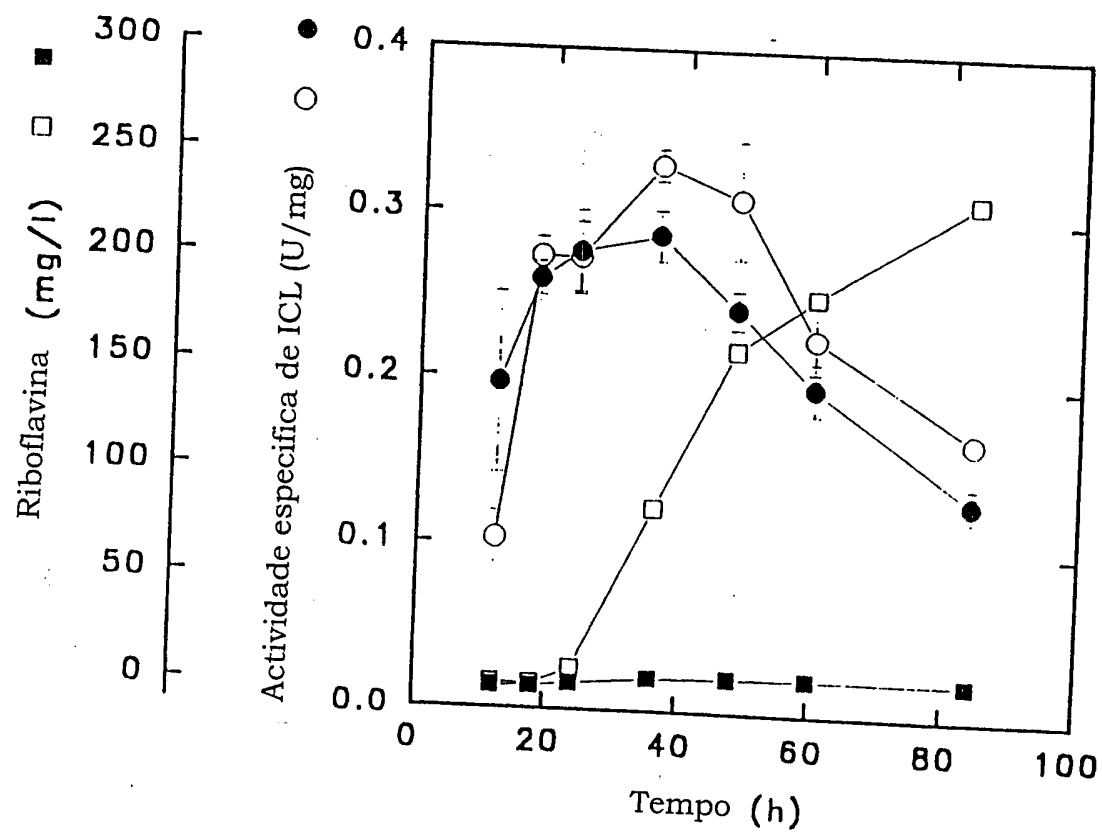
QUADRO 1

Inibidor	Concentração (mM)	Inibição (%)	Tipo de inibidor
Glucose-6-P	10	<5	
Citrato	10	22	
Fumarato	10	25	
Succinato	10	34	não competitivo; K _j : 15,8 mM
Malato	10	36	
PEP	10	55	tipo hiperbólico misto
6-P-gluconato	10	60	
Glicina	10	<5	
Aspartato	10	13	
Glutamato	10	15	
Fenilfosfato	10	7	
Maleato	10	68	
Itaconato	1	78	tipo linear misto K _j : 0,17 mM
Oxalato	1	95	não competitivo; K _j : 0,004 mM

QUADRO 2

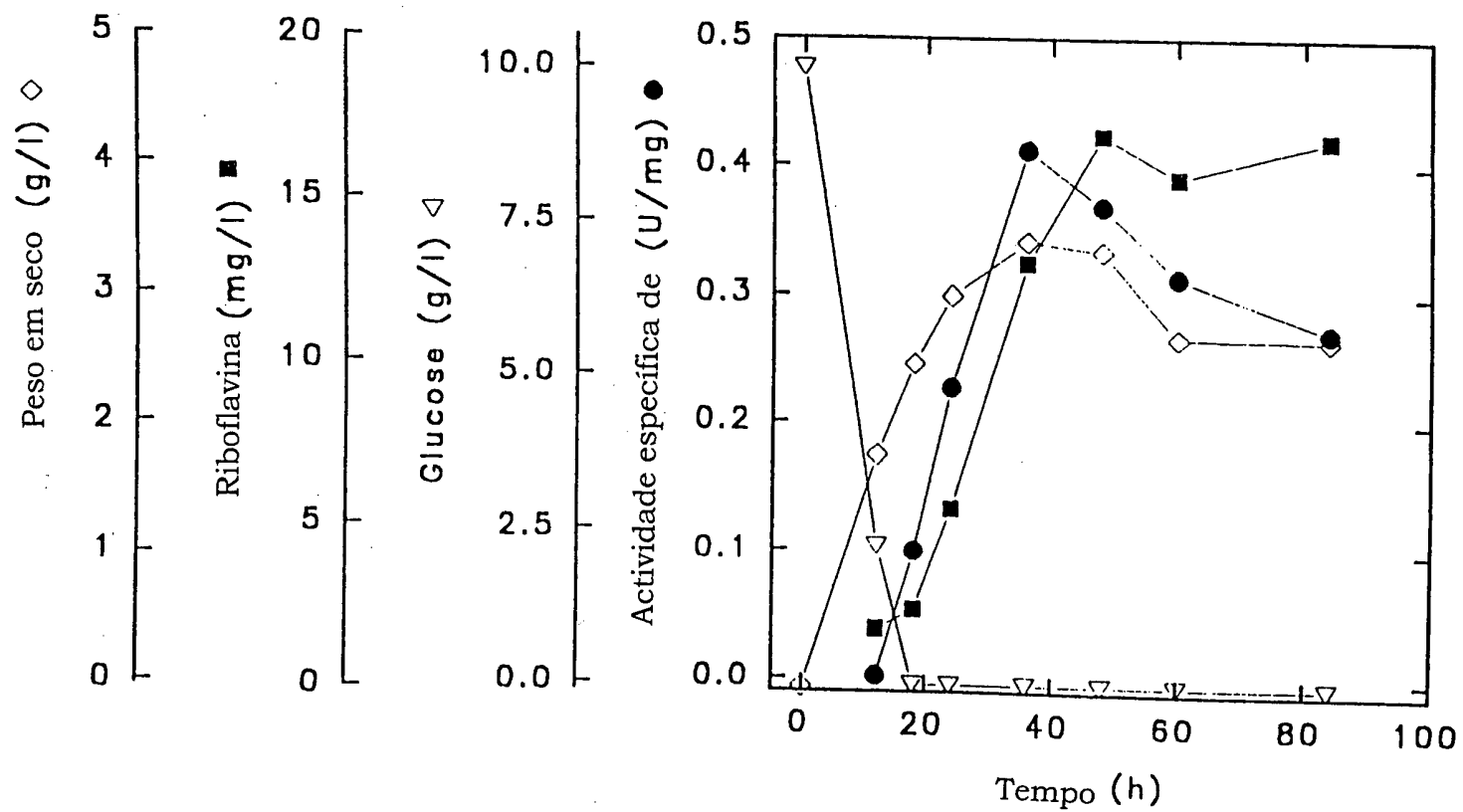


Figur 1



Simbolos a negro = topo selvagem
Simbolos a branco = mutante

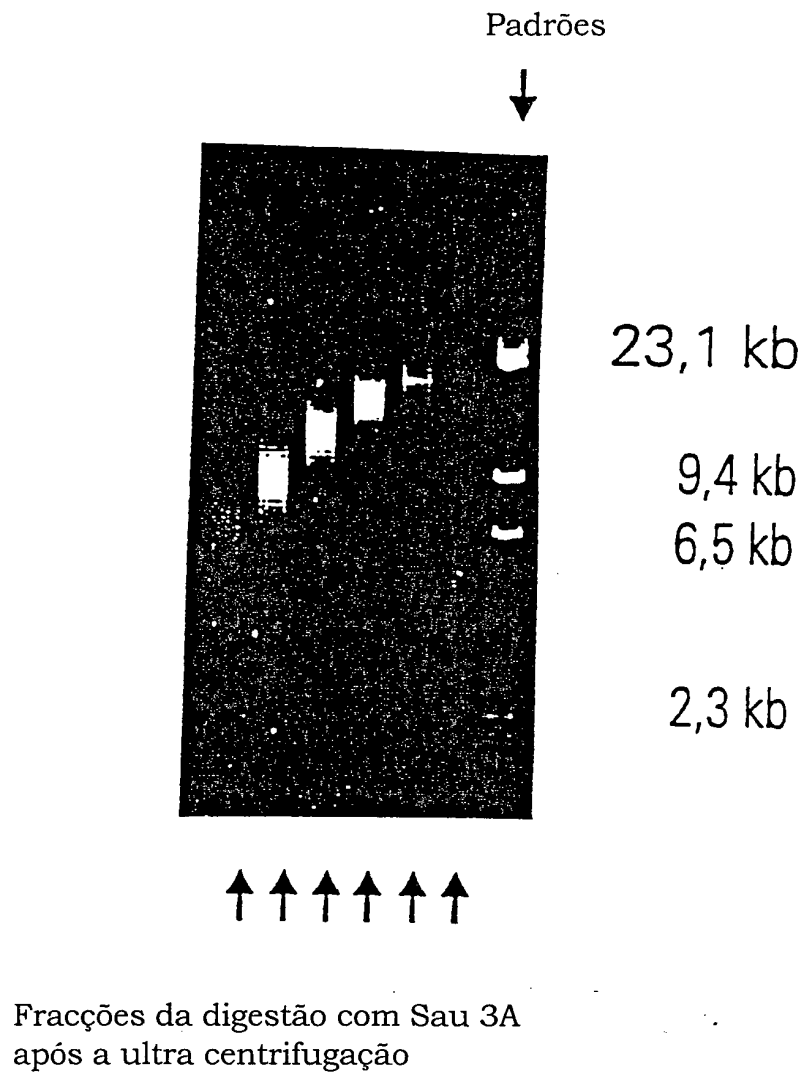
Figur 2



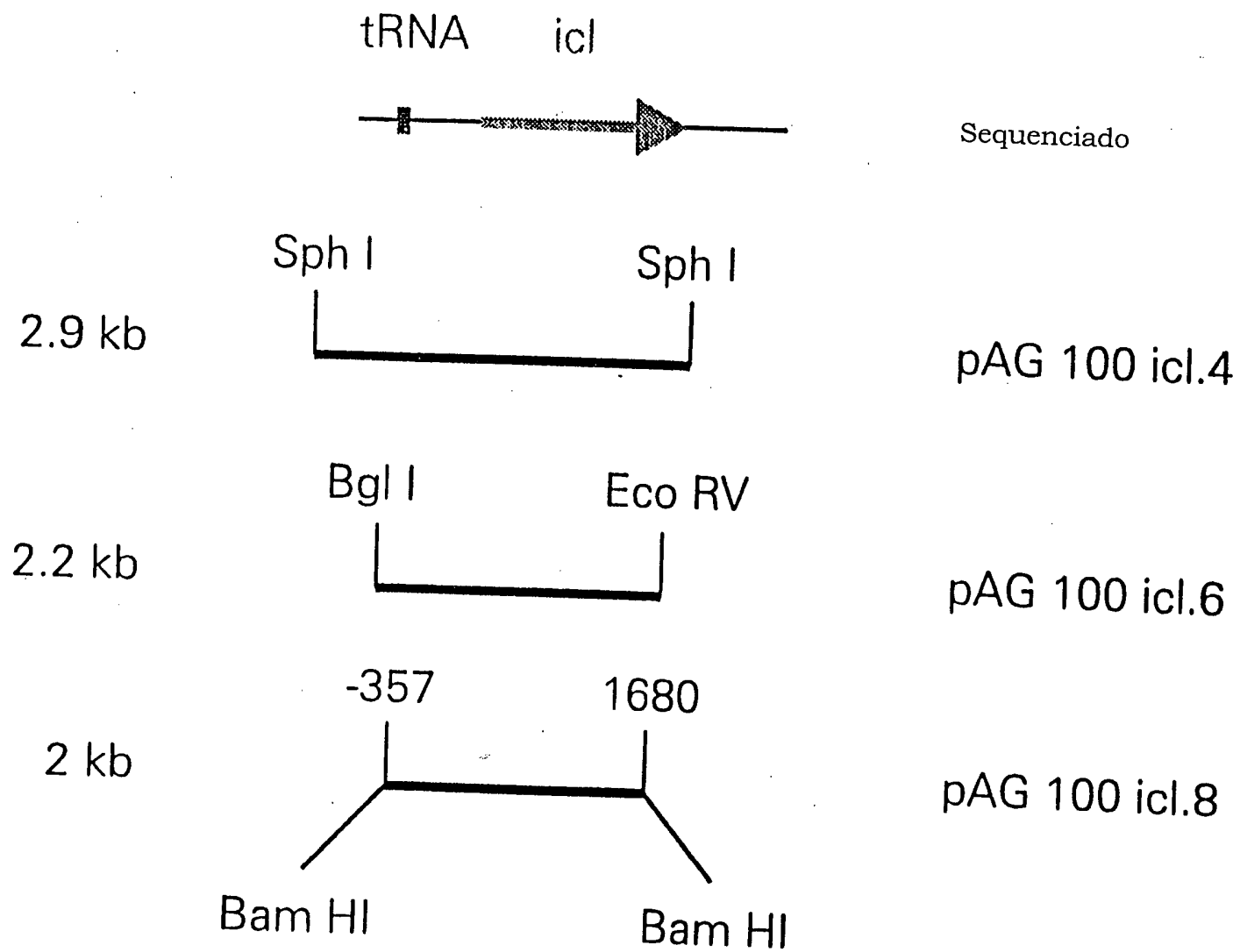
Figur 3

Handwritten signature or mark.

Handwritten signature

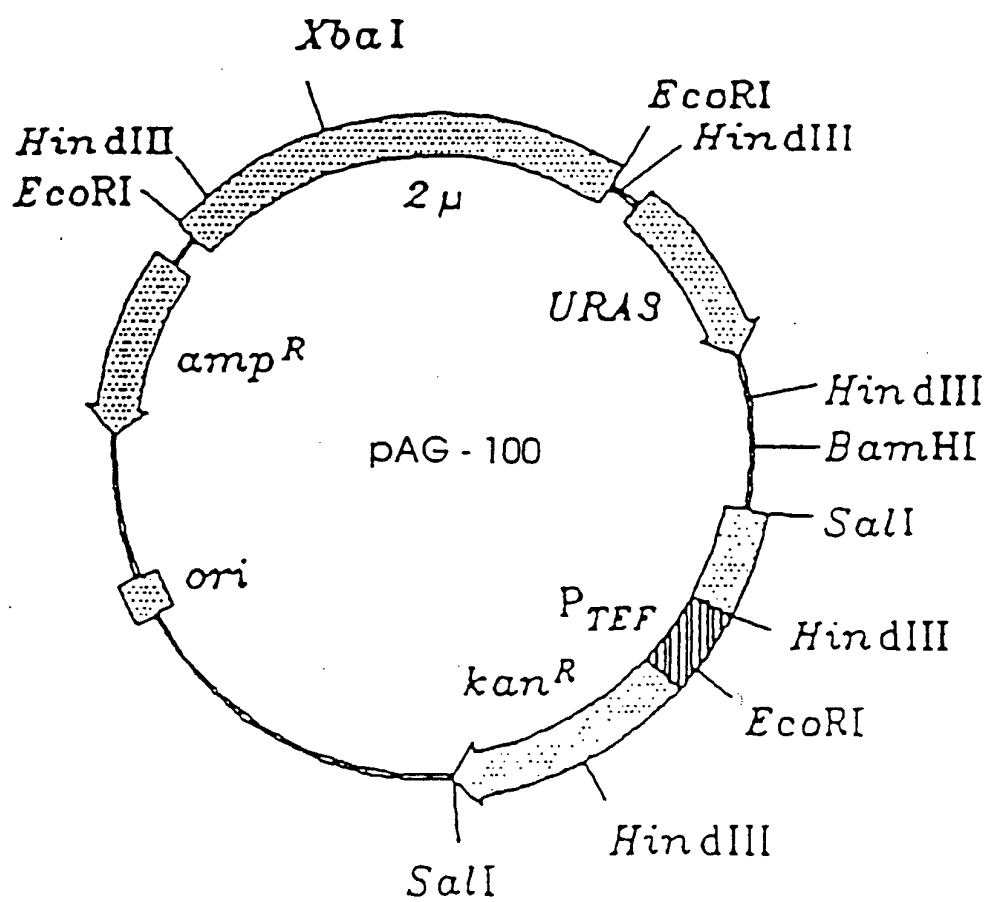


Figur 4

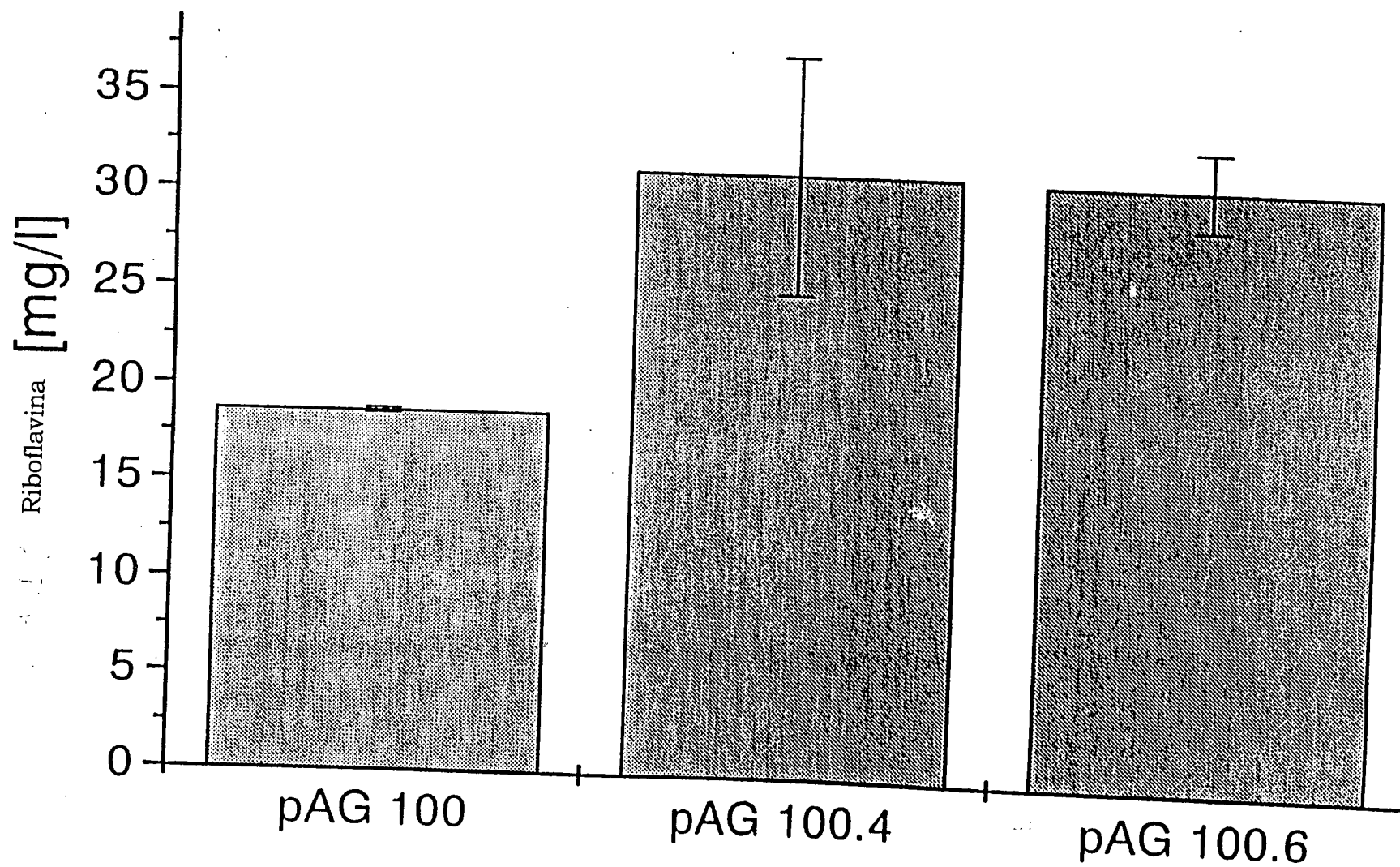


Figur 5

[Handwritten signature]

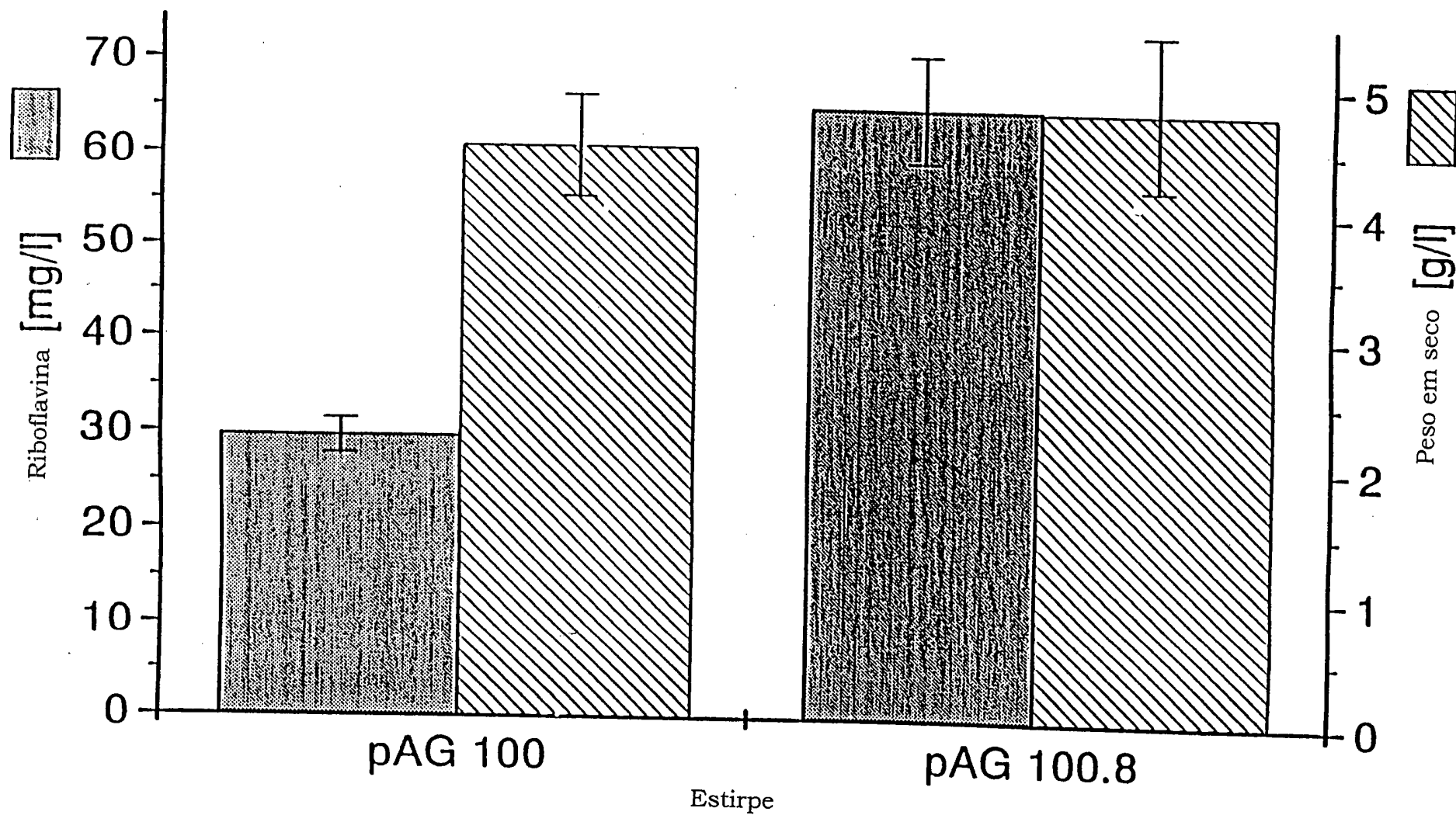


Figur 6



Estirpe

Figur 7



Figur 8