República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0516610-1 B1

(22) Data do Depósito: 17/10/2005

(45) Data de Concessão: 22/12/2020

(54) Título: PLASMÍDEO OU SISTEMA DE VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE ALIMENTO OU DE RAÇÃO ANIMAL, USO DE UM POLIPEPTÍDEO E COMPOSIÇÃO DE ALIMENTO OU DE RAÇÃO ANIMAL

(51) Int.Cl.: C12N 9/14; C12N 15/55; C12N 15/63; C12N 1/20; A23K 20/184.

(30) Prioridade Unionista: 18/10/2004 GB GB 0423139.5.

(73) Titular(es): DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS.

(72) Inventor(es): ANDREI MIASNIKOV; VIJAY KUMAR; KLAUS PELLENGAHR; ANDRE KOLTERMANN; OLIVER KENSCH; BIRGITTA LEUTHNER; ULRICH KETTLING.

(86) Pedido PCT: PCT IB2005003376 de 17/10/2005

(87) Publicação PCT: WO 2006/043178 de 27/04/2006

(85) Data do Início da Fase Nacional: 17/04/2007

(57) Resumo: ENZIMAS. A presente invenção se refere a enzimas e processos. Particularmente, é descrita uma célula hospedeira transformada ou transfectada com um ácido nucléico que codifica uma enzima fitase bacteriana e suas variantes.

"PLASMÍDEO OU SISTEMA DE VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE ALIMENTO OU DE RAÇÃO ANIMAL, USO DE UM POLIPEPTÍDEO E COMPOSIÇÃO DE ALIMENTO OU DE RAÇÃO ANIMAL"

A presente invenção se refere à fitases, seqüências de nucleotídeos para as mesmas, métodos de separação de fitases e seu uso.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere ao campo das enzimas para aditivos em gêneros alimentícios. Mais especificamente, a presente invenção se refere à fitases as quais podem ser usadas para aumentar a digestão de fosfato em alimentos e rações animais.

BACKGROUND TÉCNICO E TÉCNICA ANTERIOR

Fitato é a principal forma de estocagem de fósforo em cereais e legumes. Entretanto, animais monogástricos tais como porcos, aves e peixes não são capazes de metabolizar ou absorver fitato (ou ácido fítico) e, conseqüentemente, ele é excretado, levando à poluição com fósforos em áreas de produção intensa de rebanhos. Além disso, ácido fítico também age como um agente antinutricional em animais monogástricos pela quelação de agentes metálicos, tais como cálcio, cobre e zinco.

Para fornecer fosfato suficiente para o crescimento e a saúde desses animais, fosfato inorgânico é adicionado às suas dietas. Tal adição pode ser cara e ainda aumentar os

problemas de poluição.

Através da ação da fitase, fitato é geralmente hidrolisado para produzir inositol-fosfatos inferiores e fosfato inorgânico. Fitases são úteis como aditivos a rações animais onde elas melhoram a disponibilidade de fósforo orgânico para o animal e diminuem a poluição por fosfato do ambiente (Wodzinski RJ, Ullah AH. Adv Appl Microbiol. 42, 263-302 (1996)).

Uma variedade de fitases de origem fúngica (Wyss M. *Et al.* Appl. Environ. Microbiol. 65 (2), 367-373 (1999); Berka R. M. *Et al*. Appl. Environ. Microbiol. 64 (11), 4423-4427 (1998); Lassen S. *Et al*. Appl Environ. Microbiol, (10), 4701-4707 (2001)) e bacteriana (Greiner R. et *al* Arch. Biochem. Biophys. 303 (1), 107-113 (1993); Kerovuo *et al* Appl. Environ. Microbiol. 64 (6), 2079-2085 (1998); Kim H. W. *Et al.* Biotechnol. Lett. 25, 1231-1234 (2003); Greiner R. *Et al.* Arch. Biochem. Biophys. 341 (2), 201-206 (1997); Yoon S. J. *Et al*. Enzyme and microbial technol. 18, 449-454 (1996). Zinin N. V. Et al FEMS Microbiol. Lett. 236, 283-290 (2004))) foram descritas na literatura.

Entretanto, até agora, nenhuma dessas fitases apresentam as propriedades necessárias para o uso eficaz como um suplemento de ração animal. Particularmente, fitases fúngicas tendem a ser proteoliticamente instáveis

(Igbasan F. A. *Et al*. Arch. Anim. Nutr. 53, 353-373 (2000)) e, conseqüentemente, suscetíveis à degradação, enquanto que a maioria das fitases bacterianas tem uma especificidade de substrato mais estreita para o fitato sozinho e degradam fracamente os inositol fosfatos de graus de fosforilação intermediário (Greiner R. *Et al*., Arch. Biochem. Biophys. 303 (1), 107-113 (1993); Kerovuo J *et al*. Biochem J. 352, 623-628 (2000)).

Concordantemente, existe uma necessidade por fitases melhoradas.

RESUMO DA INVENÇÃO

Em um amplo aspecto, a presente invenção se refere à fitases derivadas de uma bactéria e de suas formas modificadas. Particularmente, a invenção se refere à fitases derivadas da bactéria *Buttiauxella sp.* e suas formas variantes/modificadas selecionadas e/ou projetadas para ter características melhoradas em comparação com a enzima do tipo selvagem (de origem).

A presente invenção é vantajosa para novas fitases que têm propriedades que as tornam particularmente úteis e eficientes como enzimas de rações. Particularmente, a invenção se refere aos novos polipeptídeos de fitase isolados e/ou purificados conforme aqui descrito, ou um fragmento funcional, ou suas formas variantes ou

modificadas, ou sua forma modificada. A invenção também fornece a seqüência de ácido nucléico que codifica a referida fitase.

Para ser eficiente como um aditivo enzimático para animais ou para rações animais, a fitase tem que combinar uma variedade de diferentes propriedades. Para ser capaz de degradar ácido fítico no ambiente ácido do estômago animal ela tem que ser ativa em pH baixo, preferivelmente em uma ampla faixa de valores de pH. Além disso, ela tem que ter uma alta atividade específica e, preferivelmente, uma elevada termoestabilidade para deixar a proteína resistir às altas temperaturas comumente usadas no preparo de gêneros alimentícios, tais como péletes de rações.

Também é importante que a enzima tenha uma ampla especificidade de substrato, permitindo que ela hidrolise não somente fitato, mas também produtos intermediários da degradação do fitato, tais como inositol pentafosfatos, tetrafosfatos e trifosfatos. Estudos de degradação de fitato em porcos mostram que esses oligofosfatos de inositol, de outra maneira, permanecem altamente insolúveis no intestino delgado e grosso e, dessa forma, inacessível às fosfatases alcalinas produzidas pelo animal e pela microflora intestinal (Schlemmer U. *Et al*. Arch. Anim. Nutr. 55, 255-280 (2001)). Variações nos perfis de

especificidade de substrato de diferentes enzimas foram identificadas. Por exemplo, inositol trifosfatos gerados pela fitase do *B. subtilils* são essencialmente resistentes à hidrólise adicional por essa enzima [Kerovuo J. *Et al*. Biochem J. 352, 623-628 (2000)].

Em outro aspecto da invenção é fornecido um plasmídeo ou um sistema de vetor, ou um organismo transformado ou transgênico compreendendo uma nova fitase conforme aqui descrita ou uma forma modificada sua.

Em outro aspecto a presente invenção se refere aos organismos transgênicos modificados para expressar uma nova fitase conforme aqui descrita ou uma forma modificada sua, e conseqüentemente sendo capaz de produzir uma fitase. A presente invenção fornece ainda meios e métodos para a produção biotecnológica de fitases e seu uso como suplementos de rações.

Aspectos da presente invenção são apresentados nas reivindicações e no comentário a seguir.

Por facilidade de referência, esses e outros aspectos da presente invenção são agora discutidos sob títulos de seções apropriados. Entretanto, os ensinamentos sob cada seção não estão necessariamente limitados a cada seção particular.

Conforme usado com referência a presente invenção, os

termos "produz", "produzindo", "produzido", "produzível", "produção" são sinônimos com os respectivos termos "preparar", "preparando", "preparado", "preparação", "gerado", "geração" e "preparável".

Conforme usado com referência a presente invenção, os termos "expressão", "expressa", "expresso" e "expressável" são sinônimos com os respectivos termos "transcrição", "transcreve", "transcrito" e "transcrevível".

Conforme usado com referência a presente invenção, os termos "transformação" e "transfecção" se referem a um método para introduzir seqüências de ácidos nucléicos em hospedeiros, células hospedeiras, tecidos ou órgãos.

Outros aspectos envolvendo as seqüências de nucleotídeos as quais podem ser usadas na presente invenção incluem: um constructo compreendendo as seqüências da presente invenção; um vetor compreendendo as seqüências para uso na presente invenção; um plasmídeo compreendendo as seqüências para uso na presente invenção; uma célula transformada compreendendo as seqüências para uso na presente invenção; um tecido transformado compreendendo as seqüências para uso na presente invenção; um órgão transformado compreendendo as seqüências para uso na presente invenção; um hospedeiro transformado compreendendo as seqüências para uso na presente invenção; um organismo

transformado compreendendo as seqüências para uso na presente invenção. A presente invenção também engloba métodos de expressar a seqüência de nucleotídeos para uso na presente invenção usando a mesma, tais como métodos para transferir a mesma. A presente invenção engloba ainda métodos para isolar a seqüência de nucleotídeos, tais como o isolamento de uma célula hospedeira.

Outros aspectos envolvendo as seqüências de aminoácidos para uso na invenção incluem: um constructo que codifica as seqüências de aminoácidos para uso na presente invenção; um vetor que codifica as seqüências de aminoácidos para uso na presente invenção; um plasmídeo que codifica as seqüências de aminoácidos para uso na presente invenção; uma célula transformada que expressa as seqüências de aminoácidos para uso na presente invenção; um tecido transformado que expressa as seqüências de aminoácidos para uso na presente invenção; um órgão transformado que expressa as seqüências de aminoácidos para uso na presente invenção; um hospedeiro transformado que expressa as seqüências de aminoácidos para uso na presente invenção; um organismo transformado que expressa as seqüências de aminoácidos para uso na presente invenção. A presente invenção também engloba métodos de purificação de seqüências de aminoácidos para uso na presente invenção

usando os mesmos, tais como a expressão em uma célula hospedeira; incluindo métodos de transferência das mesmas, e a seguir a purificação da referida seqüência.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 mostra a análise de SDS PAGE da fitase recombinante de *Buttiauxella P1-29* por cromatografia DEAE-Sefarose. A figura apresenta o traço de varredura de uma imagem fotográfica digital da raia contendo uma amostra de fitase de *Buttiauxella*.

Figura 2 mostra o perfil de pH da fitase da *Buttiauxella P1-29*.

Figura 3 mostra a especificidade de substrato da fitase recombinante purificada a partir da *Buttiauxella P1-29* com frações de inositol fosfato de diferentes graus de fosforilação e modelos de substratos. Abreviações: IP6 - ácido fítico; IP5, IP4 e IP3 - misturas de inositol penta-, tetra- e trifosfatos isoméricos, respectivamente. Fru P2 - frutose 1,6-difosfato, Fru P1 - frutose 6-fosfato.

SEQ ID NO: 1 lista a seqüência obtida para a identificação da cepa bacteriana.

SEQ ID NO: 2 lista a seqüência de polinucleotídeos que compreendem o gene da fitase da *Buttiauxella P1-29*.

SEQ ID NO: 3 lista a seqüência de aminoácidos do gene da fitase de *Buttiauxella P1-29*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção exibe uma enzima compreendendo a seqüência de aminoácidos correspondendo a fitase de *Buttiauxella sp.* ou uma forma modificada, um homólogo, uma variante, um equivalente funcional ou um fragmento eficaz seu.

O termo "fitase" significa uma proteína ou polipeptídeo o qual é capaz de catalisar a hidrólise de ésteres de ácido fosfórico, incluindo fitato e liberando fosfato inorgânico. Algumas fitases, além do fitato, são capazes de hidrolisar pelo menos alguns dos inositol-fosfatos de graus intermediários de fosforilação.

O termo "correspondendo à fitase de *Buttiauxella sp.*" significa que a enzima não precisa ter sido obtida de uma fonte de *Buttiauxella sp.* Ao invés disso, a enzima preferivelmente tem que ter as mesmas características funcionais ou seqüência que a da fitase da *Buttiauxella sp.* Por exemplo, a fitase da *Buttiauxella sp.* pode ser uma variante derivada de uma *Buttiauxella sp.*, mas a qual não está naturalmente presente nas espécies de *Buttiauxella.*

A *Buttiauxella spp.* inclui *Buttiauxella agrestis, Buttiauxella brennerae, Buttiauxella ferragutiae, Buttiauxella gaviniae, Buttiauxella izardii, Buttiauxella noackiae, Buttiauxella warmboldiae.* Cepas das espécies de

Buttiauxella estão disponíveis a partir de DSMZ, o German National Resource Centre for Biological Material. Fitases são preferivelmente identificadas a partir de *Buttiauxella spp* pelos métodos descritos aqui, por exemplo, hibridização da SEQ ID NO:2. Cepas de *Buttiauxella spp* preferidas para isolar polipeptídeos e ou polinucleotídeos da invenção estão listadas nos exemplos.

Os termos "fitase de tipo selvagem" ou "tipo selvagem", de acordo com a invenção, descrevem uma enzima fitase com uma seqüência de aminoácidos encontrada na natureza.

Os termos "variante da enzima fitase" ou "variante", de acordo com a invenção, descrevem uma enzima fitase com uma seqüência de aminoácidos derivada da seqüência de aminoácidos de uma fitase de origem, mas diferindo por uma ou mais substituições, inserções e/ou anulações de aminoácidos, as quais juntas são referidas como "mutações". É prognosticado que uma variante da enzima fitase pode também ser uma enzima fitase de origem para outros ciclos de métodos de preparo de variantes de fitase, tais como evolução molecular.

O termo "peptídeo(s) homólogo(s)", de acordo com a presente invenção, descrito também como "homólogos" aqui, descreve polipeptídeos, preferivelmente enzimas fitases

(isto é, "fitases homólogas" ou "enzimas homólogas") com uma identidade de seqüência de mais de 75% em comparação com uma primeira seqüência de aminoácidos de polipeptídeos/fitases/enzimas, preferivelmente tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de homologia de seqüência.

O termo "seu equivalente funcional" significa que a enzima tem que ter aproximadamente as mesmas características funcionais que aquela da fitase da *Buttiauxella sp.* O termo "forma modificada" ou "variante" significa que a enzima foi modificada da sua forma original, mas retém as mesmas características funcionais enzimáticas que aquela da fitase da *Buttiauxella sp.* Particularmente, os termos "variante" ou "forma modificada" englobam enzimas fitases com uma seqüência de aminoácidos derivada da seqüência de aminoácidos da fitase de origem/do tipo selvagem e com uma ou mais substituições, inserções e/ou anulações de aminoácidos, as quais juntas são referidas como mutações. Formas modificadas ou variantes podem apresentar características enzimáticas alteradas em comparação com a enzima de origem. Preferivelmente, formas modificadas ou variantes têm um ou mais dos seguintes fenótipos melhorados: termoestabilidade melhorada e/ou; uma estabilidade proteolítica melhorada (por exemplo, pepsina)

e/ou; uma atividade específica melhorada e/ou; uma especificidade por substrato mais ampla e/ou; uma atividade sobre uma faixa de pH mais ampla. Os termos fragmentos "funcionais" ou "efetivos" significam um fragmento ou porção da fitase da *Buttiauxella sp.* que retém aproximadamente a mesma função ou efeito enzimático.

Preferivelmente a enzima fitase desse aspecto da presente invenção tem a mesma seqüência ou uma seqüência que é pelo menos 75% idêntica (homóloga) daquela da fitase da *Buttiauxella sp.*

Adequadamente, a enzima compreende a seqüência de aminoácidos conforme mostrada na SEQ ID NO: 3 ou uma seqüência com pelo menos 75% de identidade (homologia) a ela ou um fragmento funcional seu. Em uma modalidade preferida, a invenção fornece um polipeptídeo isolado e/ou purificado com a seqüência de aminoácidos conforme estabelecida na SEQ ID NO: 3 ou uma seqüência com pelo menos 75% de identidade (homologia) a ela ou um fragmento efetivo seu. Ao se referir à SEQ ID NO: 3 e aos polipeptídeos compreendendo a SEQ ID NO: 3, é prognosticado que isso também se refere aos polipeptídeos que são co- ou pós-traducionalmente processados durante a expressão, por exemplo, pela clivagem do peptídeo sinal. A clivagem pós-traducional também pode ocorrer no C-terminal. Portanto, em

uma modalidade preferida, o seu fragmento efetivo (também referido como um fragmento funcional seu) é o polipeptídeo maduro produzido pelo hospedeiro natural ou um hospedeiro de expressão apropriado adequado.

Em outra modalidade, a fitase é caracterizada pelo fato de ser derivada da cepa *P1-29* de *Buttiauxella sp*. Depositada sob o número de acesso NCIMB 41248.

Em uma modalidade preferida, a invenção se refere a uma fitase de acordo com qualquer modalidade do primeiro aspecto da invenção que compreende uma ou mais mutações nas seguintes posições (numeração de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 3): 59, 70, 122, 125, 167, 193, 197, 204, 209, 211, 221, 223, 225, 240, 242, 244, 268, 281, 289, 294, 303, 336, 351.

Essas posições são caracterizadas pelo fato de que a mutagênese da enzima nessas posições levam a uma melhora nas características enzimáticas desejadas.

As seguintes substituições podem ser variantes preferidas:

K59 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y

T70 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, ou Y

A122 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y

D125 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y

T167 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W ou Y

H193 A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y

F197 A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q R, S, T, V, W ou Y

T204 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W ou Y

T209A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W ou Y

A211 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y

G221 A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y

I223 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y

S225 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W ou Y

K240 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y

A242 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y

D244 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y

A268 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y

L281 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y

Q289 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W ou Y

A294 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y

N303 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W ou Y

I336 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W,ou Y

N351 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W ou Y.

Por "mutações conservativas" se entende mutações nos resíduos de aminoácidos que são conservativas em termos as características de aminoácidos em comparação com o resíduo de aminoácido indicado. Características de aminoácidos incluem o tamanho do resíduo, a hidrofobicidade, polaridade, carga, valor de pK e outras características de aminoácidos conhecidas na técnica. Mutações conservativas preferidas são listadas abaixo como substituições

conservativas.

Em uma modalidade particularmente preferida, as mutações estão em uma ou mais das seguintes posições: K59; T167; K240; T167; K240; D244; Q289; T209 e F197.

Mutações preferidas nessas posições específicas estão listadas acima, as mutações mais preferidas incluem: K59E; T167V; K240T; T167I; K240E; D244C; Q289Y; T209K e F197S.

Em uma outra modalidade preferida é fornecida uma fitase compreendendo uma combinação de mutações selecionadas do grupo consistindo de:

D125E/H193R

A294E/N303K

T167I/K240T

D223E/K240E/N351D

T167I/K240T/A294E/N303K

T167I/K240E/A242S/A294E/N303K

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K

A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K

D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K

A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/

Q289H/A294E/N303K/I336F

N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K

Concordantemente, uma fitase preferida de acordo com a presente invenção é uma variante compreendendo a seqüência de aminoácidos listada como a SEQ ID NO: 3 ou um fragmento efetivo seu (ou homólogo seu, preferivelmente a fitase é caracterizada pelo fato de ser derivada da cepa *P1-29* de *Buttiauxella sp.* depositada sob o número de acesso NCIMB 41248, ou um homólogo seu), exceto pelo fato de que uma ou mais das mutações de aminoácidos listadas acima ou uma das combinações de mutações listadas acima.

Nessas modalidades, a nomenclatura indica uma fitase compreendendo a seqüência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 3. Com as mutações indicadas por referência nas posições dos aminoácidos na SEQ ID NO: 3. A nomenclatura está descrita em maiores detalhes abaixo.

Adequadamente essas variantes apresentam características melhoradas em relação a um dos seguintes: estabilidade de temperatura, faixa de pH, estabilidade da pepsina, atividade específica, especificidade de substrato e especificidade de substrato mais ampla. Métodos adequados para determinar essas características são aqui revelados.

Particularmente, as melhorias nas características da

fitase são direcionadas para a estabilidade enzimática sob condições de processamento de alimentos e de rações, para a estabilidade da enzima durante o trânsito estomacal e para a atividade e estabilidade enzimática no trato estomacal e/ou intestinal humano ou animal, tornando as variáveis melhoradas particularmente adequadas para uso como suplementos de rações. Assim, tais melhorias compreendem, dentre outros parâmetros, ao aumento na estabilidade em temperaturas elevadas, preferivelmente em temperaturas acima de 65°C, ao aumento na estabilidade contra a digestão proteolítica, preferivelmente a protease do trato digestivo, tal como a pepsina, ao aumento na atividade catalítica em pH baixo, preferivelmente atividade catalítica abaixo de pH 5,5, e a eficiência geral na liberação de grupos fosfato a partir do fitato, e preferivelmente na adição de inositol fosfatos.

Nomenclatura

Na presente descrição e nas reivindicações, os códigos convencionais de uma letra e de três letras para os resíduos de aminoácidos são usados. Por facilidade de referência, mutações nas variantes enzimáticas são descritas pelo uso da seguinte nomenclatura: resíduo de aminoácido na enzima de origem; posição; resíduo(s) de aminoácido(s) substituído(s). De acordo com essa

nomenclatura, a substituição de, por exemplo, um resíduo de alanina por um resíduo de glicina na posição 20, é indicada como Ala20Gly ou A20G. A anulação da alanina na mesma posição é mostrada como Ala20* ou A20*. A inserção de um resíduo de aminoácido adicional (por exemplo, uma glicina) é indicada como Ala20AlaGly ou A20AG. A anulação de um filamento consecutivo de resíduos de aminoácidos (por exemplo, entre a alanina na posição 20 e a glicina na posição 21) é indicada como Δ(Ala20-Gly21) ou Δ(A20-G21). Quando uma seqüência enzimática de origem contém uma anulação em comparação com a seqüência enzimática usada para numerar uma inserção em tal posição (por exemplo, uma alanina na posição anulada 20) é indicada como *20Ala ou *20A. Mutações múltiplas são separadas por um sinal de mais ou uma barra. Por exemplo, duas mutações nas posições 20 e 21 substituindo alanina e ácido glutâmico para glicina e serina, respectivamente, são indicadas como A20G+E21S ou A20G/E21S. Quando um resíduo de aminoácido em uma dada posição é substituído com dois ou mais resíduos de aminoácidos alternativos, esses resíduos são separados por uma vírgula ou uma barra. Por exemplo, a substituição da alanina na posição 30 ou com glicina ou ácido glutâmico é indicada como A20G,E ou A20G/E, ou A20G, A20E. Quando uma posição adequada para modificação é identificada aqui sem

qualquer modificação específica sendo sugerida, é para ser entendido que um resíduo de aminoácido pode ser substituído para o resíduo de aminoácido presente na posição. Assim, por exemplo, quando uma modificação de uma alanina na posição 20 é mencionada, porém não especificada, é para ser entendido que a alanina pode ser anulada ou substituída para qualquer outro resíduo de aminoácido (isto é, qualquer um dentre R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V).

Adequadamente a fitase ou equivalente funcional da presente invenção é caracterizada em que a referida fitase tem uma atividade específica de pelo menos 100 U/mg ou 200 U/mg, preferivelmente pelo menos 300 U/mg, em que a referida atividade específica é determinada pela incubação da referida fitase em uma solução contendo fitato 2 mM, $CaCl_2$ 0,8 mM em tampão acetato de sódio 200 mM em pH 3,5, conforme detalhado no Exemplo 1. A fitase da presente invenção ou seu equivalente funcional pode também ser adequadamente caracterizada pelo fato de que a referida fitase tem uma atividade máxima por volta de pH 4 - 4,5, em que a referida atividade é determinada pela incubação da referida fitase em uma solução contendo fitato 2 mM, $CaCl_2$ 0,8 mM em tampão acetato de sódio 200 mM. A fitase da presente invenção pode também ser adequadamente

caracterizada pelo fato de que a referida fitase tem 40% ou mais de uma atividade máxima observada em pH 2,5 e 5,5, em que tampão de cloridrato de glicina é usado para determinar a atividade em pH 2,5.

Adequadamente, em uma modalidade, a fitase ou seu equivalente funcional da presente invenção é caracterizado pelo fato de que a referida fitase tem uma atividade específica de 330 U/mg ou maior, em que a referida atividade específica é determinada pela incubação da referida fitase em uma solução contendo fitato 2 mM, $CaCl_2$ 0,8 mM em tampão acetato de sódio 200 mM em pH 3,5. Em outra modalidade, a fitase da presente invenção ou seu equivalente funcional pode também ser adequadamente caracterizado pelo fato de que a referida fitase tem dois máximos de atividade, por volta de pH 3 e pH 4 - 4,5, em que a referida atividade é determinada pela incubação da referida fitase numa solução contendo fitato 2 mM, $CaCl_2$ 0,8 mM em tampão acetato de sódio 200 mM.

Em outro aspecto, a invenção fornece uma molécula de ácido nucléico ou seqüência de nucleotídeos isolada e/ou purificada que codifica uma enzima compreendendo a seqüência de aminoácidos correspondendo a fitase de *Buttiauxella sp.*, ou um homólogo seu. Adequadamente a referida molécula de ácido nucléico isolada e/ou purificada

codifica um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos conforme mostrada na SEQ ID NO: 3 ou uma seqüência com, pelo menos, 75% de identidade (homologia) a ela ou um fragmento eficaz seu. Em uma modalidade, a molécula de ácido nucléico codifica um polipeptídeo compreendendo a SEQ ID NO: 3 e incluindo mutações nas posições preferidas aqui listadas ou qualquer uma das mutações específicas ou combinações de mutações aqui listadas. Em outra modalidade, a invenção fornece uma molécula de ácido nucléico isolada e/ou purificada compreendendo uma seqüência de nucleotídeos que é a mesma que, ou é complementar a, ou contém quaisquer substituições de códon para qualquer uma daquelas da SEQ ID NO: 2 ou compreende uma seqüência a qual tem, pelo menos, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de homologia de seqüência com a SEQ ID NO: 2.

Ainda em um outro aspecto, a invenção se refere a uma seqüência de nucleotídeos e ao uso de uma seqüência de nucleotídeos mostrada como:

(a) a seqüência de nucleotídeos apresentada como SEQ ID NO. 2,

(b) a seqüência de nucleotídeos que é uma variante, homóloga, derivada ou fragmento da seqüência de nucleotídeos apresentada como SEQ ID NO: 2;

(c) uma seqüência de nucleotídeos que é o complemento da seqüência de nucleotídeos estabelecida na SEQ ID NO: 2;

(d) uma seqüência de nucleotídeos que é o complemento de uma variante, homóloga, derivada ou fragmento da seqüência de nucleotídeos apresentada como SEQ ID NO: 2;

(e) uma seqüência de nucleotídeos que é capaz de hibridizar na seqüência de nucleotídeos estabelecida na SEQ ID NO: 2;

(f) uma seqüência de nucleotídeos que é capaz de hibridizar em uma variante, homólogo, derivado ou fragmento da seqüência de nucleotídeos apresentada como SEQ ID NO: 2;

(g) uma seqüência de nucleotídeos que é o complemento de uma seqüência de nucleotídeos que é o complemento de uma seqüência de nucleotídeos que é capaz de hibridizar na seqüência de nucleotídeos estabelecida na SEQ ID NO: 2;

(h) uma seqüência de nucleotídeos que é o complemento de uma seqüência de nucleotídeos que é capaz de hibridizar para uma variante, homólogo, derivado ou fragmento da seqüência de nucleotídeos apresentada como SEQ ID NO: 2;

(i) uma seqüência de nucleotídeos que de capaz de hibridizar para o complemento da seqüência de nucleotídeos estabelecida na SEQ ID NO: 2;

(j) uma seqüência de nucleotídeos que é capaz de hibridizar para um complemento de um variante, homólogo,

derivado ou fragmento da seqüência de nucleotídeos apresentada como SEQ ID NO: 2.

Um nucleotídeo é considerado para hibridizar para um dos nucleotídeos acima (e), (f), (g), (h), (i) ou (j), se ele for capaz de hibridizar sob condições de estringência média, mais preferivelmente alta estringência, ainda mais preferivelmente sob condições de estringência muito altas.

Para preparar uma mancha de hibridização, protocolos de biologia molecular padrões para manchamento podem ser usados (por exemplo, Southern blotting para hibridizações de DNA. A quantidade de DNA alvo depende da abundância relativa da seqüência alvo. Se uma seqüência alvo pura for usada, entre 1 e 5 picogramas de DNA por quilobase de polinucleotídeos são preferidos. Tipicamente, o limite de detecção é de cerca de 0,5 pg de DNA para uma sonda radioativa com atividade específica de 10^9 dpm/mg, a qual é equivalente a um gene de cópia única de 500 bp de comprimento em 3,3 mg de DNA genômico de um genoma complexo (por exemplo, humano). Na prática, uma pessoa usará aproximadamente 10 mg de DNA genômico – por exemplo, para procurar por organismos, tais como microrganismos, os quais contêm uma fitase que codifica o polinucleotídeo da invenção. Se o DNA alvo for bacteriano ou, por exemplo, um plasmídeo, uma pessoa terá que diluir o DNA de acordo para

evitar a superexposição. O DNA alvo é manchado, por exemplo, por manchamento com pingos, ou através do manchamento a partir de gel de eletroforese. As condições preferidas estão descritas em "Membrane Transfer and Detection Methods, Amersham International plc, RU – PI/162/85/1). Membrana de náilon positivamente carregada Hybond N+ é preferivelmente usada (Amersham Life Science). A sonda e preferivelmente preparada de acordo com o kit de etiquetagem da Pharmacia Ready to Go DNA™ para preparar uma sonda de > 1 x 10^9 dpm/micrograma. A sonda é usada no tampão de hibridização a uma concentração de 1 x 10^6 dpm por mililitro de tampão de hibridização. As manchas são preferivelmente pré-hibridizadas no tampão de hibridização (6 x SSC, 5 x solução de denhardt's e SDS 0,5%, e DNA de esperma de salmão desnaturado para tampão 100 mg/mL) por uma hora a 65°C, seguido pela hibridização no tampão de hibridização contendo a sonda marcada desnaturada com agitação por 12 horas a 65°C. A(s) mancha(s) são, a seguir, lavadas com um volume adequado de tampão de lavagem (tipicamente 50 mL) em 2 x SSC, SDS 0,1% por 30 minutos a 65°C, seguido por uma segunda lavagem num volume adequado de tampão de lavagem (tipicamente 50 mL) ou no mesmo tampão de lavagem (2 x SSC, SDS 0,1%) para lavagem de estringência média, ou 0,1% x SSC, SDS 0,1% por 10 min a 65°C (alta

estringência), a segunda lavagem pode ser repetida a 70°C para lavagem de alta estringência.

A seqüência de nucleotídeo da presente invenção pode compreender seqüências que codificam para a SEQ ID NO: 3 ou um fragmento efetivo seu ou uma variante, uma forma modificada, um homólogo ou derivado seu.

Particularmente, a invenção fornece um plasmídeo ou sistema de vetor compreendendo uma fitase, conforme aqui descrita, ou um homólogo ou derivado seu. Preferivelmente, o plasmídeo ou sistema de vetor compreende uma seqüência de ácidos nucléicos conforme estabelecida na SEQ ID NO: 2 ou uma seqüência que é pelo menos 75% homóloga a ela ou um fragmento efetivo seu. Adequadamente, o plasmídeo ou o sistema de vetor é um vetor de expressão para a expressão de qualquer uma das enzimas codificadas por uma seqüência de ácidos nucléicos conforme estabelecida em qualquer uma das seqüências SEQ ID NO: 2 ou uma seqüência que seja pelo menos 75% homóloga (idêntica) a esta em um microrganismo. Vetores de expressão adequados são aqui descritos. Além disso, a invenção fornece um plasmídeo ou sistema de vetor para a expressão de qualquer uma das enzimas modificadas ou variantes ou fragmentos funcionais aqui descritos. Vetores de expressão adequados são aqui descritos.

Variantes da fitase

A presente invenção é esboçada para o melhoramento das características de uma fitase de origem pela modificação de um ou mais dos resíduos de aminoácidos da seqüência de aminoácidos da fitase de origem.

Enzimas fitases usadas como enzimas de origem de acordo com a presente invenção incluem fitases do tipo selvagem de bactérias, particularmente, preferivelmente fitases obteníveis de ou derivadas de *Buttiauxella sp*. com a seqüência de aminoácidos conforme dada na SEQ ID NO: 3 ou um fragmento efetivo seu, ou uma seqüência de aminoácidos com uma identidade em relação à SEQ ID NO: 3 de mais de 75%, preferivelmente de mais de 80%, mais preferivelmente de mais de 90%, ainda mais preferivelmente de mais de 95%, 96%, 97%, 98%, preferivelmente de mais de 99% (isto é, polipeptídeo homólogo), ou um fragmento efetivo seu.

Variantes da enzima fitase melhoradas da invenção preferivelmente têm uma identidade de uma identidade para a SEQ ID NO: 3 ou um fragmento efetivo seu de mais de 75%, preferivelmente de mais de 80%, mais preferivelmente de mais de 90%, ainda mais preferivelmente de mais de 95%, 96%, 97%, 98%, preferivelmente de mais de 99%. Entretanto, é também considerado que as variantes podem ser heterólogas (isto é, não-homólogas) em relação à SEQ ID NO: 3. Por exemplo, variantes produzidas por técnicas de recombinação,

tais como recombinação exomediada, ou embaralhamento de famílias, podem resultar em variantes, embora preparadas usando a fitase de origem de acordo com a presente invenção, podem ter menos de 75% de homologia.

Alinhamentos de seqüências, assim como a determinação de identidades de seqüências podem adequadamente ser feitos através de programas de computador conhecidos na técnica, tais como o GAP fornecido no pacote de programas GCG (Needleman, S. B. e Wunsch, C. D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, p. 443-453). GAP pode ser usado com os seguintes ajustes para comparação de seqüências de polipeptídeos: penalidade de criação de GAP de 3,0 e a penalidade de extensão de GAP de 0,1. Alinhamentos de seqüências são usados, por exemplo, para determinar as posições correspondentes nos polipeptídeos homólogos.

As enzimas fitase foram caracterizadas depois da expressão heteróloga em um ou mais dos seguintes hospedeiros de expressão: *Escherichia coli K12; Bacillus subtilis; Saccharomyces cerevisiae.* Outros hospedeiros de expressão podem ser usados.

Melhorias nas características da fitase de acordo com a presente invenção são direcionadas ao uso no processamento de alimentos e de ração, assim como para o uso como um aditivo para produtos alimentícios e de ração.

Particularmente, melhorias são direcionadas para a estabilidade sob condições de processamento de alimentos e de ração, para a estabilidade durante o trânsito estomacal e para a atividade e estabilidade no estômago e/ou trato gastrintestinal humano ou de animal. Tais melhorias compreendem, dentre outros parâmetros, o aumento na estabilidade em temperaturas elevadas, preferivelmente em temperaturas acima de 65°C, o aumento na estabilidade contra a digestão proteolítica, preferivelmente a protease do trato digestivo, o aumento na atividade catalítica em pH baixo, preferivelmente a atividade catalítica em pH abaixo de 5,5, e a eficiência geral de liberar grupos fosfato do fitato.

O aumento na estabilidade em temperaturas elevadas é quantificado pela temperatura de inativação da enzima. A temperatura de inativação é definida como a temperatura na qual a atividade residual de uma enzima fitase, depois da incubação por certa duração e o subseqüente resfriamento até a temperatura ambiente é de 50% da atividade residual da mesma enzima fitase incubada para a mesma duração sob as mesmas condições em temperatura ambiente. As diferenças de termoestabilidade são as diferenças em °C entre as temperaturas de inativação das duas enzimas.

As posições e/ou regiões a serem modificadas para

obter características melhoradas foram encontradas pela análise da seqüência e da estrutura das fitases de tipo selvagem, assim como pela mutagênese das enzimas de origem, particularmente pela introdução de mutações na seqüência de aminoácidos do tipo selvagem conforme dadas na SEQ ID NO: 3, e pela varredura para variantes enzimáticas com características melhoradas. Desse modo, certas regiões, assim como posições nas enzimas de origem, foram identificadas como sendo significativas para melhorar as características das enzimas fitase.

Portanto, a invenção se refere às variantes da fitase com características melhoradas que, quando comparadas com a fitase de origem, compreendem mutações em um ou mais das seguintes posições (numeração de acordo com a numeração na SEQ ID NO: 3):

59, 70, 122, 125, 167, 193, 197, 204, 209, 211, 221, 223, 225, 240, 242, 244, 268, 281, 289, 294, 303, 336, 351.

e/ou em posições correspondentes em um homólogo da fitase para a fitase conforme mostrado na seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 3. Essas posições são caracterizadas pelo fato de que a mutagênese dessas posições levam a uma melhoria nas características enzimáticas.

K59E; T167V; K240T; T167I; K240E; D244C; Q289Y; T209K

e F197S.

ou mutações conservativas em cada posição.

combinações específicas preferidas de mutações incluem:

D125E/H193R;

A294E/N303K;

T167I/K240T;

D223E/K240E/N351D;

T167I/K240T/A294E/N303K;

T167I/K240E/A242S/A294E/N303K;

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K;

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K;

D125E/T167I/H193R/R197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K;

A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F e

N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K.

Métodos para o preparo de variantes da fitase.

Em uma ampla modalidade a invenção fornece métodos para preparar variante(s) da enzima fitase.

Em uma modalidade preferida o método para preparar a variante da enzima fitase compreende as seguintes etapas

seqüenciais:

a) A seleção de pelo menos uma enzima fitase de origem, em que pelo menos uma enzima fitase de origem é selecionada de i) um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos correspondendo à fitase da *Buttiauxella sp.*, ou uma forma modificada, um polipeptídeo homólogo, uma variante, um equivalente funcional ou um fragmento efetivo seu, conforme aqui descrito ou ii) pelo menos uma variante da enzima fitase conforme aqui descrito;

b) A geração de pelo menos uma variante da fitase pela introdução de pelo menos uma alteração da referida enzima fitase de origem a qual é uma inserção, uma anulação ou uma substituição ou combinação sua, ou um resíduo de aminoácido na referida enzima fitase de origem para obter pelo menos uma variante da enzima fitase;

c) A varredura para pelo menos uma referida variante da enzima fitase para identificar uma variante da enzima fitase melhorada, a qual em comparação com a enzima fitase de origem tem propriedade/propriedades melhoradas selecionadas de:

i. maior estabilidade térmica e/ou

ii. atividade específica e/ou

iii. estabilidade proteolítica.

d) O preparo da referida variante da enzima fitase

melhorada, preferivelmente para produzir uma variante da enzima fitase isolada e/ou purificada.

Em uma modalidade preferida, durante a etapa b) uma população das variantes da enzima fitase é gerada e na etapa c) pelo menos uma proporção da referida população de variantes da enzima fitase é testada.

Em uma modalidade preferida a etapa a) compreende a submissão de uma seqüência de nucleotídeos de acordo com as reivindicações 11 a 13 codificando uma enzima fitase de origem para a mutagênese, e a etapa b) compreende a expressão da seqüência de nucleotídeos modificada obtida na etapa (a) em uma célula hospedeira, e a etapa c) compreende a varredura por células hospedeiras, ou seu(s) extrato(s), para uma variante da enzima fitase melhorada com a(s) referida(s) propriedade/propriedades melhoradas.

Em uma outra modalidade, depois da etapa c), e opcionalmente d), compreende ainda pelo menos um ciclo subseqüente de passos repetidos de a) a c), e opcionalmente d), em que, preferivelmente, no(s) referido(s) ciclo(s) subseqüente(s), pelo menos uma enzima fitase de origem da etapa (a) é selecionada de pelo menos uma referida variante da enzima fitase e/ou uma variante da enzima fitase melhorada preparada de acordo com o método.

Em uma outra modalidade preferida, a etapa c)

compreende a varredura para células hospedeiras que expressam uma variante da enzima fitase melhorada, a qual em comparação ou com i) a referida enzima fitase de origem e/ou ii) um polipeptídeo compreendendo a SEQ ID NO: 3 ou um fragmento funcional seu, tem uma diferença de estabilidade térmica de pelo menos 2,5.

Em uma outra modalidade, a etapa c) compreende a varredura por células hospedeiras que expressam uma variante da enzima fitase melhorada a qual, em comparação ou com i) a referida enzima fitase de origem e/ou ii) um polipeptídeo compreendendo a SEQ ID NO: 3 ou um fragmento funcional seu, tem a estabilidade de pepsina de pelo menos 30.

Em uma outra modalidade, a etapa c) compreende a varredura por células hospedeiras que expressam uma variante da enzima fitase melhorada a qual, em comparação ou com i) a referida enzima fitase de origem e/ou ii) um polipeptídeo compreendendo a SEQ ID NO: 3 tem uma proporção de atividade específica em comparação com a fitase codificada pela SEQ ID NO: 3 de pelo menos 110.

A invenção também fornece um método para preparar uma variante da enzima fitase, cujo método compreende:

a) A seleção de uma enzima fitase de origem, em que a enzima fitase de origem é selecionada de:

i. uma enzima fitase de origem com pelo menos 75% de homologia em relação à SEQ ID NO: 3 do seu fragmento funcional

ii. uma enzima fitase de origem derivada de *Buttiauxella spp*;

iii. pelo menos uma variante da enzima fitase.

b) Fazer pelo menos uma alteração a qual é uma inserção, uma anulação ou uma substituição de um resíduo de aminoácido na enzima fitase de origem para obter uma variante da enzima fitase;

c) A varredura para uma variante de enzima fitase, a qual comparada com a enzima fitase de origem tem característica melhoradas, conforme aqui descritas, preferivelmente selecionadas de uma ou mais dentre:

i. maior estabilidade térmica e/ou

ii. atividade específica e/ou

iii. estabilidade proteolítica e/ou

d) A preparação da variante da enzima fitase.

Opcionalmente, pelo menos as etapas a) a c) podem ser repetidas em um ou mais ciclos (iterativos) subseqüentes. Portanto, é considerado que a enzima fitase de origem é uma variante da enzima fitase preparada por ciclos anteriores do método de a) a c) acima.

Em uma outra modalidade a invenção fornece um método

para preparar uma variante fitase, compreendendo as seguintes etapas:

(a) fornecimento uma enzima fitase de origem, selecionada de

(i) uma enzima fitase com pelo menos 75% de homologia em relação à SEQ ID NO: 3 ou um fragmento funcional seu;

(ii) uma enzima fitase derivada de *Buttiaxella spp*.,

(iii) pelo menos uma variante da enzima fitase,

(b) geração de uma população de variantes de fitase pela alteração da fitase de origem, preferivelmente a(s) referida(s) alteração(ões) é/são obtidas através da inserção, anulação ou substituição de pelo menos um resíduo de aminoácidos na fitase de origem, ou qualquer combinação sua.

(c) a varredura da população para uma variante fitase, a qual quando em comparação com a enzima fitase de origem tem características melhoradas, conforme aqui descrito, preferivelmente selecionadas de um ou mais de:

i. maior estabilidade térmica e/ou

ii. maior atividade específica e/ou

iii. maior estabilidade proteolítica,

(d) a seleção de uma ou mais variantes fitase a partir da população de fitases.

(e) a repetição opcional das etapas de (a) a (c)

ciclicamente, e preferivelmente em que as variantes da fitase selecionadas em um ciclo são usadas como fitases iniciais no ciclo seguinte.

Em uma outra modalidade a invenção fornece um método para preparar uma variante da enzima fitase, cujo método compreende:

a) Submeter a seqüência de nucleotídeos que codifica a enzima fitase de origem para a mutagênese, em que a enzima fitase de origem é selecionada de

i. uma enzima fitase com pelo menos 75% de homologia em relação à SEQ ID NO: 3 ou um fragmento funcional seu;

ii. uma enzima fitase derivada de *Buttiaxella spp*.,

iii. pelo menos uma variante da enzima fitase.

b) A expressão da seqüência de nucleotídeos modificada obtida no passo (a) na célula hospedeira, e

c) A varredura para as células hospedeiras expressando uma variante da enzima fitase, a qual em comparação com a enzima fitase de origem tem características melhoradas, conforme aqui descrito, preferivelmente selecionadas de uma ou mais de:

i. maior estabilidade térmica e/ou

ii. maior atividade específica e/ou

iii. maior estabilidade proteolítica,

d) O preparo da variante da enzima fitase expressa

pela célula hospedeira.

Opcionalmente, as etapas de a) a c), opcionalmente incluindo d) podem ser repetidas em um ou mais ciclos subseqüentes.

Em uma outra modalidade a invenção fornece um método para o preparo de uma variante da fitase, compreendendo as seguintes etapas:

a) Submeter uma seqüência de nucleotídeo que codifica a enzima fitase de origem à mutagênese para gerar uma população de variantes de nucleotídeos alteradas, em que preferivelmente a(s) referida(s) alteração(ões) é/são obtidas através de uma inserção, anulação ou substituição de pelo menos um resíduo de aminoácidos na fitase de origem, ou qualquer combinação sua, e em que a enzima fitase de origem é selecionada de

(i) uma enzima fitase com pelo menos 75% de homologia em relação à SEQ ID NO: 3 ou um fragmento funcional seu;

(ii) uma enzima fitase derivada de *Buttiaxella spp*.,

(iii) pelo menos uma variante da enzima fitase.

(b) A expressão da população de variantes de nucleotídeos obtida na etapa (a) em uma população de células hospedeiras correspondentes, e

(c) A varredura da população para uma variante de fitase, a qual comparada com a enzima fitase de origem tem

características melhoradas, conforme aqui descritas, preferivelmente selecionadas de um ou mais de:

(i) maior estabilidade térmica e/ou

(ii) maior atividade específica e/ou

(iii) maior estabilidade proteolítica,

(d) Seleção de uma ou mais variantes da fitase a partir da população de fitases.

(e) A repetição opcional das etapas de (a) a (c), ciclicamente, e preferivelmente em que as variantes da fitase selecionadas em um ciclo são usadas como primeiras fitases no ciclo seguinte.

Onde apropriado, nos métodos acima de preparo de uma variante da enzima fitase, a referida seqüência de nucleotídeos é preferivelmente uma seqüência de DNA.

A seqüência de nucleotídeos é preferivelmente uma molécula de ácido nucléico purificada ou seqüência de nucleotídeos que codifica uma enzima compreendendo a seqüência de aminoácidos correspondendo à fitase da *Buttiauxella sp.*, ou um homólogo seu, conforme aqui descrito.

A fitase de origem é preferivelmente selecionada da SEQ ID NO: 3 ou de um fragmento funcional seu, ou um homólogo da fitase da *Buttiauxella sp* conforme revelado na SEQ ID NO: 3 conforme aqui descrito.

Nas modalidades acima da invenção, as quais se referem aos métodos de preparo da variante da enzima fitase, a enzima fitase de origem/enzima fitase de origem que codifica o nucleotídeo/nucleotídeo é preferivelmente uma fitase de tipo selvagem.

Entretanto, em outra a de origem pode ser uma variante preparada por ciclos anteriores de mutagênese, isto é, numa modalidade, os métodos de preparo das variantes da enzima fitase são iterativos, em que as etapas a) a c) (opcionalmente incluindo o passo d)) são repetidos pelo menos mais de uma vez. Em tais modalidades, os métodos de mutagênese usados no primeiro ciclo de mutagênese é preferivelmente PCR propenso a erro, mais preferivelmente PCR de limiar de erro. Ciclos subseqüentes também podem ser de PCR propenso a erro, mais preferivelmente de PCR de limiar de erro, mas podem alternativamente ser mutagênese baseada em recombinação, em que grupos de pelo menos duas variantes melhoradas independente são identificadas em um primeiro ciclo de mutagênese, durante um segundo ou subseqüente ciclo de mutagênese recombinado para produzir pelo menos uma variante recombinante (por exemplo, usando o embaralhamento de família ou os métodos de reação em cadeia da recombinase).

Será aparente para uma pessoa habilitada que os

métodos de mutagênese alternativos também podem ser usados, incluindo o projeto racional, a mutagênese de varredura de sítio ou a mutagênese induzida quimicamente/por radiação.

Nas modalidades acima da invenção, as quais se referem aos métodos de preparo da variante da enzima fitase, a variante da enzima fitase é preferivelmente testada para uma estabilidade térmica maior.

Nas modalidades acima da invenção, as quais se referem aos métodos de preparo da variante da enzima fitase, a variante da enzima fitase é preferivelmente testada para pelo menos um único parâmetro, preferivelmente selecionado dente uma maior estabilidade térmica, uma maior estabilidade proteolítica ou uma maior atividade específica, mais preferivelmente uma maior estabilidade térmica.

Preferivelmente, a varredura para o referido primeiro parâmetro em pelo menos um primeiro ciclo de mutagênese compreendendo pelo menos as etapas de a) a c), em que c) compreende pelo menos a varredura para o referido primeiro parâmetro. Esse primeiro ciclo de mutagênese pode, a seguir, ser seguido por outro(s) ciclo(s) (iterativo) de mutagênese e seleção, compreendendo as etapas de a) a c) (opcionalmente incluindo d)) em que a seleção nos referidos outros ciclos pode ser selecionada dos mesmos parâmetros de

seleção que os usados na etapa c) do referido primeiro ciclo, ou alternativamente um parâmetro diferente.

Durante ciclos iterativos dos métodos acima para preparar uma variante da enzima fitase, preferivelmente o referido primeiro parâmetro é selecionado a partir de uma estabilidade térmica maior, uma estabilidade proteolítica maior ou uma atividade específica maior, mais preferivelmente uma estabilidade térmica maior. Preferivelmente, quando um primeiro ciclo de mutagênese foi efetuado para selecionar variantes com uma estabilidade térmica maior, durante um/uns ciclo(s) subseqüente(s) maior(es) de mutagênese compreendendo as etapas de a) até c), o referido parâmetro é selecionado a partir de uma estabilidade térmica maior, uma estabilidade proteolítica maior ou uma atividade específica maior, mais preferivelmente uma estabilidade proteolítica maior ou uma atividade específica maior.

Nas modalidades acima da invenção, as quais se referem aos métodos para preparar a variante da enzima fitase, a variante da enzima fitase é preferivelmente varrida para uma estabilidade térmica maior, uma estabilidade proteolítica maior e uma atividade específica maior em pelo menos um ciclo de mutagênese (etapas de a até c), preferivelmente mais de um ciclo, isto é, ciclos iterativos

de seleção.

A enzima fitase de origem é preferivelmente derivada da P1-29 da *buttiauxella*.

Nos métodos de preparo da variante da enzima fitase, cujo método compreende a submissão da seqüência de DNA que codifica uma enzima fitase de origem à mutagênese, a seqüência de DNA que codifica a enzima fitase de origem é preferivelmente submetida à mutagênese aleatória, mais preferivelmente ao PCR propenso a erro, ainda mais preferivelmente ao PCR de limiar de erro.

Os métodos preferidos de mutagênese da seqüência de DNA que codifica a enzima fitase de origem é o PCR propenso a erro, mais preferivelmente o PCR de limiar de erro, outros métodos de mutagênese podem ser usados ou no lugar de PCR propenso a erro/de limiar ou juntamente com PCR propenso a erro/de limiar. Ver o Exemplo 12, o qual fornece referências para métodos de PCR propenso a erro e PCR de limiar de erro adequados. Outro método adequado para PCR mutagênico é revelado por Cadwell e Joyce (PCR Methods Appl. 3 (1994), 136-140)".

O termo "expressão em uma célula hospedeira" quando usado no contexto das modalidades as quais se referem a "um método para preparar uma variante da enzima fitase" é preferivelmente definido como produção da variante da

enzima fitase em um organismo vivo, órgão ou célula conforme aqui definido. Hospedeiros preferidos são *Escherichia coli K12; Bacillus subtilis; Saccharomyces cerevisiae.* Enzimas fitase aqui detalhadas foram caracterizadas depois da expressão heteróloga em um ou mais dos seguintes hospedeiros de expressão: *Escherichia coli K12; Bacillus subtilis; Saccharomyces cerevisiae.*

Entretanto, é considerado que para o propósito de seleção, as variantes da enzima fitase, conforme aqui definidas, tais métodos podem empregar métodos *in vitro* de expressão das variantes da enzima fitase, preferivelmente para o uso na etapa (c) dos referidos métodos, os quais utilizam a maquinaria de transcrição e tradução isoladas de uma ou mais células de um ou mais organismos vivos ou vírus. Tal produção *in vitro* de fitases variantes da invenção também pode ser usada para selecionar fitases variantes preferidas. A expressão *in vitro* pode ser adequadamente efetuada usando técnicas padronizadas. Para referência, favor ver "*In vitro* expression guide", disponível da Promega Inc (Parte# BR053).

Definições de fenótipos variantes.

Variantes com estabilidade térmica maior (diferença de estabilidade térmica) são preferivelmente determinados usando os métodos revelados no Exemplo 12.

A variante da enzima fitase preparada pelo método de preparo das variantes da enzima fitase tem uma diferença de estabilidade térmica (T.D.) de pelo menos 1,5, mais preferivelmente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, mais preferivelmente pelo menos 20.

Variantes com uma estabilidade proteolítica maior são preferivelmente determinadas pelos métodos revelados no Exemplo 12.

Preferivelmente a variante da enzima fitase da invenção tem uma estabilidade proteolítica (atividade residual) de pelo menos 45%, preferivelmente 50%, 55%, mais preferivelmente pelo menos 60% ou 65%, mais preferivelmente pelo menos 70%.

Preferivelmente a variante fitase da invenção tem uma atividade específica maior do que 100% de atividade em peso em pH 4,0, preferivelmente maior do que 105%, 110%, mais preferivelmente maior do que 114%.

Outras modalidades variantes

Em uma outra modalidade a invenção fornece métodos para o preparo de uma ração animal compreendendo uma variante da enzima fitase, o referido método compreendendo as etapas seqüenciais de i) efetuar um ou mais dos métodos acima de preparo da variante da enzima fitase, e ii)

adicionar a variante da enzima fitase preparada a uma ração animal.

Em uma modalidade específica a invenção fornece um método para o preparo de uma ração animal compreendendo uma variante da enzima fitase, o referido método compreendendo

a) A seleção da enzima fitase de origem, em que a enzima fitase de origem é selecionada de

i. uma enzima fitase de origem com pelo menos 75% de homologia em relação à SEQ ID NO: 3 ou um fragmento funcional seu,

ii. uma enzima fitase de origem derivada de *Buttiauxella* spp, preferivelmente *Buttiauxella* P1-29 e/ou

iii. pelo menos uma variante da enzima fitase.

b) Fazer pelo menos uma alteração a qual é uma inserção, anulação ou substituição de um resíduo de aminoácido na enzima fitase de origem para obter uma variante da enzima fitase.

c) Fazer a varredura para uma variante da enzima fitase, a qual em comparação com a enzima fitase de origem tem características melhoradas, conforme aqui descrito, preferivelmente selecionadas de um ou mais de:

i. estabilidade térmica maior e/ou

ii. atividade específica e/ou

iii. estabilidade proteolítica e/ou

d) Preparo da variante da enzima fitase

e) Adição da variante da enzima fitase a uma ração animal.

Em uma outra modalidade a invenção fornece métodos para o preparo de uma ração animal compreendendo uma variante da enzima fitase.

a) Submeter uma seqüência de nucleotídeo (preferivelmente DNA) que codifica uma enzima fitase de origem à mutagênese, em que o referido nucleotídeo é selecionado a partir de um nucleotídeo o qual codifica

i. uma enzima fitase de origem com pelo menos 75% de homologia em relação à SEQ ID NO: 3 do seu fragmento funcional, e/ou

ii. uma enzima fitase de origem derivada da *Butiauxella* spp, preferivelmente *Butiauxella* P1-29.

b) A expressão da seqüência de nucleotídeos modificada (preferivelmente DNA) obtida na etapa (a) na célula hospedeira, e

c) A varredura para as células hospedeiras expressando uma variante da enzima fitase, a qual em comparação com a enzima fitase de origem tem características melhoradas, conforme aqui descrito, preferivelmente selecionadas de uma ou mais de:

i. maior estabilidade térmica e/ou

ii. maior atividade específica e/ou

iii. maior estabilidade proteolítica,

d) O preparo da variante da enzima fitase expressa pela célula hospedeira.

e) a adição da variante da enzima fitase para uma ração animal.

As modalidades descritas e os aspectos preferidos do método de preparo da variante da enzima fitase também se aplicam aos métodos acima de preparo de uma ração animal compreendendo uma variante da enzima fitase.

Em outro aspecto da invenção é fornecida uma célula hospedeira transformada ou transfectada com um ácido nucléico que codifica uma fitase conforme aqui descrito.

Adequadamente, a célula hospedeira de acordo com esse aspecto da invenção compreende uma fitase a qual compreende uma seqüência de aminoácidos, ou um fragmento funcional seu, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3, ou uma seqüência que seja pelo menos 75% homóloga a ela.

Em uma modalidade preferida, a referida célula hospedeira produz uma fitase.

Em um outro aspecto da invenção é fornecida uma célula hospedeira transformada ou transfectada com um ácido nucléico que codifica uma fitase de acordo com a invenção. Preferivelmente a fitase é uma fitase de *Buttiauxella sp.*

conforme aqui descrito, ou um homólogo ou derivado seu. Adequadamente, a referida enzima fitase compreende uma seqüência de aminoácidos, ou um fragmento funcional seu, conforme estabelecido em qualquer uma dente as SEQ ID NO: 3 ou uma seqüência que seja pelo menos 75% homóloga (idêntica) a ela. Preferivelmente, a referida célula hospedeira produz uma fitase.

Em uma modalidade, a seqüência de nucleotídeos a qual pode ser usada na presente invenção é obtenível de (embora ela não tenha que ser verdadeiramente obtida de) *Buttiauxella sp.*, embora seja reconhecido que as enzimas isoladas e/ou purificadas de cepas equivalentes possam ser igualmente usadas.

Adequadamente a célula hospedeira é derivada de um microrganismo incluindo bactérias e fungos, incluindo leveduras. Em uma modalidade particularmente preferida a célula hospedeira é uma célula bacteriana procariótica. Células hospedeiras bacterianas adequadas incluem bactérias a partir de diferentes grupos taxonômicos procarióticos incluindo proteobactéria, incluindo membros da subdivisão alfa, beta, gama, delta e epsilon, bactérias gram-positivas tais como Actinomicetes, Firmicutes, Clostrídio e relacionados, flavobactérias, cianobactérias, bactérias de enxofre verdes, bactérias que não são de enxofre verdes e

archaea. Particularmente preferidas são as *Enterobacteriaceae*, tais como proteobactérias *Escherichia coli* pertencendo à subdivisão gama e bactérias gram positivas de baixa GC, tais como *Bacillus*.

Células hospedeiras de fungos adequadas incluem leveduras selecionadas do grupo consistindo de Ascomicotas incluindo sacaromicetes, tais como *Pichia, Hansenula* e *Saccaromyces,* esquizossacarmicestes, tais como *Schizosaccharomyces pombe* e ascamicotas anamórficas incluindo *Aspergillus*.

Outras células hospedeiras eucarióticas adequadas incluem células de insetos tais como células SF9, SF21, Trychplusiani e M121. Por exemplo, os polipeptídeos de acordo com a invenção podem ser vantajosamente expressos em sistemas de células de insetos. Assim como a expressão em células de insetos em cultura, genes da fitase podem ser expressos em organismos de insetos integrais. Vetores de vírus, tais como baculovírus, permitem a infecção de insetos inteiros. Grandes insetos, tais como mariposas, fornecem um bom rendimento de proteínas heterólogas. A proteína pode ser extraída a partir de insetos de acordo com técnicas de extração convencionais. Vetores de expressão adequados para uso na invenção incluem todos os vetores os quais são capazes de expressar proteínas

estranhas em linhagens de células de insetos.

Outras células hospedeiras incluem células de plantas selecionadas a partir do grupo consistindo de protoplastos, células, calos, tecidos, órgãos, sementes, embriões, óvulos, zigotos, etc. A invenção também proporciona plantas inteiras que foram transformadas e compreendem o DNA recombinante da invenção.

O termo "planta" geralmente inclui algas eucarióticas, embriófitos incluindo *Bryophyta, Pteridophyta* e *Spermatophyta* tais como gimnospermas e angiospermas.

Preferivelmente, a referida célula hospedeira é um microrganismo. Microrganismos preferidos incluem células bacterianas procarióticas, preferivelmente *E. Coli, B. Subtilis* e outras espécies do gênero *Bacillus*, leveduras, preferivelmente, *Hansenula polymorpha* e *Schizosaccharomyces pombe*.

Em outro aspecto da invenção é fornecida uma cepa de célula bacteriana de *Butiauxella sp* P1-29 depositada pela Danisco Global Invention, Sokeritehtaanie 20, FIN-02460 Kantvik, Finlândia, em 22 de setembro de 2004, sob o número de acesso NCMIB 41248. Tal célula pode ser incorporada diretamente no alimento.

Em outro aspecto, é fornecido um método para a produção de fitases compreendendo a transfecção de uma célula

hospedeira com um vetor de expressão ou plasmídeo de acordo com a invenção, o cultivo da referida célula hospedeira sob condições para a expressão da fitase e a extração da referida fitase a partir do meio de cultura celular hospedeiro.

Adequadamente, o referido método é para a produção de uma fitase compreendendo a expressão de uma seqüência de aminoácidos conforme estabelecida na SEQ ID NO: 3 ou uma seqüência com pelo menos 75% de homologia a ela ou um fragmento efetivo seu em uma célula hospedeira e a expressão da proteína secretada a partir do meio de cultura da célula hospedeira.

Outro aspecto da invenção fornece uma composição de ração compreendendo uma fitase de acordo com a invenção. Preferivelmente, a composição de alimento compreende uma fitase a uma concentração de 10-1000 U/kg de ração, preferivelmente, 200-2000 U/kg de ração, mais preferivelmente, 500-1000 U/kg de ração.

Em uma modalidade, a composição de ração compreende uma célula hospedeira de acordo com a invenção.

Em um outro aspecto, é fornecido o uso de uma fitase de acordo com a invenção em alimentos ou em ração animal.

ASPECTOS PREFERIDOS

Aspectos preferidos são apresentados nas

reivindicações associadas na seguinte descrição e na seção de exemplos.

VANTAGENS ADICIONAIS

A presente invenção é vantajosa, uma vez que ela fornece fitases que têm um número de propriedades que as tornam particularmente úteis como aditivos para rações animais.

Particularmente, as fitases da presente invenção são ativas em pH baixo e, preferivelmente, na faixa de pH de 2 a 5,5 com atividade máxima em cerca de pH 4-4,5. Adequadamente, as fitases da presente invenção são ativas em pHs baixos (retendo cerca de 40% da atividade máxima em pH 2,5) do ambiente estomacal.

Além disso, as fitases da presente invenção são eficientemente secretadas tanto no hospedeiro natural e durante a expressão heteróloga, levando dessa forma a uma produção mais eficiente e ao isolamento para a adição aos alimentos.

Além disso, as fitases da presente invenção têm uma ampla especificidade de substrato incluindo substratos de penta-, tetra-, tri- e difosfatos, desta forma aumentando o fosfato total disponível para a absorção pelo animal. As fitases da presente invenção também têm, preferivelmente, uma alta atividade específica na região de 300 U/mg +/-

aproximadamente 10%, preferivelmente pelo menos 300 U/mg.

Os produtos da presente invenção podem ser usados como aditivos/suplementos para alimentos e rações. Os produtos podem ser úteis na produção comercial de vários inositol-fosfatos.

FITATO/ÁCIDO FÍTICO/FITASES

Ácido fítico (hexaquisfosfato de mioinositol) é um importante constituinte em cereais, legumes e em safras de sementes oleaginosas. A forma de sal, fitato, é a principal forma de estocagem de fósforo nessas plantas.

Fitases catalisam a hidrólise do monoéster de fosfato do ácido fítico, o que resulta na formação em etapas de pentaquis-, tetraquis-, trisquis-, bis- e monofosfatos de mioinositol, assim como a liberação de fosfato inorgânico.

Os termos "fitase de tipo selvagem" ou "tipo selvagem", conforme aqui utilizados, se referem à enzima fitase com uma seqüência de aminoácidos encontrada na natureza.

Os termos "variante de fitase" ou "variante" ou "forma modificada" se referem a uma enzima fitase com uma seqüência de aminoácidos derivada da seqüência de aminoácidos de uma fitase de origem com uma ou mais substituições, inserções e/ou anulações de aminoácidos, os quais juntos são referidas como "mutações".

Os termos "fitase de origem" ou "enzima de origem" se referem a uma enzima fitase a partir da qual uma variante fitase é derivada. Uma fitase de origem pode ser uma fitase do tipo selvagem ou outra variante de fitase. Particularmente, na presente invenção, uma "fitase de origem" pode ser derivada da *Buttiauxella sp*. Adequadamente, a "fitase de origem" é derivada da cepa P1-29 da *Buttiauxella*, conforme descrita aqui, a qual preferivelmente tem a seqüência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 3.

ISOLADO

Em um aspecto, preferivelmente a seqüência de nucleotídeos ou de aminoácidos está em uma forma isolada. O termo "isolado" significa que a seqüência é pelo menos substancialmente a forma livre de pelo menos um outro componente com o qual a seqüência está naturalmente associada na natureza e conforme encontrada na natureza.

PURIFICADO

Em um aspecto, preferivelmente a seqüência de nucleotídeos ou de aminoácidos está em uma forma purificada. O termo "purificado" significa que a seqüência está em um estado relativamente puro, mais preferivelmente pelo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% pura. Em uma modalidade preferida, ao se referir a um polipeptídeo,

a pureza conforme definida acima é determinada em termos de ser purificada a partir de outros polipeptídeos por eletroforese de SS-PAGE. Em uma modalidade preferida, ao se referir a um polinucleotídeo, a pureza conforme definida acima é determinada em termos de ser purificada a partir de outros polinucleotídeos.

SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS

O escopo da presente invenção engloba seqüências de nucleotídeos que codificam enzimas com as propriedades específicas conforme aqui definidas.

O termo “seqüência de nucleotídeos” aqui se refere a uma seqüência de oligonucleotídeos, seqüência de ácidos nucléicos ou de polinucleotídeos, e variantes, homólogos, fragmentos e seus derivados (tais como suas porções). A seqüência de nucleotídeos pode ser de origem genômica ou sintética ou recombinante, a qual pode ser de dupla fita ou de fita única, seja representando filamento de sentido ou de anti-sentido.

O termo "seqüência de nucleotídeos" ou "molécula de ácido nucléico", em relação à presente invenção, inclui o DNA genômico, o DNAc, o DNA sintético e o RNA. Preferivelmente ele significa DNA, mais preferivelmente seqüência de DNA que codifica para a presente invenção.

Em uma modalidade preferida, a seqüência de

nucleotídeos, em relação a e quando englobada pelo escopo *per se* da presente invenção, não inclui a seqüência de nucleotídeos natural de acordo com a presente invenção quando no seu ambiente natural e quando ela está ligada à(s) sua(s) seqüência(s) naturalmente associada(s) que é/estão no seu/seus ambientes naturais. Por facilidade de referência, nós devemos chamar essa modalidade preferida de "seqüência de nucleotídeos não-nativa". Sob esse aspecto, o termo "seqüência de nucleotídeos natural" significa uma seqüência de nucleotídeos inteira que está no seu ambiente natural e, quando operativamente ligada a um promotor inteiro com o qual ela está naturalmente associada, cujo promotor está também no seu ambiente natural. Entretanto, a seqüência de aminoácidos englobada pelo escopo da presente invenção pode ser isolada e/ou purificada depois da expressão de uma seqüência de nucleotídeos no seu organismo de origem. Preferivelmente, entretanto, a seqüência de aminoácidos englobada pelo escopo da presente invenção pode ser expressa por uma seqüência de nucleotídeos no seu organismo de origem, mas na qual a seqüência de nucleotídeos não está sob o controle do promotor com o qual ele está naturalmente associado naquele organismo.

PREPARAÇÃO DE UMA SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS

Tipicamente, a seqüência de nucleotídeos englobada

pelo escopo da presente invenção ou as seqüências de nucleotídeos para uso na presente invenção são preparadas usando técnicas de DNA recombinante (isto é, DNA recombinante). Entretanto, em uma modalidade alternativa da invenção, a seqüência de nucleotídeos poderia ser sintetizada, como um todo ou parte, usando métodos químicos bem conhecidos na técnica (ver Caruthers MH *et al.*, (1980), *Nuc Acids Res Symp Ser* 215-23, e Horn *et al.*, (1980), *Nuc Acids Res Symp Ser* 225-232).

Uma seqüência de nucleotídeos que codifica ou uma enzima a qual tem as propriedades específicas conforme aqui definidas ou uma enzima a qual é adequada para modificação pode ser identificada e/ou isolada e/ou purificada a partir de qualquer célula ou organismo produtor de tal enzima. Vários métodos são bem conhecidos na técnica para a identificação e/ou o isolamento e/ou a purificação das seqüências de nucleotídeos. A título de exemplo, técnicas de amplificação por PCR para preparar mais de uma seqüência podem ser usadas uma vez que uma seqüência adequada tenha sido identificada e/ou isolada e/ou purificada.

A título de um exemplo adicional, uma biblioteca de DNA genômico e/ou DNAc pode ser construída usando DNA cromossomal ou RNA mensageiro a partir do organismo produtor da enzima. Se a seqüência de aminoácidos da enzima

ou uma parte da seqüência de aminoácidos da enzima for conhecida, sondas de oligonucleotídeos marcadas podem ser sintetizadas e usadas para identificar clones que codificam a enzima a partir da biblioteca genômica preparada a partir do organismo. Alternativamente, uma sonda de oligonucleotídeo marcada contendo seqüências homólogas a outro gene da enzima conhecido poderia ser usada para identificar clones que codificam enzima. No último caso, as condições de hibridização e de lavagem de baixa estringência são usadas.

Alternativamente, clones que codificam enzimas poderiam ser identificados pela inserção de fragmentos de DNA genômico em um vetor de expressão, tal como um plasmídeo, pela transformação de bactérias negativas para a enzima com a biblioteca de DNA genômico resultante e, a seguir, plaqueando as bactérias transformadas em placas de agar contendo um substrato para a enzima (por exemplo, maltose par uma glicosidase (maltase) produtora de enzima), permitindo dessa forma que os clones que expressam a enzima sejam identificados.

Ainda em uma outra alternativa, a seqüência de nucleotídeos que codifica a enzima pode ser preparada sinteticamente por métodos padrões estabelecidos, por exemplo, o método da fosforoamidita descrito por Beucage S.

L. *et al.*, (1981) *Tetrahedron Letters* **22**, p 1859-1869, ou o método descrito por Matthes *et al.*, (1984) *EMBO J.* **3**, p 801-805. No método da fosforoamidita, oligonucleotídeos são sintetizados, por exemplo, em um sintetizador de DNA automático, purificado, anelado, ligado e clonado em vetores apropriados.

A seqüência de nucleotídeos pode ser de origem genômica e sintética misturada, de origem sintética de DNAc misturada ou de origem genômica de DNAc misturada, preparada pela ligação de fragmentos de origem sintética, genômica ou de DNAc (conforme apropriado) de acordo com técnicas padrões. Cada fragmento ligado corresponde a várias partes da seqüência de nucleotídeos inteira. A seqüência de DNA também pode ser apropriada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando iniciadores específicos, por exemplo, conforme descritos na US 4.683.202 ou em Saiki R K *et al.*, (*Science* (1988) **239**, pp 487-491).

Devido à degeneração no código genético, seqüências de nucleotídeos podem ser prontamente produzidas, nas quais o uso de códon de triplete, para alguns ou todos os aminoácidos codificados pela seqüência de nucleotídeos original, foram alterados, produzindo dessa forma uma seqüência de nucleotídeos com baixa homologia em relação à seqüência de nucleotídeos original, mas a qual codifique a

mesma, ou uma variante seqüência de aminoácidos conforme codificada pela seqüência de nucleotídeos original. Por exemplo, para a maioria dos aminoácidos a degeneração do código genético está na terceira posição no códon de triplete (posição de oscilação) (para referência ver Stryer, Lubert, Biochemistry, Terceira edição, Freeman Press, ISBN 0-7167-1920-7), portanto, uma seqüência de nucleotídeos nos quais todos os códons de triplete tenham sido "oscilados" na terceira posição poderiam ser cerca de 66% idênticos à seqüência de nucleotídeos original, entretanto, a seqüência de nucleotídeos melhorada poderia codificar a mesma ou uma variante seqüência de aminoácidos primária como a seqüência de nucleotídeos original.

Portanto, a presente invenção se refere ainda a qualquer seqüência de nucleotídeos que tenha o uso de um códon de triplete alternativo para pelo menos um aminoácido que codifica um códon de triplete, mas o qual codifica uma seqüência de polipeptídeos igual ou uma variante como a seqüência de polipeptídeos codificada pela seqüência de nucleotídeos original.

Além disso, organismos específicos tipicamente têm uma tendência como para a qual os códons de triplete são usados para codificar aminoácidos. Tabelas de uso de códons preferidas são amplamente distribuídas e podem ser usadas

para preparar códons de genes otimizados. Tais técnicas de otimização de códons são rotineiramente usadas para otimizar a expressão dos transgenes num hospedeiro heterólogo.

EVOLUÇÃO MOLECULAR

Uma vez que uma seqüência de nucleotídeos codificadores de enzima tenha sido isolada e/ou purificada, ou uma seqüência de nucleotídeos codificadora de enzima putativa tenha sido identificada, pode ser desejável modificar a seqüência de nucleotídeos selecionada, por exemplo, pode ser desejável modificar a seqüência para preparar uma enzima de acordo com a presente invenção.

Mutações podem ser introduzidas usando oligonucleotídeos sintéticos. Esses oligonucleotídeos contêm seqüências de nucleotídeos flanqueando os sítios de mutação desejados.

Um método adequado é revelado em Morinaga *et al* (Biotechnology (1984) 2, p646-649). Outro método para introduzir mutações em seqüências de nucleotídeos que codificam enzimas é descrito em Nelson e Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, p 147-151).

Ao invés da mutagênese direcionada a sítio, tal como descrito acima, uma pessoa pode introduzir mutações aleatoriamente, por exemplo, usando um kit comercial tal

como o kit de mutagênese GeneMorph PCR da Stratagene, ou o kit de mutagênese aleatória Diversify PCR da Clontech.

Um terceiro método para obter novas seqüências é fragmentar seqüências de nucleotídeos não-idênticas, seja pelo uso de qualquer número de enzimas de restrição ou uma enzima, tal como a Dnase I, e pela remontagem das seqüências de nucleotídeos completas que codificam para proteínas funcionais. Alternativamente, uma pessoa pode usar uma ou múltiplas seqüências de nucleotídeos não-idênticas e introduzir mutações durante a remontagem da seqüência de nucleotídeos completa.

Assim, é possível produzir numerosas mutações direcionadas a sítio ou aleatórias em uma seqüência de nucleotídeos, seja *in vivo* ou *in vitro*, e subseqüentemente fazer o teste para a funcionalidade melhorada do polipeptídeo codificado pelas várias formas.

Como um exemplo não-limitante, mutações ou variantes naturais de uma seqüência de polinucleotídeos podem ser recombinadas ou com o tipo selvagem ou com outras mutações ou variantes naturais para produzir novas variantes. Tais novas variantes podem também ser varridas para uma funcionalidade melhorada do polipeptídeo codificado. A produção de novas variantes preferidas pode ser alcançada pelos vários métodos bem estabelecidos na técnica, por

exemplo, a Mutagênese de Limiar de Erro (WO 92/18645), a mutagênese aleatória mediada por oligonucleotídeo (US 5.723.323), o embaralhamento de DNA (US 5.605.793), a montagem de genes exomediada (WO 0058517). Outros métodos adequados estão descritos, por exemplo, na WO 0134835, WO 02/097130, WO 03/012100, WO03/057247, WO 2004/018674, US 6,303,344 e na US 6,132,970.

A aplicação dos métodos de evolução molecular acima mencionados e similares permitem a identificação e seleção de variantes das enzimas da presente invenção, as quais têm características preferidas sem qualquer conhecimento anterior de estrutura ou função protéica, e permite a produção de mutações ou variantes não-previsíveis porém benéficas. Existem numerosos exemplos da aplicação da evolução molecular na técnica para a otimização ou alteração da atividade enzimática, tais exemplos incluem, mas não estão limitados a um ou mais dos seguintes: expressão e/ou atividade otimizada em uma célula hospedeira ou *in vitro*, atividade enzimática aumentada, especificidade de substrato e/ou produto alterada, estabilidade enzimática ou estrutural aumentada ou diminuída, atividade/especificidade enzimática alterada em condições ambientais preferidas, por exemplo, temperatura, pH, substrato.

Os métodos de evolução molecular acima podem ser usados nos métodos de preparo de uma variante da enzima fitase conforme aqui descrito.

SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS

O escopo da presente invenção também engloba seqüências de aminoácidos de enzimas com propriedades específicas conforme aqui definidas.

Conforme aqui utilizado, o termo "seqüência de aminoácidos" é sinônimo com o termo "polipeptídeo" e/ou o termo "proteína". Em alguns exemplos, o termo "seqüência de aminoácidos" é sinônimo com o termo "peptídeo". Em alguns exemplos, o termo "seqüência de aminoácidos" é sinônimo com o termo "enzima".

A seqüência de aminoácidos pode ser preparada/isolada a partir de uma fonte conhecida, ou ela pode ser feita sinteticamente ou ela pode ser preparada pelo uso de técnicas de DNA recombinantes.

A enzima englobada pela presente invenção pode ser usada juntamente com outras enzimas. Sendo assim, a presente invenção também cobre uma combinação de enzimas em que a combinação compreende a enzima da presente invenção e outra enzima, a qual pode ser outra enzima de acordo com a presente invenção. Esse aspecto é discutido em uma seção posterior.

Preferivelmente, a seqüência de aminoácidos quando relacionada a e quando englobada pelo escopo *per se* da presente invenção não é uma enzima natural. Sob esse aspecto, o termo "enzima natural" significa uma enzima inteira que está em um ambiente natural e quando ela foi expressa pela sua seqüência de nucleotídeos natural.

VARIANTES/HOMÓLOGOS/DERIVADOS

A presente invenção também engloba o uso de variantes, homólogos e derivados de qualquer seqüência de aminoácidos de uma enzima ou de qualquer seqüência de nucleotídeos que codifique tal enzima.

Aqui, o termo "homólogo" significa uma entidade com uma certa homologia com as seqüências de aminoácidos e com as seqüências de nucleotídeos. Aqui, o termo "homologia" pode ser igualado com "identidade". Adequadamente, "homólogo" nesse contexto se refere à porcentagem de identidade de seqüências entre duas enzimas depois de alinhar as suas seqüências usando algoritmos de alinhamento conforme descrito em maiores detalhes abaixo.

No presente contexto, uma seqüência de aminoácidos homóloga é tomada para incluir uma seqüência de aminoácidos a qual pode ser pelo menos 75, 80, 81, 85 ou 90% idêntica, preferivelmente pelo menos 95, 96, 97, 98 ou 99% idêntica à seqüência. Tipicamente, os homólogos compreenderão os

mesmos sítios ativos, etc. – por exemplo, como a seqüência de aminoácidos em discussão. Embora homologia também possa ser considerada em termos de similaridade (isto é, resíduos de aminoácidos com propriedades/funções químicas semelhantes), no contexto da presente invenção é preferido expressar homologia em termos de identidade de seqüência.

Por "fragmento funcional" se entende um fragmento de polipeptídeo que retém aquelas propriedades características daquele polipeptídeo. No contexto da presente invenção, um fragmento funcional de uma enzima fitase é um fragmento que retém a capacidade de clivagem do carotenóide da proteína inteira.

No presente contexto, uma seqüência de nucleotídeos homóloga é tomada para incluir uma seqüência de nucleotídeos a qual pode ser pelo menos 75, 80, 81, 85 ou 90% idêntica, preferivelmente pelo menos 95, 96, 97, 98 ou 99% idêntica à seqüência de nucleotídeos que codifica uma enzima da presente invenção (a seqüência sob discussão). Tipicamente, os homólogos compreenderão as mesmas seqüências que codificam para sítios ativos, etc. como a seqüência em estudo. Embora a homologia também possa ser considerada em termos de similaridade (isto é, resíduos de aminoácidos com propriedades/funções químicas semelhantes) no contexto da presente invenção é preferível expressar a

homologia em termos de identidade de seqüência.

Para as seqüências de aminoácidos e as seqüências de nucleotídeos, comparações de homologia podem ser conduzidas pelo olho ou, mais comumente, com a ajuda de programas de comparação de seqüências prontamente disponíveis. Esses programas de computador comercialmente disponíveis podem calcular a % de homologia entre duas ou mais seqüências.

A % de homologia pode ser calculada em relação às seqüências contíguas, isto é, uma seqüência é alinhada com a outra seqüência e cada aminoácido em uma seqüência é diretamente comparado com o aminoácido correspondente na outra seqüência, um resíduo por vez. Isso é chamado um alinhamento “sem intervalo”. Tipicamente, tais alinhamentos não-intervalados são efetuados somente sobre um número relativamente pequeno de resíduos.

Embora esse seja um método muito simples e consistente, ele falha ao tomar consideração que, por exemplo, em um diferente par de seqüências idênticas, uma inserção ou anulação irá fazer com que os seguintes resíduos de aminoácidos sejam tirados de alinhamento, resultando dessa forma potencialmente em uma grande redução em % de homologia quando um alinhamento global é efetuado. Conseqüentemente, a maioria dos métodos de comparação de seqüências são projetados para produzir alinhamentos ótimos

que levam em consideração inserções e anulações possíveis sem penalizar indevidamente a pontuação de homologia geral. Isso é alcançado pela inserção de "intervalos" no alinhamento de seqüências para tentar maximizar a homologia local.

Entretanto, esses métodos mais complexos designam "penalidades de intervalo" para cada intervalo que ocorre no alinhamento de forma que, para a mesma quantidade de aminoácidos idênticos, um alinhamento de seqüências com tantos poucos intervalos quanto possíveis – refletindo uma maior relação entre as duas seqüências comparadas – irá alcançar uma pontuação maior do que uma com muitos intervalos. "Custos de intervalo de afins" são tipicamente usados que carregam um custo relativamente alto para a existência de um intervalo e uma penalidade menor para cada resíduo subseqüente no intervalo. Esse é o sistema de pontuação de intervalo mais comumente usado. Penalidades altas de intervalo irão, claramente, produzir alinhamentos otimizados com menos intervalos. A maioria dos programas de alinhamento permite que as penalidades de intervalo sejam modificadas. Entretanto, é preferido usar os valores predefinidos ao usar tal programa de computador para comparações de seqüências. Por exemplo, ao usar o pacote de melhor ajuste GCG Wisconsin a penalidade do intervalo

predefinido para as seqüências de aminoácidos é de -12 para um intervalo e -4 pra cada extensão.

O cálculo da % de homologia máxima, portanto, primeiramente requer a produção de um alinhamento ótimo, levando em consideração penalidades de intervalo. Um programa de computador adequado para executar tal alinhamento é o pacote de melhor ajuste GCG Wisconsin (Devereux et al 1984 Nuc. Acids Research 12 p387). Exemplos de outros programas de computador podem efetuar comparações de seqüências incluem, mas ainda não estão limitadas, ao pacote BLAST (ver Ausubel et al., 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4ª Ed – capítulo 18), FASTA (Altschul et al, 1990 J Mol. Biol. 403-410) e o conjunto de ferramentas de comparação GENEWORKS. Tanto o BLAST quanto o FASTA são disponíveis para busca "offline" e "online" (ver Ausubel et al, 1999, Short Protocols in Molecular- Biology, páginas 7-58 a 7-60).

Entretanto, para algumas aplicações, é preferível usar o programa de melhor ajuste GCG. Uma nova ferramenta, chamada BLAST 2 Sequences também está disponível para comparar seqüências de proteínas e de nucleotídeos (ver FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 e tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

Embora a % de homologia final possa ser medida em

termos de identidade, o processo de alinhamento por si só é tipicamente não baseado em uma comparação de pares tudo-ou-nada. Ao contrário, uma matriz de pontuação de similaridade escalada é geralmente usada que designa pontuações para cada comparação em pares baseando-se na similaridade química ou na distância evolucionária. Um exemplo de tal matriz comumente usada é a matriz BLOSUM62 – a matriz predefinida para o conjunto de programas BLAST. Os programas GCG Wisconsin geralmente usam ou os valores predefinidos públicos ou uma tabela de comparação de símbolos feita sob encomenda, se fornecida (ver o manual do usuário para maiores detalhes). Para algumas aplicações, é preferível usar os valores predefinidos públicos para o pacote GCG, ou no caso de outro programa de computador, a matriz predefinida, tal como BLOSUM62.

Alternativamente, as homologias em porcentagem podem ser calculadas usando a característica de alinhamento múltiplo em DNASIS™ (programa de computador Hitachi), baseando-se em um algoritmo, análogo ao CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), *Gene* **73** (1), 237–244).

Uma vez que o programa de computador tenha produzido um alinhamento ótimo, é possível calcular a % de homologia, preferivelmente a % de identidade de seqüência. O programa de computador tipicamente faz isso como parte da comparação

de seqüências e gera um resultado numérico.

Em um aspecto preferido da presente invenção, o seguinte programa de computador e parâmetros para calcular a porcentagem de homologia/identidade de seqüência são usadas. Para seqüências de aminoácidos a porcentagem de identidades (homologia) ou "positivos" são calculados pelo AlignX VectorNTI (Vetor NTI Advance 9.1 da Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia, EUA) para cada par possível de seqüências de aminoácidos. Os parâmetros são parâmetros predefinidos (penalidade de abertura de intervalo – 1-, penalidade de extensão de intervalo 0,1).

Para seqüências de ácidos nucléicos a porcentagem de identidades (homologia) ou "positivos" são calculadas pelo programa AlignX VectorNTI da Informax Inc. (EUA) para cada par possível de seqüências de ácidos nucléicos. Os ajustes são justes predefinidos para DNA são: penalidade de abertura de intervalo: 15 e penalidade de extensão de intervalo: 6,66 (os mesmos ajustes para alinhamentos múltiplos).

Preferivelmente a identidade de aminoácidos (homologia) é calculada através da seqüência completa de aminoácidos ou para o ácido nucléico em um polinucleotídeo correspondente o qual codifica a respectiva seqüência completa de aminoácidos.

As seqüências também podem ter anulações, inserções ou substituições de resíduos de aminoácidos, os quais produzem uma alteração silenciosa e resultam em uma substância funcionalmente equivalente. Substituições de aminoácidos deliberadas podem ser feitas com base na similaridade das propriedades dos aminoácidos (tais como polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofilicidade e/ou a natureza anfifática dos resíduos) e é, portanto, útil para agrupar os aminoácidos juntos em grupos funcionais. Aminoácidos podem ser agrupados juntos baseando-se somente nas propriedades das suas cadeias laterais. Entretanto, é mais útil incluir dados de mutação da mesma forma. Os grupos de aminoácidos derivados dessa forma são propensos a serem conservados por razões estruturais. Esses grupos podem ser descritos na forma de um diagrama de Venn (Livingstone C.D. e Barton G.J. (1993) "Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation" *Comput.Appl Biosci*. 9: 985 745-756) (Taylor W.R. (1986) "The classification of amino acid conservation" *J.Theor.Biol*. **119;** 205-218). Substituições conservativas podem ser feitas, por exemplo, de acordo com a tabela abaixo a qual descreve um diagrama de Venn geralmente aceito de agrupamento de aminoácidos.

Grupo		Subgrupo	
Hidrofóbico	F W Y H K M I L V A G C	Aromático	F W Y H
		Alifático	I L V
Polar	W Y H K R E D C S T N Q	Carregado	H K R E D
		Positivamente carregado	H K R
		Negativamente carregado	E D
Pequeno	V C A G S P T N D	Muito pequeno	A G S

A presente invenção também engloba substituições homólogas (substituição e reposição são ambos aqui usados para significar a troca de um resíduo de aminoácido existente com um resíduo alternativo) que pode ocorrer, isto é, uma substituição por um outro equivalente, tal como de um básico por outro básico, de um ácido por outro ácido, um polar por outro polar, etc. A substituição não-homóloga pode também ocorrer, isto é, a partir de uma classe de resíduos para outra ou, alternativamente, envolvendo a inclusão de aminoácidos não-naturais tais como ornitina (de agora em diante chamada de Z), ornitina ácido diaminobutírico (de agora em diante chamada de B), norleucina ornitina (de agora em diante chamada de O),

pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina e fenilglicina.

Reposições também podem ser feitas por aminoácidos não-naturais.

Seqüências de aminoácidos variantes podem incluir grupos espaçadores adequados que podem ser inseridos entre quaisquer dois resíduos de aminoácidos da seqüência, incluindo grupos alquil tais como grupos metil, etil ou propil além dos espaçadores de aminoácidos, tais como resíduos de glicina ou de β-alanina. Uma outra forma de variação que envolve a presença de um ou mais resíduos de aminoácidos na forma peptóide será bem entendida pelos indivíduos versados na técnica. Para evitar dúvidas, a "forma peptóide" é usada para se referir aos resíduos de aminoácidos variantes em que o grupo de α-carbono substituinte está no átomo de nitrogênio do resíduo ao invés de no carbono α. Processos para preparar peptídeos na forma peptóide são conhecidos na técnica, por exemplo, Simon RJ et al., PNAS (1992) **89**(20), 9367-9371 e Horwell DC, *Trends Biotechnol*. (1995) **13**(4), 132-134.

As seqüências de nucleotídeos para uso na presente invenção podem incluir nelas nucleotídeos sintéticos ou modificados. Uma variedade de diferentes tipos de modificação para oligonucleotídeos é conhecida na técnica.

Esses incluem estruturas de metilfosfonato e fosforotioato e/ou a adição de cadeias de acridina e de polilisina nos terminais 3′ e/ou 5′ da molécula. Para os propósitos da presente invenção, deve ser entendido que as seqüências de nucleotídeos aqui descritas podem ser modificadas por qualquer método disponível na técnica. Tais modificações podem ser executadas para intensificar a atividade *in vivo* ou o tempo de vida das seqüências de nucleotídeos da presente invenção.

A presente invenção também engloba o uso de seqüências de nucleotídeos que são complementares às seqüências aqui apresentadas, ou qualquer derivado, fragmento ou derivado seu. Se a seqüência é complementar a um fragmento seu, então aquela seqüência pode ser usada como uma sonda para identificar seqüências codificantes similares em outros organismos, etc.

Polinucleotídeos os quais não são 100% homólogos às seqüências da presente invenção, mas caem dentro do escopo da presente invenção podem ser obtidos a partir de uma variedade de formas. Outros variantes das seqüências aqui descritas podem ser obtidos, por exemplo, pela sondagem das bibliotecas de DNA feitas a partir de um conjunto de indivíduos, por exemplo indivíduos de diferentes populações. Além disso, outros homólogos podem ser obtidos

e tais homólogos e fragmentos seus, em geral, serão capazes de hibridizar seletivamente nas seqüências mostradas na listagem de seqüências aqui. Tais seqüências podem ser obtidas pela sondagem de bibliotecas de DNAc feitas a partir de bibliotecas de DNA genômico a partir de outras espécies, e pela sondagem de tais bibliotecas com sondas compreendendo toda ou parte de qualquer uma das seqüências nas listagens de seqüências em anexo sob condições de média a alta estringência. Considerações similares se aplicam para obter espécies homólogas e variantes alélicas das seqüências de polipeptídeos ou nucleotídeos da invenção.

Variantes e homólogos de cepa/espécie também podem ser obtidos usando PCR degenerado o qual irá usar iniciadores projetados para seqüências alvo nos variantes e homólogos que codificam seqüências de aminoácidos conservadas nas seqüências da presente invenção. Seqüências conservadas podem ser previstas, por exemplo, pelo alinhamento das seqüências de aminoácidos a partir de vários variantes/homólogos. Alinhamentos de seqüências podem ser efetuados usando programas de computadores conhecidos na técnica. Por exemplo, o programa GCG Wisconsin PileUp é amplamente usado.

Os iniciadores usados no PCR degenerado irão conter uma ou mais posições degeneradas e serão usados em

condições de estringência mais baixas do que aquelas usadas para clonar seqüências com iniciadores de seqüências individuais contra seqüências conhecidas.

Alternativamente, tais polinucleotídeos podem ser obtidos por mutagênese direcionada ao sítio de seqüências caracterizadas. Isso pode ser útil onde, por exemplo, alterações na seqüência de códons silenciosas são necessárias para otimizar as preferências dos códons para uma célula hospedeira particular na qual as seqüências de polinucleotídeos estão sendo expressas. Outras alterações de seqüências podem ser desejadas para introduzir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição ou para alterar a propriedade ou função dos polipeptídeos codificados pelos polinucleotídeos.

Polinucleotídeos (seqüências de nucleotídeos) da invenção podem ser usadas para produzir um iniciador, por exemplo, um iniciador de PCR, um iniciador para uma reação de amplificação alternativa, uma sonda, por exemplo, marcada com uma marcação revelável por instrumentos convencionais usando marcadores radioativos ou não-radioativos, ou os polinucleotídeos podem ser clonados em vetores. Tais iniciadores, sondas e outros fragmentos serão de pelo menos 15, preferivelmente pelo menos 20, por exemplo, pelo menos 25, 30 ou 40 nucleotídeos de

comprimento, e também são englobados pela expressão polinucleotídeos da invenção, conforme aqui utilizada.

Polinucleotídeos, tais como polinucleotídeos de DNA e sondas de acordo com a invenção podem ser produzidos recombinantemente, sinteticamente ou por quaisquer formas disponíveis para aqueles indivíduos versados na técnica. Eles também podem ser clonados por técnicas padrões.

Em geral, iniciadores serão produzidos por formas sintéticas, envolvendo uma produção passo a passo da seqüência de ácidos nucléicos um nucleotídeo de cada vez. Técnicas para realizar isso usando técnicas automatizadas são prontamente disponíveis na técnica.

Polinucleotídeos mais longos serão geralmente produzidos usando formas recombinantes, por exemplo, usando técnicas de clonagem de PCR (reação em cadeia da polimerase). Os iniciadores podem ser projetados para conter sítios de reconhecimento de enzimas de restrição adequados de forma que o DNA amplificado possa ser clonado em um vetor de clonagem adequado.

BIOLOGICAMENTE ATIVO

Preferivelmente, as seqüências variantes, etc. são pelo menos tão biologicamente ativas quanto às seqüências aqui apresentadas.

Conforme aqui utilizado, “biologicamente ativo” se

refere a uma seqüência com uma função estrutural similar (mas não necessariamente no mesmo grau), e/ou função regulatória similar (mas não necessariamente no mesmo grau), e/ou função biológica similar (mas não necessariamente no mesmo grau) da seqüência de ocorrência natural.

Particularmente, seqüências variantes ou suas formas modificadas têm um perfil enzimático semelhante ao perfil da fitase aqui identificada. Esse perfil inclui características, tais como sendo uma proteína secretada, com um pH ótimo na faixa de pH de 2 a 5,5, preferivelmente de 4,0 a 4,5, retendo pelo menos 50% da atividade máxima em relação à faixa de pH de 2,0–5,5 e/ou com uma atividade específica acima de 300 U/mg.

HIBRIDIZAÇÃO

A presente invenção também engloba seqüências que são complementares às seqüências de ácidos nucléicos da presente invenção ou seqüências que são capazes de hibridizar ou em seqüências da presente invenção ou em seqüências que são complementares a essas.

O termo “hibridização”, conforme aqui utilizado, deve incluir “o processo pelo qual um filamento de ácido nucléico se junta com um filamento complementar através do pareamento de bases”, assim como o processo de amplificação

conforme executado nas tecnologias de reação em cadeia da polimerase (PCR).

A presente invenção também engloba o uso de seqüências de nucleotídeos que são capazes de hibridizar nas seqüências que são complementares às seqüências aqui apresentadas, ou qualquer derivado, fragmento ou derivado seu.

O termo "variante" também engloba seqüências que são complementares às seqüências que são capazes de hibridizar nas seqüências de nucleotídeos aqui apresentadas.

Preferivelmente, o termo "variante" engloba seqüências que são complementares às seqüências que são capazes de hibridizar sob condições estringentes (por exemplo, 50°C e 0,2 x SSC {1 x SSC = NaCl 0,15 M, Na_3citrato 0,015 M pH 7,0}) em relação às seqüências de nucleotídeos aqui apresentadas.

Mais preferivelmente, o termo "variante" engloba seqüências que são complementares às seqüências que são capazes de hibridizar sob condições de alta estringência (por exemplo, 65°C e 0,1 x SSC{1 x SSC = NaCl 0,15 M, Na_3citrato 0,015 M pH 7,0}) em relação às seqüências de nucleotídeos aqui apresentadas.

A presente invenção também se refere às seqüências de nucleotídeos que podem hibridizar nas seqüências de

nucleotídeos da presente invenção (incluindo seqüências complementares daquelas aqui apresentadas).

A presente invenção também se refere às seqüências de nucleotídeos que são complementares às seqüências que podem hibridizar nas seqüências de nucleotídeos da presente invenção (incluindo seqüências complementares daquelas aqui apresentadas).

Também incluídas dentro do escopo da presente invenção estão as seqüências de polinucleotídeos que são capazes de hibridizar nas seqüências de nucleotídeos aqui apresentadas sob condições de estringência intermediária a máxima.

Em um aspecto preferido, a presente invenção cobre seqüências de nucleotídeos que podem hibridizar na seqüência de nucleotídeos da presente invenção, ou o seu complemento, sob condições de estringência (por exemplo, 50°C e 0,2 x SSC).

Em um aspecto mais preferido, a presente invenção cobre seqüências de nucleotídeos que podem hibridizar na seqüência de nucleotídeos da presente invenção, ou no seu complemento, sob condições de alta estringência (por exemplo, 65°C e 0,1 x SSC).

MUTAGÊNESES DIRECIONADAS A SÍTIO

Uma vez que uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma enzima tenha sido isolada e/ou purificada, ou uma

seqüência de nucleotídeo que codifica uma enzima putativa tenha sido identificada, pode ser desejável mudar a seqüência para preparar uma enzima da presente invenção.

Mutações podem ser introduzidas usando oligonucleotídeos sintéticos. Esses oligonucleotídeos contêm seqüências de nucleotídeos flanqueando os sítios de mutação desejados.

Um método adequado é revelado em Morinaga et al, {Biotechnology (1984) **2**, p646-649). Outro método para introduzir mutações em seqüências de nucleotídeos que codificam enzimas é descrito em Nelson e Long (Analytical Biochemistry (1989), **180**, p 147-151). Um outro método é descrito em Sarkar e Sommer (Biotechniques (1990), 8, p404-407 -"The megaprimer method of site directed mutagenesis").

RECOMINANTE

Em um aspecto a seqüência para uso na presente invenção é uma seqüência recombinante – isto é, uma seqüência que tenha sido preparada usando técnicas de DNA recombinante.

Essas técnicas de DNA recombinante estão dentro das capacitações de uma pessoa normalmente versada na técnica. Tais técnicas são explicadas na literatura, por exemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edição, Livros 1-3,

Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SINTÉTICO

Em um aspecto a seqüência para uso na presente invenção é uma seqüência sintética – isto é, uma seqüência que foi preparada por síntese química ou enzimática *in vitro*. Ela inclui, mas não está limitada, a seqüências feitas com códons ótimos de uso para organismos hospedeiros – tais como as leveduras metilotróficas *Pichia* e *Hansenula*.

EXPRESSÃO DAS ENZIMAS

A seqüência de nucleotídeos para uso na presente invenção pode ser incorporada em um vetor replicável recombinante. O vetor pode ser usado para replicar e expressar a seqüência de nucleotídeos, na forma de enzima, em uma e/ou de uma célula hospedeira compatível.

A expressão pode ser controlada usando seqüências de controle, por exemplo, seqüências regulatórias.

A enzima produzida por uma célula recombinante hospedeira pela expressão da seqüência de nucleotídeos pode ser secretada ou pode estar contida intracelularmente dependendo da seqüência e/ou do vetor usado. As seqüências codificantes podem ser projetadas com seqüências de sinal as quais intensificam a secreção direta das seqüências que codificam a substância através de uma membrana celular procariótica ou eucariótica particular.

Vantajosamente, as enzimas da presente invenção são secretadas.

VETOR DE EXPRESSÃO

Os termos "plasmídeo", "sistema de vetores" ou "vetor de expressão" significa um constructo capaz de expressão *in vivo* ou *in vitro*. No contexto da presente invenção, esses constructos podem ser usados para introduzir genes que codificam enzimas em células hospedeiras. Adequadamente, os genes cuja expressão é introduzida podem ser referidos como "transgenes expressíveis".

Preferivelmente, o vetor de expressão é incorporado no genoma de um organismo hospedeiro adequado. O termo "incorporado" preferivelmente cobre a incorporação estável no genoma.

As seqüências de nucleotídeos aqui descritas incluindo a seqüência de nucleotídeos da presente invenção podem estar presentes em um vetor no qual a seqüência de nucleotídeos é operativamente ligada a seqüências regulatórias capazes de proporcionar a expressão da seqüência de nucleotídeos por um organismo hospedeiro adequado.

Os vetores para uso na presente invenção podem ser transformados em uma célula hospedeira adequada conforme descrito abaixo para proporcionar a expressão de um

polipeptídeo da presente invenção.

A escolha do vetor, por exemplo, um plasmídeo, cosmídeo ou vetor fago irá geralmente depender na célula hospedeira na qual ele é para ser introduzido.

Os vetores para uso na presente invenção podem conter um ou mais genes marcadores selecionáveis – tais como um gene, o qual confere resistência a antibióticos – por exemplo, resistência a ampicilina, canamicina, cloranfenicol ou tetraciclina. Alternativamente, a seleção pode ser conseguida pela co-transformação (conforme descrito na WO91/17243).

Vetores podem ser usados *in vitro*, por exemplo, para a produção de RNA ou usado para transfectar, transformar, transduzir ou infectar uma célula hospedeira.

Assim, em uma outra modalidade, a invenção proporciona um método para fazer seqüências de nucleotídeos da presente invenção pela introdução de uma seqüência de nucleotídeos da presente invenção em um vetor replicável, introduzindo o vetor em uma célula hospedeira compatível, e crescendo a célula hospedeira sob condições as quais efetuam a replicação do vetor.

O vetor pode compreender ainda uma seqüência de nucleotídeos que capacita que o vetor replique na célula hospedeira em questão. Exemplos de tais seqüências são as

origens de replicação dos plasmídeos pUC19, pACYC177, pUBllO, pE194, pAMBl, pTZ12 e pETl l.

SEQÜÊNCIAS REGULATÓRIAS

Em algumas aplicações, a seqüência de nucleotídeos para uso na presente invenção é operativamente ligada a uma seqüência regulatória a qual é capaz de fornecer para a expressão da seqüência de nucleotídeos, tal como pela escolha da célula hospedeira. A título de exemplo, a presente invenção cobre um vetor compreendendo a seqüência de nucleotídeos da presente invenção operativamente ligada a tal seqüência regulatória, isto é, o vetor é um vetor de expressão.

O termo "operativamente ligado" se refere à justaposição em que os componentes descritos estão em uma relação que permite que eles funcionem na sua forma pretendida. Uma seqüência regulatória "operativamente ligada" a uma seqüência codificadora está ligada de tal forma que a expressão da seqüência codificadora é alcançada sob condição compatível com as seqüências de controle.

O termo "seqüências regulatórias" inclui promotores e intensificadores e outros sinais de regulação de expressão.

O termo "promotor" é usado no sentido normal da técnica, por exemplo, um sítio de ligação da RNA polimerase.

A expressão intensificada da seqüência de nucleotídeos que codifica a enzima da presente invenção pode também ser alcançada pela seleção de regiões regulatórias heterólogas, por exemplo, promotor, seqüência líder e regiões de terminação.

Preferivelmente, a seqüência de nucleotídeos de acordo com a presente invenção é operativamente ligada a pelo menos um promotor.

Exemplos de promotores adequados para direcionar a transcrição da seqüência de nucleotídeos em um hospedeiro bacteriano, fúngico ou de levedura são bem conhecidos na técnica.

CONSTRUCTOS

O termo "constructo" – o qual é sinônimo com termos tais como "conjugado", "cassete" e "híbrido" – inclui uma seqüência de nucleotídeos para uso de acordo com a presente invenção diretamente ou indiretamente ligada a um promotor.

Um exemplo de uma ligação indireta é o fornecimento de um grupo espaçador adequado, tal como uma seqüência de íntrons, tal como o íntron Sh1- ou o íntron ADH, intermediário do promotor e da seqüência de nucleotídeos da presente invenção. O mesmo é verdade para o termo "fundido" em relação a presente invenção, o qual inclui a ligação direta ou indireta. Em alguns casos, os termos não cobrem a

combinação natural da seqüência de nucleotídeos que codificam a proteína normalmente associada com o promotor do gene de tipo selvagem e quando eles estão ambos no seu ambiente natural.

O constructo pode mesmo conter ou expressar um marcador, o qual permite a seleção do constructo genético.

Para algumas aplicações, preferivelmente o constructo da presente invenção compreende pelo menos a seqüência de nucleotídeos da presente invenção operativamente ligado a um promotor.

CÉLULAS HOSPEDEIRAS

O termo "célula hospedeira" – em relação á presente invenção, inclui qualquer célula que compreende a seqüência de nucleotídeos ou um vetor de expressão conforme descrito acima e o qual é usado na produção recombinante de uma enzima com as propriedades específicas conforme aqui definidas ou nos métodos da presente invenção.

Assim, uma outra modalidade da presente invenção fornece células hospedeiras transformadas ou transfectadas com uma seqüência de nucleotídeos que expressa as enzimas descritas na presente invenção. As células serão escolhidas por serem compatíveis com o referido vetor e podem, por exemplo, ser células procarióticas (por exemplo, bacterianas), fúngicas, de leveduras ou vegetais.

Preferivelmente, as células hospedeiras não são células humanas.

Exemplos de organismos hospedeiros bacterianos são espécies de bactérias gram positivas ou gram negativas.

Em uma modalidade preferida, a célula hospedeira é a *Escherichia coli* uma vez que foi observado que a fitase da *Buttiauxella* P1-29 é eficientemente secretada na *E. coli*. Enzimas fitases, incluindo variantes, foram caracterizadas depois da expressão heteróloga em um ou mais dos seguintes hospedeiros de expressão: *Escherichia coli K12; Bacillus subtilis; Saccharomyces cerevisiae.* Esses hospedeiros são, portanto, também preferidos.

Dependendo da natureza da seqüência de nucleotídeos que codificam a enzima da presente invenção, e/ou do desejo para o processamento adicional da proteína expressa, os hospedeiros eucarióticos, tais como leveduras ou outros fungos podem ser preferidos. Em geral, as células de levedura são preferidas em relação às células fúngicas porque elas são mais fáceis de manipular. Entretanto, algumas proteínas são ou pobremente secretadas das células de levedura ou, em alguns casos, não são processadas propriamente (por exemplo, hiperglicosilação em leveduras). Nesses exemplos, um organismo hospedeiro fúngico diferente deve ser selecionado.

O uso de células hospedeiras adequadas - tais como células hospedeiras de levedura, fungo e vegetais – podem proporcionar modificações pós-traducionais (por exemplo, miristoilação, glicosilação, mutilação, lapidação e fosforilação de tirosina, serina ou treonina) conforme pode ser necessário para conferir atividade biológica ótima nos produtos de expressão recombinantes da presente invenção.

A célula hospedeira pode ser uma protease deficiente ou uma protease sem filamento.

O genótipo da célula hospedeira pode ser modificado para melhorar a expressão.

Exemplos de modificações de células hospedeiras incluem deficiência de protease, suplementação de RNAts raros e modificação do potencial redutor no citoplasma para aumentar a formação de ligações dissulfeto.

Por exemplo, a célula hospedeira *E. coli* pode super expressar RNAts raros para melhorar a expressão de proteínas heterólogas conforme exemplificado/descrito em Kane (Curr Opin Biotechnol (1995), **6**, 494-500 "Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in E. coli"). A célula hospedeira pode ser deficiente em uma variedade de enzimas redutoras, favorecendo dessa forma a formação de ligações dissulfeto estáveis conforme exemplificado/descrito em Bessette (Proc

Natl Acad Sci USA (1999), **96**, 13703-13708 "Efficient folding of proteins with multiple disulphide bonds in the Escherichia coli cytoplasm").

Em uma modalidade, as células hospedeiras no contexto da presente invenção incluem aquelas células que podem ser adicionadas diretamente na ração animal.

ORGANISMO

O termo "organismo" em relação à presente invenção inclui qualquer organismo que poderia compreender a seqüência de nucleotídeos que codifica para as enzimas conforme descrito na presente invenção e/ou nos produtos obtidos a partir dela, e/ou em que um promotor pode permitir a expressão da seqüência de nucleotídeos de acordo com a presente invenção quando presente no organismo.

Organismos adequados podem incluir um procarioto, um fungo, uma levedura ou uma planta.

O termo "organismo transgênico" em relação à presente invenção inclui qualquer organismo que compreende a seqüência de nucleotídeos que codifica as enzimas conforme descritas na presente invenção e/ou os produtos obtidos a partir daí, e/ou em que um promotor pode permitir a expressão da seqüência de nucleotídeos de acordo com a presente invenção no organismo. Preferivelmente, a seqüência de nucleotídeos é incorporada no genoma do

organismo.

O termo "organismo transgênico" não cobre seqüências codificadoras de nucleotídeos naturais no seu ambiente natural quando eles estão sob o controle do seu promotor natural, o qual também está no seu ambiente natural.

Portanto, o organismo transgênico da presente invenção inclui um organismo compreendendo qualquer um de, ou combinações da seqüência de nucleotídeos que codificam as enzimas conforme descritas na presente invenção, constructos de acordo com a presente invenção, vetores de acordo com a presente invenção, plasmídeos de acordo com a presente invenção, células de acordo com a presente invenção, tecidos de acordo com a presente invenção ou seus produtos.

Por exemplo, o organismo transgênico pode também compreender a seqüência de nucleotídeos que codifica a enzima da presente invenção sob o controle de um promotor heterólogo.

TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS/ORGANISMO HOSPEDEIRO

Conforme indicado anteriormente, o organismo hospedeiro pode ser um organismo procariótico ou eucariótico. Exemplos de hospedeiros procarióticos adequados incluem *E. coli* e *Bacillus subtilis*.

Ensinamentos sobre a transformação de hospedeiros

procarióticos é bem documentada na técnica, por exemplo, ver Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edição, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Outros métodos adequados são estabelecidos nos exemplos aqui. Se um hospedeiro procariótico for usado, então a seqüência de nucleotídeos pode precisar ser adequadamente modificada antes da transformação – tal como pela remoção dos íntrons.

Células de fungos filamentosos podem ser transformadas usando vários métodos conhecidos na técnica – tal como um processo envolvendo a formação de protoplasto e a transformação dos protoplastos seguida pela regeneração da parede celular de uma maneira conhecida. O uso dos *Aspergillus* como um microrganismo hospedeiro é descrito na EP 0 238 023.

Outro organismo hospedeiro pode ser uma planta. Uma revisão das técnicas gerais usadas para transformar plantas pode ser encontrada nos artigos de Potrykus Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [1991] 42:205-225) e Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech Março/Abril 1994 17-27). Outros ensinamentos na transformação de plantas podem ser encontrados na EP-A-0449375.

Ensinamentos gerais sobre a transformação de fungos, leveduras e plantas estão apresentados nas seguintes

seções.

FUNGOS TRANSFORMADOS

Um organismo hospedeiro pode ser um fungo – tal como um fungo filamentoso. Exemplos de tais hospedeiros adequados incluem qualquer membro pertencendo aos gêneros *Thermomyces*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Trichoderma* e semelhantes.

Ensinamentos sobre a transformação de fungos filamentosos são revistos na US-A-5741665, o qual estabelece que técnicas padrões para a transformação de fungos filamentosos e para o cultivo dos fungos são bem conhecidos na técnica. Uma revisão extensiva das técnicas conforme aplicadas ao *N. crassa* é encontrada, por exemplo, em Davis e de Serres, Methods Enzymol (1971) **17A**: 79-143.

Outros ensinamentos na transformação de fungos filamentosos são revistos na US-A-5674707.

Em um aspecto, o organismo hospedeiro pode ser do gênero *Aspergillus*, tal como *Aspergillus niger*.

Um *Aspergillus* transgênico de acordo com a presente invenção também pode ser preparado seguindo, por exemplo, os ensinamentos de Turner G. 1994 (Vectors for genetic manipulation. In: Martinelli S. D., Kinghorn J.R. (Editors) Aspergillus: 50 years on. Progress in industrial microbiology vol 29. Elsevier Amsterdã 1994. pp. 641-666).

A expressão de genes em fungos filamentosos pode ser revista em Punt et al. (2002) Trends Biotechnol 2002 May;20(5):200-6, Archer & Peberdy Crit Rev Biotechnol (1997) 17(4):273-306.

LEVEDURA TRANSFORMADA

Em outra modalidade, o organismo transgênico pode ser uma levedura.

Uma revisão dos princípios da expressão de genes heterólogos em leveduras é fornecida em, por exemplo, Methods Mol Biol (1995), 49:341-54, e *Curr Opin Biotechnol* (1997) Oct;8(5):554-60.

Sob esse aspecto, leveduras – tais como as espécies *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia pastoris* (ver FEMS Microbiol Rev (2000 24(l):45-66) podem ser usadas como um veículo para a expressão de genes heterólogos.

Uma revisão dos princípios da expressão de genes heterólogos em *Saccharomyces cerevisiae* e da secreção dos produtos gênicos é dada por E Hinchcliffe E Kenny (1993, "Yeast as a 1480 vehicle for the expression of heterologous genes", Yeasts, Vol **5**, Anthony H Rose and J Stuart Harrison, eds, 2ª edição, Academic Press Ltd.).

Para a transformação de leveduras, vários protocolos de transformação foram desenvolvidos. Por exemplo, uma *Saccharomyces* transgênica de acordo com a presente invenção

pode ser preparada seguindo os ensinamentos de Hinnen et ah, (1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **75**, 1929); Beggs, J D (1978, *Nature*, London, **275**, 104); e Ito, H et al (1983, *J Bacteriology* **153**, 163-168).

As células de leveduras transformadas podem ser selecionadas usando vários marcadores seletivos – tais como marcadores de resistência a antibióticos dominantes marcadores auxotróficos.

PLANTAS/CÉLULAS VEGETAIS TRANSFORMADAS

Um organismo hospedeiro adequado para a presente invenção pode ser uma planta. Uma revisão das técnicas gerais pode ser encontrada em artigos de Potrykus (*Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* [1991] **42**:205-225) e Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech Março/Abril de 1994 17-27).

CULTIVO E PRODUÇÃO

Células hospedeiras transformadas com a seqüência de nucleotídeos da presente invenção podem ser cultivadas sob condições conducentes para a produção da enzima codificada e as quais facilitam a recuperação da enzima a partir das células e/ou do meio de cultura.

O meio usado para cultivar as células pode ser qualquer meio convencional adequado para o crescimento da célula hospedeira em questão e a obtenção da expressão da

enzima.

A proteína produzida por uma célula recombinante pode ser apresentada na superfície da célula.

A enzima pode ser secretada a partir das células hospedeiras e pode ser convenientemente recuperada a partir do meio de cultura usando procedimentos bem conhecidos.

SECREÇÃO

Pode ser desejável para a enzima ser secretada a partir da expressão do hospedeiro no meio de cultura a partir de onde a enzima pode ser mais facilmente recuperada. De acordo com a presente invenção, a seqüência líder da secreção pode ser selecionada com base no hospedeiro de expressão desejado. Seqüências de sinais híbridos podem também ser usadas no contexto da presente invenção.

Exemplos típicos de seqüências líderes de secreção heterólogas são aquelas que se originam do gene da amiloglicosidase (AG) fúngica (*gla*A – ambas as versões de 18 e 24 aminoácidos, por exemplo, de *Aspergillus*), o gene do fator a (leveduras, por exemplo *Saccharomyces, Kluyveromyces* e *Hansenula* ou o gene da α-amilase (*Bacillus*).

A título de exemplo, a secreção das proteínas heterólogas em *E. coli* é revisada em Methods Enzymol (1990)

182: 132-43.

DETECÇÃO

Uma variedade de protocolos para detectar e medir a expressão da seqüência de aminoácidos é conhecida na técnica. Exemplos incluem o ensaio de imunossorbência ligado à enzima (ELISA), o radioimunoensaio (RIA) e a escolha de células ativadas por fluorescência (FACS).

Uma ampla variedade de marcadores e de técnicas de conjugação é conhecida pelos indivíduos versados na técnica e pode ser usada em vários ensaios de aminoácidos e de ácidos nucléicos.

Uma variedade de companhias, tais como a Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI), e a US Biochemical Corp (Cleveland, OH) fornecem kits comerciais e protocolos para esses procedimentos.

Moléculas relatoras adequadas ou marcadores incluem aqueles agentes radionuclídeos, enzimas, fluorescentes, quimiluminescentes ou cromogênicos assim como substratos, cofatores, inibidores, partículas magnéticas e semelhantes. Patentes que ensinam o uso de tais marcadores incluem a US-A-3.817.837; US-A-3.850.752; US-A-3.939.350; US-A-3.996.345; US-A-4.277.437; US-A-4.275.149 e a US-A-4.366.241.

Também, as imunoglobulinas recombinantes podem ser

produzidas conforme mostrado na US-A-4.816.567.

Outros ensaios adequados para detectar a atividade da fitase são conhecidos na técnica e aqui exemplificados.

PROTEÍNAS DE FUSÃO

A seqüência de aminoácidos de acordo com a presente invenção pode ser produzida como uma proteína de fusão, por exemplo, para ajudar na extração e purificação. Exemplos de parceiros da proteína de fusão incluem a glutationa-S-transferase (GST), 6xHis, GAL4 (domínios de ativação transcricional e/ou de ligação a DNA) e (β-galactosidase). Também pode ser conveniente incluir um sítio de clivagem proteolítico entre o parceiro da proteína de fusão e a seqüência da proteína de interesse para permitir a remoção das seqüências da proteína de fusão.

Preferivelmente, a proteína de fusão não irá impedir a atividade da seqüência de proteína.

Os sistemas de expressão de fusão do gene na *E. coli* foram revistos em *Curr Opin Biotechnol* (1995) 6(5):501-6.

Em outra modalidade da invenção, a seqüência de aminoácidos pode estar ligada a uma seqüência heteróloga para codificar uma proteína de fusão. Por exemplo, para testar as bibliotecas de peptídeos para agentes capazes de afetar a atividade da substância, pode ser útil codificar uma substância quimérica expressando um epítopo heterólogo

que é reconhecido por um anticorpo comercialmente disponível.

SEQÜÊNCIAS ADICIONAIS

As seqüências para uso de acordo com a presente invenção podem ser usadas juntamente com uma ou mais proteínas adicionais de interesse (POIs) ou seqüências de nucleotídeos de interesse (NOIs).

Exemplos não-limitantes de POIs incluem: xilanase, lipases, fosfatases ácidas e/ou outros. Esses incluem enzimas que, por exemplo, modulam a viscosidade da ração. O NOI pode mesmo ser uma seqüência anti-sentido para qualquer uma daquelas seqüências.

O POI pode mesmo ser uma proteína de fusão, por exemplo, para ajudar na extração e na purificação ou para aumentar o metabolismo do fitato *in vivo*.

O POI pode mesmo estar fundido a uma seqüência de secreção.

Outras seqüências podem também facilitar a secreção ou o aumento do rendimento do POI secretado. Tais seqüências poderiam codificar para proteínas de chaperona como, por exemplo, o produto do gene *Aspergillus niger cyp B* descrito no pedido de patente do RU 9821198.0.

O NOI que codifica para o POI pode ser projetado para alterar a sua atividade por uma variedade de razões,

incluindo, mas sem se limitar a alterações, as quais modificam o processamento e/ou a expressão do seu produto de expressão. A título de outro exemplo, o NOI também pode ser modificado para otimizar a expressão em uma célula hospedeira particular. Outras alterações de seqüências podem ser desejadas para introduzir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição.

O NOI que codifica o POI pode incluir nos seus nucleotídeos sintéticos ou modificados – tais como as estruturas de metilfosfonato e de fosforotioato.

O NOI que codifica o POI pode ser modificado para aumentar a estabilidade intracelular e a meia-vida. Modificações possíveis incluem, mas não estão limitadas, à adição de seqüências flanqueadoras dos terminais 5’ e/ou 3’ da molécula ou o uso de fosforotioato ou 2’ O-metil ao invés de ligações de fosforodiesterase na estrutura da molécula.

ANTICORPOS

Um aspecto da presente invenção se refere aos aminoácidos que são imunologicamente reativos com o aminoácido da SEQ ID NO: 3.

Anticorpos podem ser produzidos por técnicas padronizadas, tais como pela imunização com a substância da invenção ou pelo uso de uma biblioteca de exibição de fago.

Para os propósitos dessa invenção, o termo "anticorpo", a não ser que seja especificado ao contrário, inclui, mas não está limitado a policlonais, monoclonais, quiméricos, de cadeia única, fragmentos de Fab, fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab, assim como seus miméticos. Tais fragmentos incluem fragmentos de anticorpos inteiros os quais retêm sua atividade de ligação para uma substância alvo, fragmentos Fv, F(ab') e $F(ab')_2$, assim como anticorpos de cadeia única (scFv), proteínas de fusão e outras proteínas sintéticas as quais compreendem o sítio de ligação a antígeno do anticorpo. Além disso, os anticorpos e seus fragmentos podem ser anticorpos humanizados. Anticorpos neutralizantes, isto é, anticorpos os quais inibem a atividade biológica dos polipeptídeos da substância, são especialmente preferidos para diagnósticos e terapêuticas.

Se forem desejados os anticorpos policlonais, um mamífero selecionado (por exemplo, camundongo, coelho, cabra, cavalo, etc.) é imunizado com a seqüência da presente invenção (ou uma seqüência compreendendo um epítopo imunológico seu). Dependendo da espécie de hospedeiro, vários adjuvantes podem ser usados para aumentar a resposta imunológica.

Soro do animal imunizado é coletado e tratado de

acordo com procedimentos conhecidos. Se o soro contendo anticorpos policlonais à seqüência da presente invenção (ou uma seqüência compreendendo um epítopo imunológico seu) contiver anticorpos para outros antígenos, os anticorpos policlonais podem ser purificados por cromatografia de imunoafinidade. Técnicas para produzir e processar antissoros policlonais são conhecidas na técnica. Para que tais anticorpos possam ser feitos, a invenção também fornece polipeptídeos da invenção ou seus fragmentos haptenizados para outro polipeptídeo para uso como imunógenos em animais ou humanos.

Anticorpos monoclonais direcionados contra a seqüência da presente invenção (ou uma seqüência compreendendo um epítopo imunológico seu) também podem ser prontamente produzidos por um indivíduo versado na técnica e incluir, mas sem estar limitados, à técnica do hibridoma de Koehler e Milstein (1975 *Nature* **256:** 495-497), a técnica do hibridoma de células B humanas (Kosbor et al, (1983) *Immunol Today* **4**:72; Cote et al, (1983) *Proc Natl Acad Sci* **80**:2026-2030) e a técnica do hibridoma EBV (Cole et al, (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan Rickman Liss Inc, pp 77-96).

Além disso, técnicas desenvolvidas para a produção de "anticorpos quiméricos", a união de genes de anticorpos de

camundongos a genes de anticorpos humanos para obter uma molécula com especificidade de antígeno apropriada e atividade biológica pode ser usada (Morrison et al, (1984) *Proc Natl Acad Sci* **81:** 6851-6855; Neuberger et al, (1984) *Nature* **312:**604-608; Takeda et al, (1985) *Nature* **314:** 452-454).

Alternativamente, técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia única (Patente Americana No. 4.946.779) podem ser adaptadas para produzir a substância específica de anticorpos de cadeia única.

Fragmentos de anticorpos os quais contêm sítios de ligação específicos para a substância também podem ser gerados. Por exemplo, tais fragmentos incluem, mas não estão limitados, aos fragmentos $F(ab')_2$ os quais podem ser produzidos pela digestão da pepsina da molécula do anticorpo e os fragmentos Fab os quais podem ser gerados pela redução das pontes dissulfeto dos fragmentos $F(ab')_2$. Alternativamente, as bibliotecas de expressão de Fab podem ser construídas para permitir a identificação rápida e fácil de fragmentos Fab monoclonais com a especificidade desejada (Huse WD et al, (1989) *Science* **256:** 1275-1281).

APLICAÇÃO EM LARGA ESCALA

Em uma modalidade preferida da presente invenção, a seqüência de aminoácidos que codifica uma fitase derivada

de *C. freundii* ou os métodos da presente invenção são usados para aplicações em larga escala. Particularmente, os métodos da presente invenção podem ser usados para a produção em larga escala de fitases para uso industrial como aditivos/suplementos para composições de alimentos ou de rações.

Preferivelmente, a seqüência de aminoácidos é produzida em uma quantidade de 5g por litro até cerca de 10g por litro do volume de cultura celular total depois do cultivo do organismo hospedeiro.

Preferivelmente, a seqüência de aminoácidos é produzida em uma quantidade de 100mg por litro até cerca de 900mg por litro do volume de cultura de células total depois do cultivo do organismo hospedeiro.

Preferivelmente, a seqüência de aminoácidos é produzida em uma quantidade de 250mg por litro até cerca de 500mg por litro do volume de cultura de células total depois do cultivo do organismo hospedeiro.

USO DE FITASES

Conforme estabelecido acima, a presente invenção também se refere à produção de fitases conforme aqui descritas.

Particularmente, a presente invenção também se refere ao uso das seqüências de aminoácidos conforme aqui revelado

na produção de compostos de fosfato orgânicos e inorgânicos.

Assim, a presente invenção se refere ainda ao uso de seqüências de nucleotídeos que codificam fitases na geração de vetores ou sistemas de expressão para a expressão das fitases.

Além disso, a presente invenção se refere ao uso de tais vetores de expressão ou sistemas na geração de células hospedeiras as quais expressam fitases.

A invenção se refere ainda ao uso de células hospedeiras modificadas na geração de precursores de compostos de fosfato orgânicos e inorgânicos ou na geração de compostos de fosfato orgânico específicos.

Compostos de fosfato orgânico e inorgânico adequados incluem pentaquis-, tetraquis-, tris-, bis- e monofosfatos de mioinositol.

Adequadamente, a invenção fornece dessa forma um método de produção de um composto de fosfato orgânico compreendendo o tratamento de um fitato com uma fitase derivada de *Buttiauxella sp*. Preferivelmente, o método é caracterizado pelo fato de que a enzima compreende as seqüências de aminoácidos mostradas como SEQ ID NO: 3 ou uma seqüência com pelo menos 75% de identidade (homologia) a ela ou um fragmento efetivo, ou uma forma modificada sua.

Adequadamente, o fosfato orgânico é fitato ou todos os estereoisômeros dos di-, tri-, tetra- e pentafosfatos de mioinositol. Outros fosfatos orgânicos adequados incluem inositoltetrafosfatos e inositololigofosfatos. Em uma modalidade preferida, o método é um processo biotecnológico *in vivo*.

Tais métodos para a produção de um composto de fosfato orgânico podem compreender adequadamente os passos de:

a) fornecer uma célula hospedeira que compreende transgenes expressíveis compreendendo a fitase de *Buttiauxella sp.*;

b) o cultivo do organismo transgênico sob condições adequadas para a expressão do transgene; e

c) a recuperação do composto de fosfato orgânico a partir da cultura.

Os compostos podem ser usados para uma variedade de aplicações incluindo nos ensaios para a caracterização das fitases. Alguns inositol fosfatos estão envolvidos como moléculas sinalizadoras na regulação intracelular e podem ser usados produtos químicos de pesquisa.

Em outro aspecto é fornecido um método para a produção de alimentos ou de ração animal. A ração animal é tipicamente produzida em moinhos nos quais as matérias-primas são primeiramente moídas até um tamanho de partícula

adequado e, a seguir, misturadas com aditivos apropriados. A ração pode, a seguir, ser produzida como uma malha ou péletes; o último tipicamente envolve um método pelo qual a temperatura é elevada até um nível alvo e, a seguir, a ração é passada através de uma matriz para produzir péletes de um tamanho particular. Subseqüentemente, aditivos líquidos, tais como gordura e enzimas podem ser adicionados. Os péletes são deixados esfriar antes do transporte. A produção de ração animal pode também envolver uma etapa adicional que inclui a extrusão ou expansão antes da peletização.

Concordantemente, a invenção fornece ainda o uso de uma seqüência de aminoácidos que codifica uma fitase ou uma célula hospedeira expressando uma fitase para produzir uma fitase para uso na produção de um produto alimentício ou de ração. Em um aspecto, é fornecido o uso de uma seqüência de aminoácidos conforme aqui descrita na produção de um produto alimentício ou de ração. Em outro aspecto, é fornecido o uso de uma célula hospedeira de acordo com a invenção na produção de um produto alimentício ou de ração. Em outro aspecto, é fornecido o uso de um vetor ou sistema de expressão de acordo com a invenção na produção de um produto alimentício ou de ração.

A presente invenção também cobre o uso de enzimas como

um componente ou combinações de ração com outros componentes para distribuição a animais.

COMBINAÇÕES COM OUTROS COMPONENTES

As enzimas da presente invenção podem ser usadas juntamente com outros componentes ou veículos.

Veículos adequados para enzimas de ração incluem trigo (grossamente moído). Além disso, existe um número de técnicas de encapsulamento incluindo aqueles baseados na cobertura de gordura/cera, adição de gomas vegetais, etc.

Exemplos de outros componentes incluem um ou mais dentre: espessantes, agentes gelificantes, emulsificantes, ligantes, modificadores de cristais, adoçantes (incluindo adoçantes artificiais), modificadores de reologia, estabilizantes, antioxidantes, tinturas, enzimas, carreadores, veículos, excipientes, diluentes, agentes lubrificantes, agentes flavorizantes, material corante, agentes suspensores, desintegrantes, ligantes de granulação, etc. Esses outros componentes podem ser naturais. Esses outros componentes podem ser preparados pelo uso de técnicas químicas e/ou enzimáticas.

Conforme aqui utilizado, o termo “espessante ou agente gelificante”, conforme usado aqui, se refere a um produto que previne a separação pela redução ou prevenção do movimento de partículas, seja por gotas de líquidos

imiscíveis, ar ou sólidos insolúveis.

O termo “estabilizante”, conforme aqui utilizado, é definido como um ingrediente ou combinação de ingredientes que conserva um produto (por exemplo, um produto alimentício) de alterações no decorrer do tempo.

O termo “emulsificante”, conforme aqui utilizado, se refere a um ingrediente (por exemplo, um ingrediente de produto alimentício) que previne a separação de emulsões.

Conforme aqui utilizado, o termo “ligante” se refere a um ingrediente (por exemplo, um ingrediente alimentício) que se liga ao produto juntamente através de uma reação física ou química.

O termo “modificador de cristal”, conforme aqui utilizado, se refere a um ingrediente (por exemplo, a um ingrediente alimentício) que afeta a cristalização tanto da gordura quanto da água.

“Carreadores” ou “veículos” significam materiais adequados para a administração do composto e incluem qualquer tal material conhecido na técnica tal como, por exemplo, qualquer líquido, gel, solvente, diluente líquido, solubilizante ou semelhante, o qual é não-tóxico e o qual não interage com quaisquer componentes da composição de uma forma deletéria.

Exemplos de veículos nutricionalmente aceitáveis

incluem, por exemplo, grãos, água, soluções salinas, álcool, silicone, ceras, geléia de petróleo, óleos vegetais e semelhantes.

Exemplos de excipientes incluem um ou mais dentre: celulose microcristalina e outras celuloses, lactose, citrato de sódio, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio dibásico, glicina, amido, açúcar de leite e polietilenoglicóis de alto peso molecular.

Exemplos de desintegrantes incluem um ou mais dentre: amido (preferivelmente amido de milho, batata ou de tapioca), glicolato de amido sódico, croscamelose sódica e certos silicatos complexos.

Exemplos de ligantes de granulação incluem um ou mais dentre: polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), hidroxopropilcelulose (HPC), sacarose, maltose, gelatina e acácia.

Exemplos de agentes lubrificantes incluem um ou mais de: estearato de magnésio, ácido esteárico, gliceril behenato e talco.

Exemplos de diluentes incluem um ou mais de: água, etanol, propilenoglicol e glicerina, e suas combinações.

Os outros componentes podem ser usados simultaneamente (por exemplo, quando eles estão em mistura juntos ou mesmo quando eles são distribuídos a partir de diferentes vias)

ou seqüencialmente (por exemplo, eles podem ser distribuídos por diferentes vias).

Conforme aqui usado, o termo "componente adequado para o consumo animal ou humano" significa um composto o qual é ou pode ser adicionado à composição da presente invenção como um suplemento o qual pode ser de benefício nutricional, um substituto de fibra ou tem um efeito geralmente benéfico ao consumidor.

A título de exemplo, os componentes podem ser prebióticos tais como alginato, xantana, pectina, goma de alfarroba (LBG), inulina, goma guar, galactoligossacarídeo (GOS), frutoligossacarídeo (FOS), lactossacarose, oligossacarídeos de soja, palatinose, isomaltoligossacarídeos, glicoligossacarídeos e xiloligossacarídeos.

SUBSTÂNCIA ALIMENTÍCIA OU DE RAÇÃO

Os compostos podem ser usados como – ou no preparo de – uma substância alimentícia ou de ração. Aqui, o termo "alimento" é usado em um amplo sentido – e cobre produtos alimentícios e alimentos para humanos, assim como para animais (isto é, uma ração). O termo "ração" é usado com referência a produtos que são alimentos para animais nos fundos da criação. Em um aspecto preferido, o alimento ou ração é para o consumo de animais monogástricos tais como

porco, aves e peixe.

Os alimentos ou rações podem estar na forma de uma solução ou como um sólido – dependendo do uso e/ou do modo de aplicação e/ou do modo de administração.

INGREDIENTES E SUPLEMENTOS DE ALIMENTOS E RAÇÕES

Os compostos podem ser usados como ingredientes de alimentos ou de rações.

Conforme aqui utilizado, o termo "ingrediente de alimento ou ração" inclui uma formulação, a qual é ou pode ser adicionada a alimentos ou gêneros alimentícios e inclui formulações as quais podem ser usadas em baixos níveis em uma ampla variedade de produtos.

O ingrediente alimentício pode estar na forma de uma solução ou como um sólido – dependendo do uso e/ou do modo de aplicação e/ou do modo de administração.

Os compostos podem ser – ou podem ser adicionados – a suplementos alimentícios.

COMPOSIÇÕES DE ALIMENTOS E RAÇÕES

Composições de rações para animais monogástricos tipicamente incluem composições compreendendo produtos de plantas os quais contêm fitato. Tais composições incluem farinha de milho, farinha de soja, farinha de colza, farinha de semente de algodão, rações baseadas em milho, trigo, cevada e sorgo.

As fitases aqui descritas podem ser – ou podem ser adicionadas – a composições de alimentos ou de ração.

A presente invenção também fornece um método para o preparo de um alimento ou de ingrediente ou suplemento alimentício ou de ração, o método compreendendo a mistura de fitases produzidas pelo processo da presente invenção ou a composição de acordo com a presente invenção com outro ingrediente alimentício. O método para o preparo de um ingrediente alimentício também é outro aspecto da presente invenção. Métodos para preparar rações de animais são estabelecidos acima. A enzima pode ser adicionada na forma de uma formulação sólida, ou como um aditivo para rações, tal como uma pré-mistura. Uma forma sólida é tipicamente adicionada antes ou durante o passo de mistura; uma forma líquida é tipicamente adicionada depois do passo de peletização.

MEDICAMENTOS

As fitases da presente invenção também podem ser usadas em preparações farmacêuticas ou para a combinação em gêneros alimentícios para proporcionar algum efeito farmacêutico. Por exemplo, a EP 1.389.915 descreve o uso de uma fitase em um alimento ou bebida para aumentar a disponibilidade de cálcio, ferro e/ou zinco do alimento ou bebida em humanos.

Além disso, a EP 1.392.353 descreve um medicamento ou suplemento nutricional contendo fitase, o qual é útil para aumentar a biodisponibilidade de bioelementos, por exemplo, cálcio e ferro, e para combater doenças de deficiência.

Aqui, o termo "medicamento" é usado em um sentido amplo – e cobre medicamentos e/ou nutracêuticos para humanos, assim como para medicamentos e/ou nutracêuticos para animais (isto é, aplicações veterinárias). Em um aspecto preferido, o medicamento é para uso humano e/ou para criação animal.

O medicamento pode ser para propósitos terapêuticos – os quais podem ser curativos ou paliativos ou preventivos na natureza. O medicamento pode mesmo ser para propósitos de diagnóstico.

Quando usado como – ou na preparação de – um medicamento, o produto e/ou os compostos da presente invenção podem ser usados juntamente com um ou mais de: um veículo farmaceuticamente aceitável, um diluente farmaceuticamente aceitável, um excipiente farmaceuticamente aceitável, um adjuvante farmaceuticamente aceitável, um ingrediente farmaceuticamente aceitável.

O medicamento pode estar na forma de uma solução ou como um sólido – dependendo do uso e/ou do modo de aplicação e/ou do modo de administração.

INGREDIENTE FARMACÊUTICO

O produto e/ou os compostos da presente invenção podem ser usados como ingredientes farmacêuticos. Aqui, o produto e/ou a composição da presente invenção pode ser o componente ativo sozinho ou ele pode ser pelo menos um dentre uma variedade (isto é, 2 ou mais) de componentes ativos.

O ingrediente farmacêutico pode estar na forma de uma solução ou como um sólido – dependendo do uso e/ou do modo de aplicação e/ou do modo de administração.

O ingrediente farmacêutico pode estar na forma de um produto efervescente para melhorar as propriedades de dissolução do medicamento.

FORMAS

O produto e/ou os compostos da presente invenção podem ser usados em qualquer forma adequada – quer quando sozinhos ou quando presentes em uma composição. Da mesma forma, fitases produzidas de acordo com a presente invenção (isto é, ingredientes – tais como ingredientes alimentícios, ingredientes de alimentos funcionais ou ingredientes farmacêuticos) podem ser usados em qualquer forma adequada.

Exemplos adequados de formas incluem uma ou mais dentre: comprimidos, pílulas, cápsulas, óvulos, soluções ou

suspensões, as quais podem conter agentes flavorizantes ou corantes, para aplicações de liberação imediata, retardada, modificada, sustentada, pulsátil ou controlada.

A título de exemplo, se o produto e/ou a composição são usados na forma de comprimido – tais como para uso como ingrediente funcional – os comprimidos também podem conter um ou mais dentre: excipientes, desintegrantes, ligantes de granulação ou agentes lubrificantes.

Exemplos de veículos nutricionalmente aceitáveis para uso no preparo das formas incluem, por exemplo, água, soluções salinas, álcool, silicone, ceras, geléia de petróleo e semelhantes.

Excipientes preferidos para as formas incluem lactose, amido, uma celulose, açúcar de amido ou polietilenoglicóis de alto peso molecular.

Para suspensões aquosas e/ou elixires, compostos de clivagem de carotenóides podem ser combinados com vários agentes adoçantes ou flavorizantes, materiais corantes ou tintas, com agentes emulsificantes e/ou suspensores e com diluentes tais como água, etanol, propilenoglicol e glicerina, e suas combinações.

As formas também podem incluir cápsulas de gelatina; cápsulas de fibra, comprimidos de fibra, etc.

TÉCNICAS DE METODOLOGIA DE DNA RECOMBINANTE GERAIS

A presente invenção emprega, a não ser que seja indicado de outra forma, técnicas convencionais de química, biologia molecular, microbiologia, DNA recombinante e imunologia, as quais estão dentro das capacidades de uma pessoa normalmente versada na técnica. Tais técnicas são explicadas na literatura. Ver, por exemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edição, livros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 1960 and periodic supplements; *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 9, 13, e 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, e A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, M Press; and, D.M.J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: 1965 Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press. Cada um desses textos gerais é aqui incorporado por referência.

EXEMPLOS

A invenção é agora ainda ilustrada nos seguintes exemplos não-limitativos.

Exemplo 1: ensaio da atividade da fitase.

Micro-l = microlitro.

Ensaios de fitase são geralmente executados em placas de microtitulação. A mistura reacional (100 μL) continha: fitato 2mM e $CaCl_2$ 0,8mM em tampão de acetato de sódio 200mM, pH 3,5. A reação foi deixada proceder por 1h a 37°C, depois do tempo o qual o fosfato liberado foi medido por uma modificação de um procedimento conhecido (Heinonen J.K., Lahti RJ. Anal Biochem. 113 (2), 313-317 (1981)). Resumidamente, 200 μL de uma solução de AMM recentemente preparada (H_2SO_4 7,5 N, molibdato de amônio 15mM e acetona – 1:1:2) foi adicionada a 100 μL da mistura reacional em cada poço da placa de microtitulação. A absorvância a 390nm foi medida não antes do que 10 min e não depois do que 30 min depois da adição do reagente AMM. A quantidade de fosfato foi determinada pela construção de uma curva de calibração com soluções de fosfato de concentrações conhecidas. Para avaliar a atividade da fitase em diferentes valores de pH, os seguintes tampões (todos 200mM) foram usados: glicina/HCl entre pH 2,0 e 3,0, acetato de sódio/ácido acético entre pH 3,5 e 5,5, Tris/ácido maléico entre pH 6,0 e 7,5.

Exemplo 2: Cepa P1-29 produtora de fitase.

A cepa bacteriana P1-29 foi originalmente isolada a partir de uma massa de folhas decadentes coletadas de um

lamaçal em uma floresta úmida no sul da Finlândia. A cepa pode ser aerobicamente cultivada a 30°C em muitos meios de cultura simples, por exemplo, LB (peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,4) ou em meio pobre em fosfato PP1 (peptona 1%, extrato de carne 1%, extrato de levedura 0,5%, $CaCl_2$ 0,2 M. O meio é ajustado para pH 11 com NaOH e entra em ebulição por 10 min. O precipitado é removido por filtração, tem o pH reajustado para 5,5 e o meio é esterilizado por autoclavação por 15 min a 121°C.

Depois do crescimento em meio PP1 líquido, descobriu-se que a cepa foi exibe atividade para a fitase tanto em pH 3,5 e 5,5 (ensaiado conforme descrito no Exemplo 1). A proporção de atividades em 3,5 e 5,5 foi de cerca de 1,3. A atividade também foi medida separadamente nas células e no sobrenadante da cultura de P3-42. De acordo com essas medidas, a maior parte de toda a atividade da fitase foi ligada a célula com 10-20% de atividade encontrada no sobrenadante do meio de cultura.

A cepa foi depositada com NCIMB sob o número de acesso No. 41248.

Exemplo 3. Isolamento de DNA cromossomal da cepa P1-29.

DNA cromossomal foi preparado essencialmente pelo procedimento padrão (Ausubel et al., *Current Protocols in*

Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1996). 250mL de cultura que cresceu de um dia para o outro a 30°C em meio LB foi centrifugado a 10.000rpm por 30 min, lavados em 20mL de tris-HCl 50mM, EDTA 5mM pH 8 e ressuspensa em 10mL de TES gelado (tris-HCl 50mM, EDTA 5mM, glicose 15% pH 8). A lisozima foi adicionada para 10mg/mL, e a suspensão celular foi incubada a 37°C por 30-60 min até ocorrer a lise, averiguado por diluição de 100 μL da mistura reacional em 1mL de SDS 1% e pela verificação de uma consistência "viscosa". Nesse momento, SDS e a proteinase K (Sigma) foram adicionados até uma concentração final de 1% e 0,5mg/mL, respectivamente. A mistura reacional foi incubada por 30 min a 56°C seguido pela adição de 2mL de NaCl 5 M e 1,4mL de brometo de cetiltrimetilamônio 10% (Sigma). A incubação continuou por 15 min a 65°C. A solução foi extraída uma vez com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e uma vez com fenol/clorofórmio. Depois das extrações, a fase aquosa foi misturada com 0,6 vol de isopropanol, o precipitado de DNA foi coletado por centrifugação (10.000rpm, 15 min), lavado com etanol 70%, seco a vácuo e ressuspenso em 2mL de tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH 8, 5 μg/mL. RNAse.

Exemplo 4. Identificação taxonômica da cepa bacteriana

P1-29.

Um fragmento do gene de RNAr 16S da cepa P1-29 foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com a *Taq* DNA polimerase (Roche) usando os iniciadores: 536f (CAGCMGCCGCGGTAATWC) e 1392r (ACGGGCGGTGTGTRC), (Lane, D. J. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Stackbrandt, E. and Goodfellow, M. eds, John Wiley & Sons, Nova Iorque: pp 115-117 (1991)). O seguinte programa foi usado: 1) etapa inicial de desnaturação de DNA de 5 min a 95°C; 2) 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C; 3) uma etapa de extensão final de 70°C por 10 min. Os produtos de PCR, aproximadamente 900 pares de base de comprimento, foram purificados por eletroforese em um gel de agarose a 0,8% e extraídos do gel usando um kit de purificação de Gel(Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram seqüenciados pela Medprobe (Noruega) como um serviço comercial. A área seqüenciada está listada como SEQ ID NO: 1. Essa seqüência foi comparada com as seqüências de DNA no banco de dados GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). O emparelhamento mais alto (688-689 de 691 nucleotídeos, 99,6-99,7%) foi encontrado com a seqüência do gene de RNA 16S de várias cepas de *Buttiauxella* tais como *B. izardii* DSM 9397, *B.*

gaviniae DSM 9393 e *B. noackiae* ATCC 51607T. Portanto, a cepa P1-29 pode ser taxonomicamente classificada como *Buttiauxella sp.*

Exemplo 5. Clonagem do gene da fitase da *Buttiauxella* P1-29.

DNA cromossomal da *Buttiauxella sp.* P1-29 foi parcialmente digerido com a endonuclease de restrição *Sau*3A e o digerido fracionado em gel de agarose a 1%. Os fragmentos de DNA de 3 a 5 Kb foram isolados do gel usando um kit de purificação de gel (Qiagen) e ligados com braços de λ-ZAP desfosforilados digeridos de *Bam*H1 (Stratagene). As etapas subseqüentes para a construção de bibliotecas seguiram as instruções do kit de clonagem ZAP Express Predigested Vector/Gigapack da Stratagene. O fago da biblioteca foi convertido na forma de plasmídeo pelo procedimento de "excisão de massa" conforme descrito pelo fabricante (Stratagene). A varredura da biblioteca de plasmídeo foi feita similarmente pelos métodos anteriormente publicados para a detecção da atividade da fitase em placas de Petri (Howson e Davis. Enzyme Microb. Technol. 5, 377-382 (1983); Chen J.C. Biotechnology techniques 12 (10) 751-761 (1998); Riccio MX. et al, J. Appl. Microbiol. 82, 177-185 (1997)). Vários clones positivos para a fitase foram isolados e purificados por

subclonagem. Esses isolados cresceram em cultura líquida (meio LB a 30°C e 200rpm por cerca de 24h) e a atividade da fitase foi medida (Exemplo 1) na suspensão de células resultante. Um clone que tinha a mais alta atividade da fitase (cerca de 1,2U/mL em pH 3,5) foi selecionado para a subseqüente caracterização. O DNA de plasmídeo foi isolado desse clone, nomeado de pBK(P1-29) e caracterizado pelo seqüenciamento de DNA parcial da inserção de DNA (serviço de seqüenciamento foi obtido da Medprobe (Noruega). Essa seqüência compreendendo o gene da fitase está listada como a SEQ ID NO: 2. A seqüência de aminoácidos deduzida da fitase de *Buttiauxella sp.* P1-29 está listada como SEQ ID NO: 3. A comparação da SEQ ID NO: 3 com as seqüências no GenBank usando o serviço BLAST fornecido pelo NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) identifica a fitase da *Obesumbacterium proteus* (número de acesso GenBank AAQ90419) como o homólogo mais próximo da fitase P1-29 da *Buttiauxella sp.* Entretanto, o nível de homologia é baixo – somente cerca de 74% de resíduos de aminoácidos são idênticos em ambas as proteínas.

Exemplo 6. Amplificação e expressão do gene da fitase de *Buttiauxella sp.* P1-29.

O gene da fitase foi amplificado por PCR. O DNA cromossômico da cepa de P1-29 de *Buttiauxella sp.* foi usado

como molde e oligonucleotídeos o29-5 (GGAATTCATATGACGATCTCTGCGTTTAAC) e o29-3 (GGAATTCGGATCCTTA-CTGTAGCTGGCAGCCTG) como iniciadores. A amplificação foi executada usando o kit de sistema de PCR de alta fidelidade de ampliação (Roche). O seguinte programa foi usado: 1) desnaturação de DNA inicial por 3 min a 94°C; 2) 35 ciclos de 45seg a 94°C, 45seg a 55°C, 1 min a 68°C, 1 min a 72°C, 1 min a 74°C; 3) um passo de extensão final de 10 min a 72°C. O produto de PCR resultante foi purificado por eletroforese em um gel de agarose a 0,8%, seguido por extração de DNA a partir do gel usando um kit de purificação de Gel (Qiagen). O produto de PCR purificados foi digerido com as enzimas de restrição *Nde*I e BamHI e isolado da mistura reacional pelo kit de purificação de PCR (Qiagen). O plasmídeo de vetor pET11a (Novagen) foi digerido com as endonucleases de restrição *Nde*I e *Bam*HI, desforsforilados usando a fosfatase alcalina de camarão (Roche) e purificado por eletroforese em um gel de agarose 0,8%. A banda de DNA de plasmídeo linearizado foi cortado do gel e purificado usando um kit de purificação de gel (Qiagen). Os dois fragmentos de DNA purificados foram ligados usando a DNA ligase T4 (Roche). A reação de ligação foi precipitada com etanol 70%, lavada com etanol e ressuspensa diretamente em 50 μL de células XL1-Blue MRF'

de *E. coli* eletrocompetentes. A suspensão foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,1cm (BioRad) e eletroporada usando um pulsador de gene Xcell (BioRad) ajustado para 1800 V, 25 μF e 200 Ω. Imediatamente depois da eletroporação, 1mL de meio LB foi adicionado, a suspensão celular foi transferida para um tubo plástico de 15mL (Falcon) e incubada a 37°C com agitação (200rpm) por 1 hora. As células transformadas foram plaqueadas em placas de LB contendo 100 μg/mL de ampicilina e incubadas de um dia para o outro a 37°C. 24 transformantes cresceram em cultura líquida e as culturas foram usadas para ensaiar a atividade da fitase e o isolamento do DNA de plasmídeo. Um clone produzindo a mais elevada atividade da fitase e gerando o padrão de restrição esperado do plasmídeo de DNA foi selecionado. O plasmídeo contido por esse clone, chamado de pET11 (P1-29) foi usado para transformar a cepa hospedeira de expressão BL21(DE3)pLysS (Novagen). A suspensão de células transformadas foi agitada por 1h a 37°C em LB contendo 2% de glicose e inoculada em 50mL de LB contendo ampicilina (100 μg/mL) e glicose (2%) e cresceu de um dia para o outro a 30°C com agitação (200rpm). A OD da cultura resultante foi medida a 600nm e a cultura foi usada para inocular 1L de LB + ampicilina (100 μg/mL) para uma

OD_{600} de 0,04. O crescimento continuou de um dia para o outro a 30°C. A atividade da fitase em tais culturas foi tipicamente 8–12 U/mL. Cerca de 40% da atividade da fitase foi secretada para o meio de cultura e o resto permaneceu associado com as células. Essas observações mostram que a fitase da *Buttiauxella* P1-29 é secretada na *E. coli* de alguma forma mais eficientemente do que no seu hospedeiro natural. A atividade na cultura de uma cepa de controle BL21(DE3)pLysS transformada com pET11 que cresceu sob as mesmas condições foi abaixo de 0,05U/mL.

Exemplo 7. Purificação da fitase recombinante da *Buttiauxella* P1-29.

A cultura da BL21(DE3)pLysS transformada com pET11 (P1-29) foi centrifugada para remover as células bacterianas, concentrada usando um rotaevaporador até cerca de 1/10 do volume original e dialisada contra água até que a condutividade da solução diminui abaixo de 250 μS/cm. O pH da solução foi ajustado para 8,0 com base tris e ela foi aplicada em uma coluna (3 x 20 cm) de DEAE Sepharose de fluxo rápido (Amersham Biosciences) equilibrada com tris-HCl 25 mM, pH 8,0. A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio em uma taxa de fluxo de 3mL/min por 30 min seguido pela eluição com três gradientes sucessivos de NaCl em 25mM de tris-HCl, pH 8,0: 0–50 mM, 50–150 mM e 150–500

mM. Cada um dos três gradientes foi programado por 1h com um taxa de fluxo constante de 3mL/min. Frações de 9mL foram coletadas e ensaiadas para a atividade da fitase. A proteína na fração do pico foi concentrada usando concentradores Centriplus (Amicon) e analisada por SDSA PAGE usando um gel de 12% e o sistema de tampão Laemmli padrão. Os resultados dessas análises indicaram que a preparação da fitase P1-29 de *Buttiauxella* obtida por DEAE Sepharose contém um único componente de proteína proeminente. Análises semiquantitativas baseados na análise da varredura da imagem digital do gel (Fig 1) indica a pureza de cerca de 65%.

Exemplo 8. Perfil de pH da fitase recombinante de *Buttiauxella* P1-29.

A dependência da atividade da forma da fitase P1-29 de *Buttiauxella* (purificada de acordo com o Exemplo 7) em pH foi estudada em tampões e sob as condições descritas no Exemplo 1. A enzima foi ativa em uma ampla área de pH (2-5,5) co um máximo por volta de pH 4,5 e um "ombro" forte de curva por volta de pH 3 (Fig 2).

Exemplo 9. Especificidade de substrato da fitase recombinante de *Buttiauxella* P1-29.

As frações do fosfato de inositol contendo três, quatro ou cinco fosfatos por resíduo de inositol foram

isoladas por cromatografia de troca iônica de um hidrolisado parcial de ácido fítico tratado com a fitase fúngica (Natuphos). A produção e a purificação dessas preparações foi um serviço comercial da BioChemis Lts (St. Petersburg, Rússia). A contaminação de cada fração com inositol-fosfatos com um diferente grau de fosforilação foi menor do que 5% conforme julgado por HPLC (Sandberg A.S., Ahderinne R. J. Food Sci. 51 (3), 547-550). A frutose 1,6-difosfato comercial e a frutose 6-fosfato (Sigma) foram usadas como substratos modelo usados para estimar a especificidade da fitase P1-29 *Buttiauxella* para os substratos de di- e monofosfatos. A atividade da fitase de *Buttiauxella* purificada de acordo com o Exemplo 7 com diferentes substratos foi medida pelo ensaio padrão (Exemplo 1) em pH 3,5 usando concentrações de 2mM de substratos na mistura da reação final. Os resultados (Fig. 3) indicam que a enzima tem uma especificidade de substrato extremamente ampla. Sua atividade com penta-, tetra- e trifosfatos foi essencialmente igual ou, de alguma forma, maior do que a atividade com ácido fítico como substrato. Mesmo a frutose 1,6-difosfato – um substrato pobre para a maioria das fitases, foi antes eficientemente hidrolisado pela fitase da *Buttiauxella sp.* (particularmente a fitase derivada de P1-29). A hidrólise da frutose-6-fosfato também

foi detectável, embora muito menos eficiente do que a hidrólise de outros substratos testados.

Exemplo 10. Atividade específica da fitase recombinante de *Buttiauxella* P1-29.

A atividade específica da fitase de *Buttiauxella* P1-29 foi estimada usando a preparação purificada de acordo com o Exemplo 7. A atividade da fitase foi medida em pH 3,5 de acordo com o Exemplo 1. A concentração da fitase foi calculada pela medição da concentração de proteína total com o kit de ensaio de proteína BCA (Pierce) e pela correção desta pelo conteúdo de fitase estimado pelo SDS PAGE (Exemplo 7). De acordo com essas medidas, a atividade específica da fitase recombinante de *Buttiauxella* P1-29 é de cerca de 300 U/mg a 37°C.

Exemplo 11. Geração e caracterização de variantes de fitase.

Variantes de fitase foram construídas por mutagênese da seqüência SEQ ID NO: 2 usando métodos de mutagênese conforme listados acima, tais como os métodos revelados em Morinaga *et al* (Biotechnology (1984) 2, p 646-649), ou em Nelson e Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, p 147-151), ou em Error Threshold Mutagenesis protocol descrito na WO 92/18645. Outro método adequado para o PCR mutagênico é revelado por Caldwell e Joyce (PCR Methods Appl. 3(1994),

136-140).

As variantes da enzima fitase foram caracterizadas depois da expressão heteróloga em um ou mais dos seguintes hospedeiros de expressão: *Escherichia coli* Kl 2*; Bacillus subtilis; Saccharomyces cerevisiae.*

As variantes da fitase foram derivadas, as quais diferiram em uma ou mais posições de aminoácidos da SEQ ID NO: 3, incluindo duas posições, três posições, quatro posições, cinco posições, seis posições, sete posições, oito posições, nove posições, dez posições, onze posições, doze posições. Quando apropriado, ciclos iterativos de mutagênese foram efetuados conforme aqui descrito.

Caracterização das variantes de fitase.

1. Termoestabilidade.

A termoestabilidade das variantes foi caracterizada pela temperatura de inativação da enzima. A temperatura de inativação foi determinada pela medição da atividade residual da enzima fitase depois da incubação por 10 min em diferentes temperaturas e o subseqüente resfriamento até a temperatura ambiente. A temperatura de inativação é a temperatura na qual a atividade residual é de 50% em comparação com a atividade residual depois da incubação para a mesma duração sob as mesmas condições em temperatura ambiente. Onde apropriado, as interpolações e as

extrapolações dos dados de atividade medida são feitas para determinar a temperatura correspondendo a 50% da atividade residual. As diferenças de termoestabilidade em °C foram calculadas pela subtração das temperaturas de inativação de duas enzimas uma da outra.

Tabela 1 lista as diferenças de termoestabilidde das diferentes variantes:

TABELA 1: Diferenças de termoestabilidade (TD) para variantes derivadas da fitase de origem mostrada na SEQ ID NO: 3.

Variante	**T. D.**
K59E	2,5
T167V	2,5
K240T	2,1
T167I	3,0
K240E	3,3
D244C	4,2
Q289Y	4,4
T209K	1,8
F197S	1,0
D125E/H193R	1,5
A294E/N303K	3,5
T167I/K240T	4,1

Variante	**T. D.**
D223E/K240E/N351D	2,7
T167I/K240T/A294E/N303K	6,1
T167I/K240E/A242S/A294E/N303K	8,2
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K	11,5
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K	15,2
A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K	12,0
D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	16,5
A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F	17,7
N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	20,2

2. Outras características

Outras características também foram melhoradas.

A termoestabilidade, a atividade específica e a estabilidade da pepsina de variantes selecionadas foram comparadas usando ensaios conforme descrito acima. A estabilidade da pepsina de tais variantes foi caracterizada pelas atividades residuais medidas em pH 3,5, 37°C depois da incubação da pepsina em comparação com as condições de

controle (atividade residual = atividade depois da incubação da pepsina/atividade depois da incubação sob condições de controle). A incubação da pepsina foi efetuada por 2 horas em pH 2,0, 0,25mg/mL de pepsina, $CaCl_2$ 1mM e 5 mg/mL de BSA a 37°C. As condições de controle foram de 2 horas em pH 5,0, $CaCl_2$ 1 mM e BSa 5mg/mL a 37°C. As condições de controle foram de 2 horas em pH 5,0, $CaCl_2$ 1mM e BSA de 5mg/mL a 37°C.

A Tabela 2 mostra as propriedades das variantes selecionadas (derivadas da e em comparação com a fitase wt de acordo com a SEQ ID NO: 3).

TABELA 2:

Estabilidade de pepsina para variantes derivadas da fitase aparente mostrada com SEQ ID NO: 3.

Variante	Estabilidade da pepsina [% de atividade residual]
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K	63
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K	72
A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N	34

Variante	Estabilidade da pepsina [% de atividade residual]
/G225A/K240E/A294E/N303K	
D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P /K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	62
A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P /K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F	61
N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/ A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	77

TABELA 3:

Atividade específica para uma variante derivada da fitase de origem mostrada na SEQ ID NO: 3:

Variante	Atividade específica [% de atividade wt em pH 4,0]
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242 S/S281L/Q289Y/A294E/N303K	115

Todas as publicações mencionadas na especificação acima, e as referências citadas nas referidas publicações

são aqui incorporadas por referência. Várias modificações e variações dos métodos descritos e o sistema da presente invenção serão aparentes para os indivíduos versados na técnica sem sair do escopo e espírito da presente invenção. Embora a invenção tenha sido descrita em conexão com as modalidades preferidas específicas, deve ser entendido que a invenção conforme reivindicada não deve ser impropriamente limitada por tais modalidades específicas. Realmente, várias modificações dos modos descritos para executar a invenção os quais são óbvios para os habilitados em biologia molecular ou campos relacionados são pretendidas estar dentro do escopo das seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1 Plasmídeo ou sistema de vetor **caracterizado pelo** fato de compreender uma molécula de ácido nucleico mostrada na SEQ ID NO: 2 ou uma molécula de ácido nucleico obtida a partir da cepa P1-29 de Buttiauxella sp., depositada sob o número de acesso NCIMB41248.

2 Plasmídeo ou sistema de vetor, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de** que o referido plasmídeo ou sistema de vetor é um vetor de expressão para a expressão de um polipeptídeo possuindo a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 3 ou um polipeptídeo obtido a partir da cepa P1-29 de Buttiauxella sp., depositada sob o número de acesso NCIMB41248, em um microorganismo.

3 Célula hospedeira **caracterizada pelo fato de** ser transformada ou transfectada com um plasmídeo ou sistema de vetor conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 ou 2.

4 Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada pelo fato de** compreender uma fitase que possui a sequência de aminoácidos conforme mostrada na SEQ ID NO: 3, ou um polipeptídeo obtido a partir da cepa P1-29 de Buttiauxella sp., depositada sob o número de acesso NCIMB41248.

5 Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 3 ou 4, **caracterizada pelo fato de** que a referida célula

hospedeira é derivada de um microrganismo, incluindo bactérias, tais como *B. subtilis*, *E. coli* e fungos, incluindo leveduras tais como *H. polymorpha*, *S. pombe*, *S. cerevisiae* e fungos filamentosos, tais como *Trichoderma spp.* e *Aspergillus spp*, tal como *A. oryzae.*

6 Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada pelo fato de** o referido microrganismo ser uma célula bacteriana procariótica, tal como *E. coli*.

7 Método para produzir um polipeptídeo **caracterizado pelo fato de** compreender a transformação de uma célula hospedeira com um polinucleotídeo em que o referido polipeptídeo é selecionado do grupo que consiste em:

a) um polipeptídeo possuindo a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 3;

b) um polipéptídeo obtido a partir da cepa P1-29 de Buttiauxella sp., depositada sob o número de acesso NCIMB41248;

c) um polipeptídeo obtido pela expressão da sequência de polinucleotídeos mostrada como SEQ ID NO: 2 ou uma sequência de nucleotídeos obtida a partir da cepa P1-29 de Buttiauxella sp., depositada sob o número de acesso NCIMB41248; e

d) um polipeptídeo obtido a partir da cepa P1-29 de Buttiauxella sp., depositada sob o número de acesso NCIMB41248 em que o polipeptídeo é obtido pela expressão da

SEQ ID NO: 2 ou uma sequência de nucleotideos obtida a partir da cepa P1-29 de Buttiauxella sp., depositada sob o número de acesso NCIMB41248.

8 Método para a produção de alimento ou de ração animal **caracterizado pelo fato de** compreender uma etapa de borrifar o polipeptídeo possuindo a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 3 ou um polipeptídeo obtido a partir da cepa P1-29 de Buttiauxella sp., depositada sob o número de acesso NCIMB41248, sob a forma líquida no referido alimento ou na referida ração.

9 Método para a produção de alimento ou de ração animal **caracterizado pelo fato de** compreender uma etapa de misturar o polipeptídeo possuindo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 3 ou um polipeptídeo obtido a partir da cepa P1-29 de Buttiauxella sp., depositada sob o número de acesso NCIMB41248, como um produto seco com o referido alimento ou ração animal.

10 Uso de um polipeptídeo possuindo a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 3 ou um polipeptídeo obtido a partir da cepa P1-29 de Buttiauxella sp., depositada sob o número de acesso NCIMB41248 **caracterizado pelo fato de** ser em alimento ou em ração animal.

11 Composição de alimento ou de ração animal **caracterizada pelo fato de** compreender i) um polipeptídeo possuindo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 3 ou um polipeptídeo obtido a partir da cepa P1-29 de

Buttiauxella sp., depositada sob o número de acesso NCIMB41248 e/ou ii) uma ração animal produzida pelo método de acordo com as reivindicações 8 ou 9.

12. Método de produção de um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo fato de** que a célula hospedeira é derivada de um microrganismo, incluindo bactérias, tais como *B. subtilis, E. coli* e fungos, incluindo leveduras tais como *H. polymorpha, S. pombe, S. cerevisiae* e fungos filamentosos, tais como *Trichoderma spp*. e Aspergillus spp.tal como *A. oryzae*.

13. Método de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo fato de** que o referido polipeptídeo tem atividade de fitase, em que o referido polipeptídeo tem uma atividade específica de pelo menos 300 U/mg, em que a referida atividade específica é determinada por incubação do referido polipeptídeo numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl2 0,8 mM em tampão de acetato de sódio 200 mM em pH 3,5, a uma temperatura de 37 ° C.

14. Método de produção de um polipeptídeo **caracterizado pelo fato de** compreender a transformação de uma célula hospedeira com um polinucleotídeo em um meio de cultura e separação do polipeptídeo do meio de cultura da célula hospedeira, em que o referido polipeptídeo é selecionado do grupo que consiste em:

a) um polipeptídeo possuindo a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 3;

b) um polipeptídeo obtido a partir da cepa P1-29 de Buttiauxella sp., depositada sob o número de acesso NCIMB41248;

c) um polipeptídeo obtido pela expressão da sequência polinucleotídica apresentada como SEQ ID NO: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida a partir da cepa P1-29 de Buttiauxella sp., depositada sob o número de acesso NCIMB41248; e

d) um polipeptídeo obtido a partir da cepa P1-29 de Buttiauxella sp., depositada sob o número de acesso NCIMB41248, em que o polipeptídeo é obtido pela expressão de SEQ ID NO: 2 ou uma sequência de nucleotídeos obtida a partir da cepa P1-29 de Buttiauxella sp., depositada sob o número de acesso NCIMB41248.

15. Método de acordo com a reivindicação 7, 12, 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídio é expresso num plasmídeo ou vector na célula hospedeira.

PI0518610

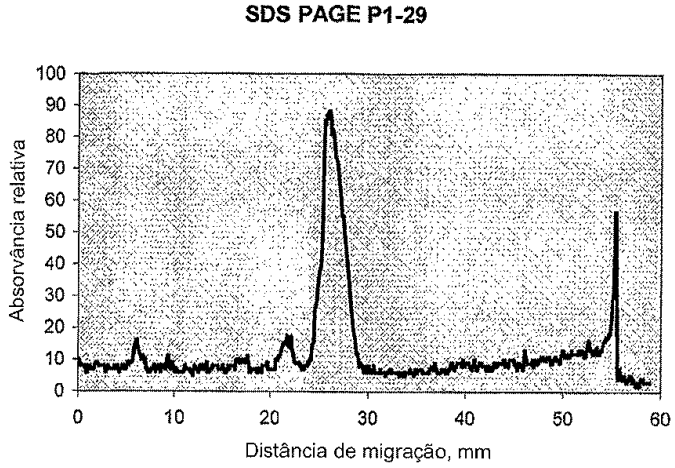


FIGURA 1

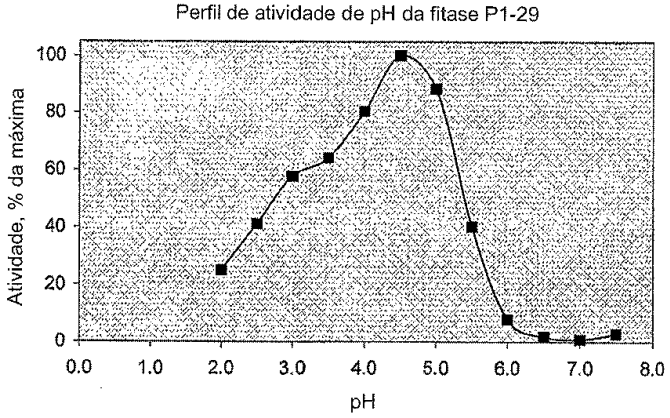


FIGURA 2

PI0518610

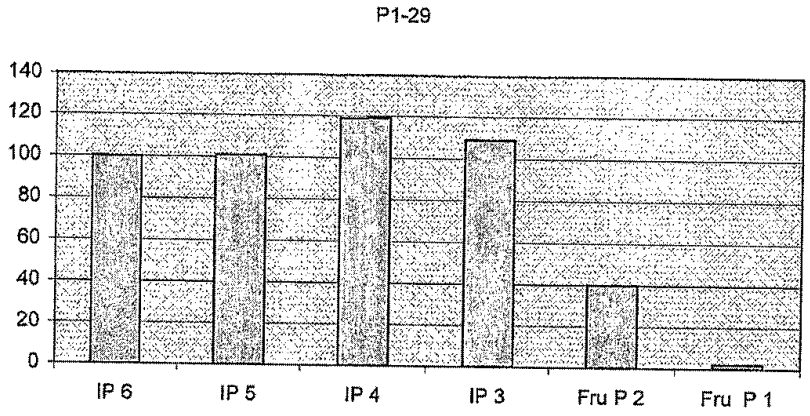


FIGURA 3