



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

(21) **PI0609675-1 A2**

(22) Data de Depósito: 12/05/2006  
(43) Data da Publicação: 18/10/2011  
(RPI 2128)



\* B R P I 0 6 0 9 6 7 5 A 2 \*

(51) *Int.Cl.:*  
C12P 21/02  
C12N 9/16  
C12N 15/63  
C12R 1/01

(54) **Título:** MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PROTEÍNA

(30) **Prioridade Unionista:** 12/05/2005 JP 2005-139798

(73) **Titular(es):** AJINOMOTO CO., INC.

(72) **Inventor(es):** Hiroshi Itaya, Masayo Date, Yoshimi Kikuchi

(74) **Procurador(es):** Momsen, Leonardos & CIA.

(86) **Pedido Internacional:** PCT JP2006309598 de 12/05/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2006/121165de  
16/11/2006

(57) **Resumo:** MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PROTEÍNA. Cultivando-se uma bactéria que assimile metanol tendo uma construção de DNA contendo uma seqüência promotora que funcione na bactéria que assimila metanol e uma seqüência de nucleotídeo que codifique um polipeptídeo contendo uma seqüência de sinal e uma seqüência de proteína objeto, que são conectadas à seqüência promotora tal que possam ser expressadas, em um meio líquido contendo metanol como uma fonte principal de carbono, a bactéria é deixada para secretar a proteína objeto e a proteína objeto secretada é recuperada.



PI0609675-1

## “MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PROTEÍNA”

### Campo Técnico

A presente invenção diz respeito a um método de produção secretora de uma proteína que inclui uma enzima industrialmente útil ou uma proteína biologicamente ativa pelo uso de uma bactéria que assimile metanol.

### Técnica Fundamental

Metanol é um material fermentativo que é disponível em uma quantidade grande a um custo baixo e é extremamente útil como uma fonte de carbono. Foi desenvolvido um método para produzir um L-aminoácido por uma bactéria que assimile metanol usando metanol como uma fonte principal de carbono (Documento de Patente 1) e um método para produzir um polissacarídeo usando uma bactéria que assimile metanol (Documento de Patente 2).

Também, até agora foi conhecido um exemplo de produção de lacZ em células bacterianas usando um promotor de um gene da álcool oxidase (AOX) pela indução com metanol em levedura *Pichia* (Documento Que Não de Patente 1) e um exemplo de secreção de aprotinina (inibidor da tripsina pancreática derivada de bovino) em um sobrenadante de cultura como um tipo ativo (Documento Que Não de Patente 2).

Além disso, é conhecido um exemplo de acúmulo de uma proteína fluorescente (GFP) em uma célula de uma bactéria não forçada que assimila metanol, *Metilobacterium extorquens*, que é uma das bactérias que assimilam metanol (Documento de Patente 3 e Documento Que Não de Patente 3). Entretanto, não foi conhecido um exemplo de secreção de uma proteína fora das células de uma bactéria que assimila metanol forçada.

Documento de Patente 1: EP 1.188.822

Documento de Patente 2: JP 11-56384 A

Documento de Patente 3: WO 2003/046226 A1

Documento Que Não de Patente 1: Nucleic Acids Res. 11 de

maio de 1987; 15(9): 3859-76.

Documento Que Não de Patente 2: J Ind Microbiol. Abril de 1991; 7(3): 197-201.

Documento Que Não de Patente 3: FEMS Microbiol Lett. 15 de dezembro de 2000; 193(2): 195-200

#### Divulgação da Invenção

É um objetivo da presente invenção fornecer um método de produção secretora eficiente de uma proteína que é difícil de ser produzida por meios secretores pelo uso de uma bactéria *Escherichia coli* ou semelhante.

Os inventores da presente invenção prestaram uma atenção a um promotor e seqüências de sinal derivadas de uma bactéria que assimila metanol e fizeram estudos extensivos. Como um resultado, eles descobriram que a produção secretora de uma proteína pode ser eficientemente realizada cultivando-se uma bactéria que assimila metanol tendo uma construção de DNA contendo uma seqüência promotora que funcione na bactéria que assimila metanol e uma seqüência de nucleotídeo que codifique uma seqüência de sinal e uma proteína alvo em um meio líquido contendo metanol como uma fonte principal de carbono, assim realizaram a presente invenção.

Isto é, a presente invenção é como segue.

(1) Um método para produzir uma proteína, que compreende cultivar uma bactéria que assimila metanol tendo uma construção de DNA que contenha uma seqüência promotora que funcione na bactéria que assimila metanol e uma seqüência de nucleotídeo que codifique um polipeptídeo contendo uma seqüência de sinal e uma seqüência da proteína alvo que está operavelmente conectada à seqüência promotora, em um meio líquido contendo metanol como uma fonte principal de carbono para permitir que a bactéria secrete a proteína alvo e recuperar a proteína alvo secretada.

(2) O método de acordo com (1), em que a seqüência

promotora que funciona na bactéria que assimila metanol é selecionada do grupo que consiste de um promotor da metanol desidrogenase, um promotor  $\sigma$ E e um promotor de proteína ribossômica.

5 (3) O método de acordo com (1), em que a seqüência promotora é uma seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 11, 12, 21, ou 22.

(4) O método de acordo com qualquer um de (1) a (3), em que a seqüência de sinal é uma seqüência de sinal de uma proteína selecionada da metanol desidrogenase, fitase e fosfatase ácida.

10 (5) O método de acordo com qualquer um de (1) a (3), em que a seqüência de sinal tem uma seqüência de aminoácido selecionada da SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 20.

15 (6) O método de acordo com qualquer um de (1) a (5), em que a bactéria que assimila metanol é uma bactéria selecionada do grupo que consiste de bactérias pertencentes aos gêneros *Metilophilus*, *Metilobacillus*, *Metilophaga*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Protaminobacter*, *Methanomonas*, *Microcycclus* e *Metilobacterium*.

(7) O método de acordo com qualquer um de (1) a (6), em que a proteína é selecionada do grupo que consiste de fitase, interleucina, transglutaminase, interferon, insulina, fosfatase ácida e peptídeo sintase.

20 (8) O método de acordo com qualquer um de (1) a (7), em que a bactéria que assimila metanol é uma bactéria que assimila metanol forçada.

(9) O método de acordo com (8), em que a bactéria que assimila metanol forçada é selecionada do grupo que consiste de bactérias pertencentes aos gêneros *Metilophilus*, *Metilobacillus* e *Metilophaga*.

25 Descrição das Formas de Realização Preferidas

O método de produção da presente invenção compreende cultivar uma bactéria que assimila metanol tendo uma construção de DNA contendo uma seqüência promotora que funciona na bactéria que assimila metanol e uma seqüência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo

contendo uma seqüência de sinal e uma seqüência da proteína alvo que está operavelmente conectada à seqüência promotora, em um meio líquido contendo metanol como uma fonte principal de carbono para permitir que a bactéria secrete a proteína alvo; e recuperar a proteína alvo secretada. Aqui, o termo “secretar” refere-se à excreção ou liberação de uma proteína alvo fora das células bacterianas e não abrange o acúmulo da proteína alvo dentro das células.

Isto é, a bactéria que assimila metanol produz um polipeptídeo contendo uma seqüência de sinal e uma proteína alvo e depois a proteína alvo é transferida a um periplasma pela clivagem da seqüência de sinal, sendo deste modo secretada fora das células bacterianas. A proteína secretada é recuperada para se obter a produção da proteína alvo. Depois disso, a produção de uma proteína permitindo-se que uma bactéria secrete a proteína e recuperar a proteína é aludido como “produção secretora de uma proteína”.

É no geral conhecido que uma proteína secretora é traduzida como um prepeptídeo ou um prepropeptídeo e é convertida em uma proteína madura. Isto é, é no geral conhecido que uma proteína secretora é traduzida como um prepeptídeo ou um prepropeptídeo e é convertida em um peptídeo maduro ou um propeptídeo pela clivagem da porção pré e o propeptídeo é ainda convertido em uma proteína madura pela clivagem da porção pro com uma protease. Uma tal protease que cliva um peptídeo de sinal é no geral aludido como peptidase de sinal.

Na presente invenção, a proteína alvo pode ser secretada como uma proteína madura ou um propeptídeo e no caso onde a proteína alvo é secretada como um propeptídeo, o propeptídeo pode ser convertido em uma proteína madura tratando-se o propeptídeo com uma protease apropriada depois recuperação.

Nesta descrição, o termo “seqüência de sinal” refere-se a uma seqüência que esteja presente no terminal N de um tipo precursor de uma

proteína secretora e é reconhecido quando a proteína é secretada e o termo “peptídeo de sinal” refere-se a um peptídeo que consiste dos resíduos de aminoácido.

5 Nesta descrição, uma proteína tendo tanto uma pré-seqüência e uma porção pro, isto é, um produto traduzido primário pode ser aludido como “preproteína”, enquanto que uma proteína que não tem nenhuma pré-seqüência e tendo uma porção pro pode ser aludida como “proteína”. A porção pro de uma proteína pode ser aludida como “porção pro-estrutura” ou simplesmente como “pro-estrutura” e nesta descrição, o termo “porção  
10 pro-estrutura/pro-estrutura” de uma proteína é usado intercambiavelmente com o termo “porção pro” de uma proteína.

Uma bactéria a ser usada no método de produção da presente invenção pode ser obtido pela introdução de uma construção de DNA contendo uma seqüência promotora que funciona em uma bactéria que  
15 assimila metanol e uma seqüência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo contendo uma seqüência de sinal e uma seqüência da proteína alvo que está operavelmente conectada à seqüência promotora, em uma bactéria que assimila metanol.

Aqui, o termo “bactéria que assimila metanol” refere-se a uma  
20 bactéria que pode crescer em um meio contendo metanol como uma fonte de carbono principal e seus exemplos incluem bactérias pertencentes aos gêneros *Metilophilus*, *Metilobacillus*, *Metilophaga*, *Achromobacter*, *Pseudomonas* (JP 45-25273 A), *Protaminobacter* (JP 49-125590 B), *Metanomona* (JP 50-25790 A), *Microcylus* (JP 52-18886 A) e *Metilobactéria*. Entre estas, preferível é  
25 uma bactéria que assimila metanol forçada que não pode crescer ou pode crescer levemente em um meio contendo glicose como uma única fonte de carbono. Os exemplos específicos de uma tal bactéria que pode crescer em um meio contendo metanol como uma fonte de carbono mas não pode crescer ou pode crescer levemente em um meio contendo glicose como uma única

fonte de carbono incluem bactérias *Metilophilus*, bactérias *Metilobacillus* e bactérias *Metilophaga*. Um exemplo da bactéria *Metilophilus* inclui *Metilophilus metilotrophus* e exemplos da bactéria *Metilobacillus* incluem *Metilobacillus glycogenes* e *Metilobacillus flagellatus* e os exemplos da

5 bactéria *Metilophaga* incluem *Metilophaga thalassica*, *Metilophaga marina* e *Metilophaga alcaliphila* (Biology of Metilotrophus; Editada por Israel Goldberg e J.Stefan Roken e publicada por Butterworth-Heinemann). Além disso, as bactérias tendo uma função para secretar a metanol desidrogenase (MDH) fora das células bacterianas também são preferíveis.

10 Os exemplos de *Metilophilus metilotrophus* incluem a cepa AS1 (NCIMB 10515), W3A1 (cepa NCIMB 11348) e a cepa ATCC 53528. *Metilophilus metilotrophus* cepa AS1 (NCIMB 10515) e W3AI (cepa NCIMB 11348) são disponíveis da National Collections of Industrial and Marine Bacteria, endereço: NCIMB Lts., Torry Research Station 135, Abbey Road,

15 Aberdeen AB9 8DG, Reino Unido).

Os exemplos de *Metilobacillus glycogenes* incluem cepa T-11 (NCIMB 11375), cepa ATCC 21276, cepa ATCC 21371, cepa ATCC 29475, cepa ATR80 (descrita em Appl. Microbiol. Biotechnol., (1994), vol. 42, p67-72) e cepa A513 descrita em Appl. Microbiol. Biotechnol., (1994), vol. 42,

20 p67-72). *Metilobacillus glycogenes* cepa NCIMB 11375 está disponível da National Collections of Industrial and Marine Bacteria, endereço: NCIMB Lts., Tony Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, Reino Unido).

Os exemplos de *Metilobacillus flagellatus* incluem a cepa

25 ATCC 51484, cepa KT (descrita em N.I. Govorukhina *et al.*, Microbiology (Rússia) 56 (1987), pp.849-854) e cepa VKM B-1610. *Metilobacillus flagellatus* cepa VKM B-1610 está disponível da ALL-RUSSIAN COLLECTION OF MICROORGANISMS (Rússia, 142290, Moscow Region, Pushchino, pr. Nauki, 5, IBPM).

*Metilophilus metilotrophus* cepa ATCC 53528, *Metilobacillus glycogenes* cepa ATCC 21276, cepa ATCC 21371, cepa ATCC 29475, *Metilobacillus flagellatus* cepa ATCC 51484 pode ser obtido da American Type Culture Collection (ATCC) (endereço ATCC, Endereço: P.O. Box 5 1549, Manassas, VA 20108, 1, United States of America).

Os exemplos de *Metilophaga thalassica* incluem a cepa ATCC 33145 e a cepa ATCC 33146. Um exemplo de *Metilophaga marina* inclui a cepa ATCC 35842. Um exemplo de *Metilophaga alcaliphila* inclui ATCCBAA-297<sup>®</sup>. *Metilophaga thalassica* cepa ATCC 33145 e cepa ATCC 10 33146 podem ser obtidos da American Type Culture Collection (ATCC) (endereço ATCC, Endereço: P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, 1, United States of America).

O termo “promotor que funciona em uma bactéria que assimila metanol” contido em uma construção de DNA a ser introduzida na bactéria 15 que assimila metanol refere-se a um promotor tendo atividade promotora na bactéria que assimila metanol, mas o promotor não é limitado a um derivado de uma bactéria que assimila metanol e pode ser derivado de um outro microorganismo. Além disso, o “promotor que funciona em uma bactéria que assimila metanol” inclui tanto um promotor indutível por metanol quanto um 20 promotor não indutível. Os exemplos do promotor indutível por metanol incluem um promotor de um gene da metanol desidrogenase, um promotor de um gene da diidroxiacetona sintase e um promotor de um gene da formiato desidrogenase.

Os exemplos específicos do promotor que funciona em uma 25 bactéria que assimila metanol incluem, mas não são limitados a, um promotor indutível por metanol de um gene da metanol desidrogenase (SEQ ID NO: 11), promotor *tac* que é um promotor de alta expressão derivado da *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 12), promotor  $\sigma^E$  (SEQ ID NO: 21) e promotor de proteína ribossômica (SEQ ID NO: 22).

Também, a seqüência promotora não é limitada a um promotor do tipo selvagem e pode ser um promotor obtido pela modificação de uma seqüência do tipo selvagem de modo que um gene objeto seja altamente expressado. Por exemplo, a seqüência pode ser obtida pela modificação da seqüência promotora do tipo selvagem de modo a se ter uma substituição, deleção, adição, ou inserção de diversos nucleotídeos contanto que o promotor tenha atividade promotora nas bactérias mencionadas acima. Além disso, de modo a aumentar a atividade promotora, o promotor pode ser modificado na região -35 ou região -10, ou modificado ajustando-se o comprimento de uma região espaçadora entre a região -35 e a região -10. Os exemplos do método de modificar as regiões -35 e -10 incluem o método descrito na EP 1.033.407 e o método descrito em *Nucleic Acids Res.* 15 de dezembro de 1999; 27(24): 4768-74.

A atividade promotora é definida pela freqüência de iniciação da síntese de RNA. Os exemplos de um método de avaliar a atividade promotora e promotores fortes que podem ser usados na presente invenção são descritos em Goldstein *et al.* {Prokaryotic promoters in biotechnology. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 1995, 1, 105-128) ou semelhante. Além disso, como divulgado na WO 00/18935, o promotor pode ser modificado em um promotor mais forte pela introdução de uma substituição de nucleotídeo de diversos nucleotídeos na região promotora de um gene objeto.

Em uma construção de DNA a ser introduzida em uma bactéria que assimila metanol, uma seqüência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo contendo uma seqüência de sinal e uma proteína alvo é operavelmente conectada à jusante do promotor.

A “seqüência de sinal que funciona em uma bactéria que assimila metanol” significa uma seqüência que pode ser reconhecida pela bactéria que assimila metanol de modo a secretar a proteína alvo quando a mesma está conectada a uma proteína alvo.

A seqüência de sinal pode ser derivada de uma proteína diferente de uma proteína alvo ou contida em uma proteína precursora de uma proteína alvo. Entretanto, a seqüência de sinal é preferivelmente derivada de uma proteína secretora de uma bactéria hospedeira que assimila o metanol a ser usado. Uma seqüência de sinal que pode ser usada para a presente invenção pode conter uma parte de uma seqüência de aminoácido lateral de terminal N de uma proteína alvo junto com a seqüência de sinal em uma proteína precursora a partir da qual a seqüência de sinal é derivada.

Quando a origem de uma seqüência de sinal é diferente daquela de uma proteína alvo, uma preproteína pode ser aludida como “preproteína de fusão heteróloga”. Por exemplo, quando a proteína é insulina, a mesma é aludida como “preproinsulina de fusão heteróloga” em contraste à “preproinsulina” ou “proinsulina”.

A seqüência de sinal não é particularmente limitada contanto que a mesma funcione em uma bactéria que assimila metanol e possa ser usada uma seqüência de sinal derivada de uma proteína secretada de uma bactéria que assimila metanol ou uma seqüência de sinal derivada de uma proteína secretada de outras bactérias, leveduras, plantas, animais, etc. Um exemplo específico da seqüência de sinal inclui uma seqüência de sinal da metanol desidrogenase (MDH) derivada de *Metilophilus metilotrophus* (seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 18). Também, os exemplos de uma seqüência de sinal derivada de uma outra bactéria incluem uma seqüência de sinal de fitase codificada por um gene appA de *Escherichia coli* (seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 20) e uma seqüência de sinal da fosfatase ácida de *Morganella morganii* (posições 1 a 20 da SEQ ID NO: 26). As seqüências de nucleotídeo que codifica estas seqüências de aminoácido são mostradas nas SEQ ID NOs: 17, 19 e 25.

Uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma seqüência de sinal pode ser uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma seqüência de

sinal do tipo selvagem ou uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma seqüência de sinal do tipo selvagem pode ser substituída de modo que os códons sejam adequadamente usados por uma bactéria que assimila metanol que secrete e produza uma proteína.

5                   A “proteína alvo” que pode ser secretada e recuperada pelo método da presente invenção não é particularmente limitado contanto que a mesma possa ser secretada pelo uso de uma bactéria que assimile metanol quando a mesma está conectada à seqüência de sinal que funcione na bactéria que assimila metanol e esta inclui várias proteínas tais como proteínas  
10                   secretoras e proteínas intracelulares derivadas de animais, plantas e microorganismos. O método da presente invenção pode ser aplicado a uma proteína que não pode ser obtida pela produção secretora em uma bactéria gram negativa tal como uma bactéria Escherichia. A “proteína alvo” é preferivelmente uma proteína heteróloga que é derivada de uma origem  
15                   diferente de uma bactéria hospedeira que assimile metanol.

                  Quando uma proteína secretada é usada como a “proteína alvo”, uma proteína tendo uma seqüência obtida pela remoção de uma pré-seqüência e uma pró-seqüência de um precursor ou uma proteína tendo uma pró-seqüência pode ser usada. Entretanto, a “proteína alvo” pode ser uma  
20                   proteína obtida pela remoção de pelo menos um aminoácido que constitui uma pré-porção e uma porção pro pela clivagem de uma ligação de peptídeo a partir de uma proteína precursora e esta inclui uma proteína tendo uma região de terminal N que completamente corresponde àquela de uma proteína madura natural, uma proteína tendo pelo menos um aminoácido extra  
25                   derivado de uma pré-porção ou uma porção pro no terminal N quando comparada com uma proteína madura natural e uma proteína tendo uma seqüência de aminoácido mais curta do que aquela de uma proteína madura natural.

                  A proteína alvo à qual o método de produção da presente

invenção pode ser aplicado não é particularmente limitado e seus exemplos incluem proteínas maduras ou proproteínas das seguintes proteínas:

Fitase [EC: 3.1.3.2 3.1.3.26]

5 Interleucina 2 Humana (IL2: Acesso no Genbank Nº  
AAK26665, IL2 tipo madura: aminoácidos nas posições 21 a 153)

Glutaminase de Proteína

Trans glutaminase (Acesso no Genbank Nº AF531437)

Interferon

Insulina (JP 07-284394 A)

10 Fosfatase ácida

Sintetase de Peptídeo (WO 2004/011653, WO 2004/065610)

Fator estimulador de Granulócito (GCSF)

Entre estas, as preferíveis são a fitase e a fosfatase ácida produzidas nos exemplos mostrados abaixo.

15 A Fitase (também aludida como fosfoanidrido fosforilase) é uma enzima que hidrolisa a fitina (também aludida como inositol hexacisfosfato ou ácido fítico) e é útil nos campos alimentícios, agrícolas e medicinais, etc. As seguintes podem ser usadas como fitase. A informação  
20 sobre a seqüência de aminoácido de cada fitase e a seqüência de nucleotídeo que codifica cada fitase pode ser obtida referindo-se ao Acesso no Genbank Nº de cada fitase.

A Fitase derivada de *Escherichia coli*: Acesso no Genbank Nº AAC74065 (SEQ ID NO: 16), a proteína madura: aminoácidos nas posições 23 a 432

25 Fitase derivada de mofo: Acesso no Genbank Nº AAU93518, AAU93517 e AAG40885 e BAB40715

Fitase derivada de *Bacillus*: Acesso no Genbank Nº AAC38573, AAG 17903 e AAL 59320

Fitase derivada de levedura: Acesso no Genbank Nº

CAB70441

Fitase derivada de *Yersinia*: Acesso no Genbank Nº

YP\_070934

Fitase derivada de *Klebsiella*: Acesso no Genbank Nº

5 AAM23271

Fitase derivada de *Xanthomonas*: Acesso no Genbank Nº

AAM38967

Fitase derivada de *Pseudomonas*: Acesso no Genbank Nº

AAN77879

10 Fitase derivada de cogumelo: Acesso no Genbank Nº

CAC48195, CAC48164 e CAC48234

Fitase derivada do milho: Acesso no Genbank Nº AAB52233

Fitase derivada de soja: Acesso no Genbank Nº AAK49438

Fitase derivada de batata doce: Acesso no Genbank Nº

15 AAF60315

Fitase derivada de rato: Acesso no Genbank Nº AAA42305

Fosfatase ácida é uma enzima que catalisa uma reação de hidrolisação de um fosfato sob condições ácidas (EC 3.1.3.2) e é possível usar a seguinte fosfatase ácida derivada de *Morganella morganii*, fosfatase ácida descrita na WO 96/37603 e mutantes destas.

20

Fosfatase ácida derivada de *Morganella morganii*: Acesso no Genbank Nº AB035805 (SEQ ID NO: 25) aminoácidos tipo maduro nas posição de 21 a 259

25 Um gene que codifica cada uma destas proteínas pode ser modificado dependendo de um hospedeiro a ser usado e/ou para obter uma atividade desejada e tal modificação inclui modificação para adicionar, deletar ou substituir pelo menos um aminoácido na seqüência de aminoácido a ser codificada. Uma tal tecnologia biológica molecular geral que inclui métodos de modificação, métodos de clonagem de gene e métodos de detecção das

proteínas produzidas são bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Por exemplo, as tecnologias são descritas em Sambrook *et al.*, 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Terceira Edição (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, DNA cloning: A Practical Approach, Volumes I e II (D. N. Glover ed. 1985), F .M. Ausubel et al. (eds), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994), PCR Technology: Principles and Application for DNA Amplification, H. Erlich, ed., Stockton Pres, etc. No caso de proteínas heterólogas, um gene pode ser modificado para ter substituição de códons com códons freqüentemente usados em um microorganismo para a produção secretora.

Um gene que codifica uma proteína pode ser obtido pela PCR ou semelhante usando iniciadores planejados com base em uma seqüência conhecida. Também, pode ser usado um gene que codifique uma proteína alvo obtido pela isolamento de cromossomas de microorganismos, animais, plantas, etc. pela hibridização ou semelhante com base na homologia e um gene do qual a seqüência de nucleotídeo foi determinada. Alternativamente, um gene obtido pela síntese química com base em uma seqüência de nucleotídeo conhecida pode ser usado. A informação de seqüência está disponível a partir de uma base de dados tal como o Genbank.

Além disso, a proteína alvo pode ser uma proteína tendo substituição, deleção, inserção ou adição de um ou diversos aminoácidos em uma ou uma pluralidade de posições contanto que a mesma tenha a atividade da proteína alvo. Na presente invenção, dependendo da posição de resíduos de aminoácido na estrutura terciária ou tipos de uma proteína, o termo “um ou diversos” especificamente significa de 1 a 30, preferivelmente de 1 a 20 e mais preferivelmente de 1 a 10.

A substituição mencionada acima em uma proteína é a substituição conservativa para manter a atividade da proteína. A substituição é

uma mudança para remover pelo menos um resíduo em uma seqüência de aminoácido e para inserir um outro resíduo neste lugar. Os exemplos de uma tal substituição de um aminoácido que é realizada para substituir um aminoácido original de uma proteína de enzima e é considerada como uma substituição conservativa incluem: substituição de Ser ou Thr no lugar de Ala; substituição de Gln, His ou Lys no lugar de Arg; substituição de Glu, Gln, Lys, His ou Asp no lugar de Asn; substituição de Asn, Glu ou Gln no lugar de Asp; substituição de Ser ou Ala no lugar de Cys; substituição de Asn, Glu, Lys, His, Asp ou Arg no lugar de Gln; substituição de Gly, Asn, Gln, Lys ou Asp no lugar de Glu; substituição de Pro no lugar de Gly; substituição de Asn, Lys, Gin, Arg ou Tyr no lugar de His; substituição de Leu, Met, Val ou Phe no lugar de Ile; substituição de Ile, Met, Val ou Phe no lugar de Leu; substituição de Asn, Glu, Gin, His ou Arg no lugar de Lys; substituição de Ile, Leu, Val ou Phe no lugar de Met; substituição de Trp, Tyr, Met, Ile ou Leu no lugar de Phe; substituição de Thr ou Ala no lugar de Ser; substituição de Ser ou Ala no lugar de Thr; substituição de Phe ou Tyr no lugar de Trp; substituição de His, Phe ou Trp no lugar de Tyr; e substituição de Met, Ile ou Leu no lugar de Val.

Um DNA que codifica uma proteína substancialmente idêntica à proteína mencionadas acima pode ser obtido pela modificação de uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma tal enzima, por exemplo, por uma mutação específica ao sítio, de modo que um resíduo de aminoácido em um sítio específico é substituído, deletado, inserido, adicionado ou invertido. Além disso, o DNA modificado mencionado acima pode ser obtido por um tratamento mutacional convencionalmente conhecido. Os exemplos do tratamento mutacional incluem um método de tratar um DNA não mutado *in vitro* com hidroxilamina ou semelhante, um método de tratar um microorganismo que abriga um DNA não mutado, por exemplo, uma bactéria *Escherichia*, pela irradiação com raio ultravioleta ou pelo uso de um

mutágeno que no geral é usado para um tratamento mutacional tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) ou ácido nitroso, um método de causar artificialmente um erro aleatório pela conversão de uma razão de componente de desoxinucleotídeos em uma solução de reação de PCR de 5 taxas iguais (geral) para taxas desiguais, isto é, uma PCR propensa a erro.

Um DNA que codifica uma proteína substancialmente idêntica pode ser obtida pela expressão de um DNA tendo uma tal mutação em uma célula apropriada e determinando a atividade do produto expresso a partir do DNA.

10 Também, um DNA que hibridiza com uma seqüência de nucleotídeo complementar àquela de um gene do tipo selvagem ou com uma sonda tendo uma parte deste sob condições severas e codifica uma proteína tendo uma atividade de proteína alvo pode ser obtido a partir de um DNA que codifica uma proteína ou células mutadas contendo o DNA. Aqui, o termo 15 “condições severas” refere-se a condições onde um híbrido chamado específico é formado e híbrido não específico não é formado. É difícil definir claramente as condições com valor numérico, mas os seus exemplos para hibridização incluem: condições onde DNAs com alta homologia, por exemplo, DNAs tendo homologia de não menos do que 70 %, preferivelmente 20 homologia de não menos do que 80 %, mais preferivelmente homologia de não menos do que 90 %, de modo particularmente preferível homologia de não menos do que 95 % hibridizam entre si e DNAs com homologia menor do que 70 % não hibridizam entre si; e condições para lavagem no geral a hibridização de Southern, isto é, condições para lavagem em temperatura de 25 60°C e com concentrações salinas de 1x SSC, 0,1 % de SDS, preferivelmente 0,1x SSC, 0,1 % de SDS.

A proteína alvo anteriormente mencionada pode ser diretamente conectada a uma seqüência de sinal ou indiretamente conectada a uma seqüência de sinal por intermédio de uma seqüência ligadora. No caso de

incluir uma seqüência ligadora, a seqüência ligadora pode ser qualquer seqüência contanto que a mesma não iniba a produtividade de um polipeptídeo ou a atividade de uma proteína alvo e por exemplo, uma seqüência para purificar uma proteína alvo, tal como poliistidina pode ser usada.

5 Uma seqüência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo contendo uma seqüência de sinal e uma proteína alvo pode ser apropriadamente preparada pela conexão de uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma seqüência de sinal a uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma proteína alvo com uma enzima de restrição ou semelhante.

10 Além disso, no caso de usar uma seqüência de sinal e uma proteína alvo que são derivadas da mesma proteína precursora, uma seqüência que codifica uma proteína precursor que inclui uma seqüência de sinal e uma proteína alvo pode ser amplificada pela PCR ou semelhante. Vários métodos de PCR modificados conhecidos podem ser usados e entre eles, a PCR de cruzamento é vantajosamente usado para a amplificação.

15 Uma construção de DNA a ser introduzida em uma bactéria que assimila metanol pode ser preparada conectando-se operavelmente uma seqüência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo contendo uma seqüência de sinal e uma proteína alvo a um promotor. A frase “conectando operavelmente uma seqüência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo contendo uma seqüência de sinal e uma proteína alvo a um promotor” significa que o mRNA que codifica um polipeptídeo é transcrito por um promotor de modo que o polipeptídeo seja produzido pela bactéria quando a construção é introduzida na bactéria.

20 25 A seqüência de nucleotídeo é preferivelmente conectada a um promotor na região exatamente a jusante de um códon de início de tradução em uma seqüência que codifica um polipeptídeo de modo que o mesmo inclua a região 5' não traduzida contendo um sítio de início de transcrição. A região

5' não traduzida pode ser uma região 5' não traduzida de uma seqüência a partir da qual um promotor é derivado tal como uma região 5' não traduzida de um gene MDH no caso de um promotor do gene MDH. Além disso, a região 5' não traduzida pode ser uma região 5' não traduzida de um gene a partir do qual uma seqüência que codifica uma seqüência de sinal é derivada tal como uma região 5' não traduzida de um gene da fitase no caso de usar uma seqüência de sinal da fitase.

É conhecido que a eficiência de tradução de mRNA é significativamente afetada pela substituição de diversos nucleotídeos em um espaçador entre um sítio de ligação de ribossoma (RBS) e um códon de início, em particular, em uma seqüência exatamente a jusante do códon de início no caso de usar a região 5' não traduzida e portanto uma região 5' não traduzida que inclui tal modificação pode ser usada.

Operações para a obtenção de uma tal construção de DNA pode ser realizada pelo uso de uma bactéria gram negativa que seja de modo fácil geneticamente modificada, tal como uma bactéria *Escherichia* ou pelo uso de um microorganismo que secrete uma proteína.

De modo a modificar uma bactéria que assimila metanol de modo a ter a construção de DNA mencionadas acima, por exemplo, um vetor que carrega a construção de DNA pode ser introduzido. Por exemplo, uma bactéria hospedeira que assimila metanol pode ser transformada: preparando-se um DNA recombinante pela conexão de um fragmento de gene que codifica a proteína a um vetor que funcione em uma bactéria que assimila metanol, preferivelmente a um vetor de cópia múltipla; e introduzindo o DNA recombinante.

Um promotor alvo, seqüência de sinal, seqüência de proteína podem ser obtidos, por exemplo, PCR (reação da cadeia da polimerase; White, T. J. *et al*, Trends Genet. 5, 185 (1989)) usando um DNA cromossômico de um animal, planta ou microorganismo tendo uma seqüência

objeto como um padrão. O DNA cromossômico pode ser preparado a partir de uma bactéria que serve como um doador de DNA, por exemplo, pelo método de Saito e Miura (H. Saito e K. Miura, *Biochem. Biophys. Acta*, 72, 619 (1963), *Experiment Manual for Biotechnology*, editado pela The Society for  
5 *Biotechnology*, Japão, p. 97-98, Baifukan Co., Ltd., 1992) ou semelhante. Os iniciadores de PCR podem ser preparados com base em seqüências de gene registradas em bases de dados conhecidas tais como Genbank ou com base na informação em uma região conservada entre os genes tendo seqüências conhecidas em uma outra bactéria ou semelhante.

10 Os exemplos de um vetor capaz de replicar autonomamente em uma bactéria que assimila metanol incluem plasmídeos capazes de replicar autonomamente, por exemplo, em uma bactéria *Metilophilus* ou *Metilobacillus*. Os exemplos específicos destas incluem um vetor de faixa de hospedeiro ampla RSF1010 e um derivado deste, tal como pAYC32  
15 (Chistosterdov, A. Y., Tsygankov, Y D. *Plasmid*, 1986, 16, 161-167), pMFY42 (gene, 44, 53 (1990)), pRP301 ou pTB70 (*Nature*, 287, 396, (1980)).

Também, pAYCTER3 usado nos Exemplos desta descrição é um vetor preferível. O pAYCTER3 é um plasmídeo obtido pela deleção da  
20 região a jusante de um gene resistente à estreptomicina de pAYC32 (strA e strB) e inserindo aí um sítio de clonagem múltipla de pUC19 e um terminador de um gene *rrnB* de *E. coli*. Isto é, o pAYCTER3 é um vetor de alta expressão que não expressa resistência à estreptomicina mas torna-se resistente à estreptomicina quando um DNA contendo uma seqüência promotora é  
25 inserido no sítio de clonagem múltipla em uma direção avançada em relação a strA.

De modo a preparar um DNA recombinante pela conexão da construção de DNA a um vetor que carrega um marcador que funciona em uma bactéria que assimila metanol, um vetor é clivado com uma enzima de

restrição adequada para o final de um gene alvo. A ligação é no geral realizada com uma ligase tal como T4 DNA ligase.

5 A introdução de um DNA recombinante preparado como descrito acima em uma bactéria que assimila metanol pode ser realizada por um método de transformação que foi reportado. Os seus exemplos incluem um método que compreende preparar uma célula competente a partir de uma célula no estágio de proliferação e introduzir um DNA nesse lugar (Dubunau e Davidoff-Abelson, *J. Mol. Biol.*, 56, 209 (1971); Duncan, C. H., Wilson, GA e Young, R E, *Gene*, 1, 153 (1977)) e um método que compreende  
10 converter uma célula hospedeira em um protoplasto ou esferoplasto que facilmente receba um DNA recombinante e introduzir um DNA recombinante na bactéria receptora de DNA (Chang, S. e Choen, S. N., *Molec. Gen. Genet.*, 168, 111 (1979)).

15 Além disso, uma bactéria que assimila metanol tendo uma construção de DNA da presente invenção pode ser construída pela introdução de uma cópia ou cópias múltiplas de uma construção de DNA em um DNA cromossômico de uma bactéria que assimila metanol. Uma cópia ou cópias múltiplas de uma construção de DNA da presente invenção pode ser introduzida em um DNA cromossômico de uma bactéria que assimila metanol  
20 pela recombinação homóloga usando uma seqüência que esteja presente em um DNA cromossômico em cópias múltiplas como um alvo ou pela inserção aleatória a um DNA cromossômico usando um fago ou semelhante. Como uma seqüência presente em um DNA cromossômico em cópias múltiplas, um transposon, uma seqüência repetitiva, uma repetição invertida presente no  
25 final de um elemento reversível ou semelhante podem ser usados. Além disso, a amplificação com um vetor e a formação de cópias múltiplas no cromossoma podem ser combinadas com a modificação mencionada acima de uma seqüência que regula a expressão.

Uma proteína pode ser produzida cultivando-se uma bactéria

que assimila metanol obtido como descrita acima em um meio líquido contendo metanol como uma fonte de carbono para permitir que a bactéria secrete a proteína alvo e depois recuperar a proteína alvo secretada.

5 Nesta descrição, a “secreção” de uma proteína ou um peptídeo significa o transporte de uma molécula de proteína ou peptídeo fora das células bacterianas, que inclui não apenas um caso onde a proteína ou peptídeo esteja eventualmente em um estado completamente livre em um meio mas também um caso onde apenas uma parte desta esteja presente no lado de fora das células bacterianas assim como um caso onde a proteína ou  
10 peptídeo esteja presente na camada de superfície das células bacterianas.

Na presente invenção, uma proteína alvo é preferivelmente secretada a um grau tal que a mesma seja coletada de um meio ou células bacterianas.

A bactéria que assimila metanol é cultivada em um meio  
15 contendo metanol como uma fonte de carbono. Os exemplos do meio contendo metanol como uma fonte de carbono incluem um meio suplementado com 0,001 a 30 % de metanol. O meio pode conter uma fonte de carbono outra que não metanol, tal como: açúcares que incluem glicose, sacarose, lactose, galactose, frutose e um hidrolisado de amido; álcoois tais  
20 como glicerol e sorbitol; e ácidos orgânicos tais como ácido fumárico, ácido cítrico e ácido succínico.

Como um componente do meio outro que não metanol, um componente de meio tal como uma fonte de nitrogênio ou um íon inorgânico usado na cultura geral pode ser adicionado. De modo a obter crescimento  
25 superior, um nutriente orgânico traço tal como uma vitamina e um aminoácido pode ser adicionado, se necessário. Como a fonte de nitrogênio, gás amoníaco, água amoniacal, sais de amônio, etc. podem ser usados. Como o íon inorgânico, íon cálcio, íon magnésio, íon fosfato, íon potássio, íon ferro, etc. podem ser apropriadamente usados, se necessário. Por exemplo, a cultura

pode ser realizada no pH 5,0 a 9,0 e de 15°C a 45°C sob condições aeróbicas e um período de cultura pode ser cerca de 1 a 7 dias. Quando uma bactéria que assimila metanol é cultivada sob tais condições, uma proteína alvo é produzida em uma grande quantidade em células bacterianas e depois eficientemente secretadas.

Em um caso de usar um promotor indutível por metanol tal como um promotor do gene MDH, a cultura pode ser realizada sob condições indutíveis para aumentar a produção de um polipeptídeo. A indução pode ser realizada de acordo com condições no geral usadas para induzir um promotor do gene MDH. No geral, quando uma bactéria que assimila metanol é cultivada em metanol, um promotor MDH podem funcionar sem requerer indução particular.

Uma proteína secretada em um meio pelo método da presente invenção pode ser separado e purificado a partir do meio depois da cultura de acordo com um método bem conhecido por uma pessoa habilitada na técnica. Por exemplo, a proteína pode ser separada e purificada: removendo-se as células bacterianas pela centrifugação ou semelhante; e realizando-se um método apropriado conhecido tal como dessalinização, precipitação com etanol, ultrafiltração, cromatografia de filtração em gel, cromatografia de coluna de troca iônica, cromatografia de afinidade, cromatografia líquida de média e alta pressão, cromatografia de fase reversa ou cromatografia hidrofóbica; ou combinação destes métodos. Quando um polipeptídeo compreende uma seqüência para purificação, a purificação pode ser realizada usando a seqüência.

Uma proteína secretada na camada de superfície de células bacterianas pelo método da presente invenção pode ser separada e purificada: solubilizando-se a proteína por um método conhecido por uma pessoa habilitada na técnica, por exemplo, aumentando-se o teor salino, usando um tensoativo, etc.; e realizando-se os mesmos procedimentos como no caso onde

a proteína é secretada em um meio. Também, em alguns casos, a proteína secretada na camada de superfície de células bacterianas pode ser usadas como, por exemplo, uma enzima imobilizada sem solubilizar a proteína.

#### Exemplos

5 A presente invenção será descrita em mais detalhes com os seguintes exemplos, mas a mesma não é limitada a estes em qualquer sentido.

Exemplo 1: Expressão secretora de beta-lactamase que é derivada de *Escherichia coli* Cepa K-12 em *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528

10 (1) Construção de plasmídeo de expressão que funcione em bactéria que assimila metanol, pAYCTER3

Os DNAs sintéticos mostrados nas SEQ ID NOS: 3 e 4 que foram planejados para conter a seqüência do sítio de clonagem múltiplo de pUC19 foram recozidos por um método conhecido para preparar um poliligador. O poliligador foi planejado para ter as mesmas formas finais como aqueles obtidos pela clivagem com enzimas de restrição EcoRI e BglII. Além disso, os iniciadores mostrados nas SEQ ID NOS: 5 e 6 foram sintetizados e a região que codifica a seqüência terminadora de rrnB foi amplificada pela PCR com DNA cromossômico de *Escherichia coli* K-12 preparado pelo método convencional (método de Saito e Miura [Biochim. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)]). Uma seqüência reconhecida pela enzima de restrição BglII foi introduzida no iniciador da SEQ ID NO: 3 e uma seqüência reconhecida pela enzima de restrição BclI foi introduzida no iniciador da SEQ ID NO: 4. A PCR foi realizada usando Pyrobest DNA polimerase (fabricada por TAKARA BIO INC.) e as condições de reação foram de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Depois de digerir os fragmentos de PCR com as enzimas de restrição BglII e BclI, os fragmentos de PCR e o poliligador acima foram ligados juntos para preparar um fragmento de DNA de cerca de 400 pares de base. Um kit de ligação de DNA Ver. 2.1 (fabricado por TAKARA BIO INC.) foi utilizada na reação de ligação e as condições de

15

20

25

reação foram de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Subseqüentemente, os fragmentos de cerca de 9,2 kbp que foram cortados fora do plasmídeo pAYC32 conhecido (J. Gen. Microbiol., 137, 169-178 (1991)) com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI foram coletados e o  
5 fragmento de DNA acima foi aí inserido para construir um plasmídeo de expressão pAYCTER3 que funciona em *M. metilotrophus* ATCC 53528. A estrutura do pAYCTER3 carece da seqüência a montante do lado 5' do gene strA incluído em pAYC32, mas o mesmo tem ao invés um sítio de clonagem múltipla pUC 19 e um terminador *rrnB* e inclui um gene da beta-lactamase  
10 derivado de *E. coli*.

(2) Expressão secretora de beta-lactamase em *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528

*Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528 foi transformado com pAYCTER3 construído em (1) acima e uma cepa que cresce em meio de  
15 SEIIA ágar (5 g de sulfato de amônio, 1,9 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,56 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 200 mg de sulfato de magnésio, 72 mg de cloreto de cálcio, 5 µg de sulfato de cobre, 25 µg de sulfato de manganês, 23 µg de sulfato de zinco, 9,7 mg de tricloreto de ferro e 15 g de ágar foram dissolvidos em água até 1 L e a solução foi ajustada ao pH 7,0) contendo 25 mg/l de ampicilina e 1  
20 % de metanol foi selecionada. Subseqüentemente, o *M. metilotrophus* ATCC 53528 selecionado tendo pAYCTER3 foi cultivado em meio líquido SEIIA contendo 25 mg/l de ampicilina e 2 % de metanol a 37°C por 48 horas. Depois da conclusão da cultura, o sobrenadante de cultura das células bacterianas de *M. metilotrophus* ATCC 53528 tendo pAYCTER3 foi  
25 submetido a SDS-PAGE, para detectar deste modo uma proteína tendo o mesmo peso molecular como beta-lactamase no sobrenadante de cultura.

A determinação da seqüência de terminal N da proteína usando um seqüenciador de proteína PPSQ-21A (fabricado pela Shimadzu Corporation) revelou que a seqüência foi uma seqüência madura de beta-

lactamase e foi confirmado que a beta-lactamase foi secretada no sobrenadante de cultura.

Exemplo 2: Expressão secretora de fitase que é derivada de *Escherichia Coli* Cepa K-12 em *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528

5 (1) Aquisição de gene da metanol desidrogenase derivada de *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528

A seqüência de um gene da metanol desidrogenase derivada de *M metilotrophus* cepa W3A1 já foi determinada [Acesso no Genbank Nº U41040]. Com base na seqüência, os iniciadores mostrados nas SEQ ID NOS:  
10 1 e 2 foram sintetizados e uma região que codifica uma seqüência da metanol desidrogenase foi amplificada por um método de PCR a partir do DNA cromossômico da *M metilotrophus* ATCC 53528 preparado de acordo com o método de Saito e Miura. A PCR foi realizada usando Pyrobest DNA polimerase (fabricada por TAKARA BIO INC.) e as condições de reação  
15 foram de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

Subseqüentemente, o fragmento de DNA amplificado de cerca de 1,0 kb foi deixado reagir usando o Kit Random Primer DNA Labeling Ver. 2 (fabricado pela TAKARA BIO INC.) e [ $\alpha$ -32P]dCTP de acordo com o protocolo anexo ao kit, para criar deste modo uma sonda de DNA. A  
20 hibridização de Southern blot usando a sonda criada e DNA cromossômico de *M metilotrophus* ATCC 53528 de acordo com um método geral como descrito em Molecular Cloning 2ª edição [J. Sambrook, E. F. Fritsch e T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p9.31 (1989)] revelou que o fragmento de cerca de 5,5 kb que foi cortado fora com uma enzima de restrição PvuII  
25 incluiu um gene da metanol desidrogenase. Depois, fragmentos de cerca de 5,5 kb obtidos pela digestão do DNA cromossômico de *M metilotrophus* ATCC 53528 com PvuII foram recuperados depois da eletroforese em gel de agarose usando EASYTRAP Ver. 2 (fabricado pela TAKARA BIO INC.) e inserido no sítio SmaI em pUC18 (fabricado pela TAKARA BIO INC.) e o

plasmídeo obtido foi introduzido em células competentes de *Escherichia coli* JM109 (fabricadas pela TAKARA BIO INC.), para preparar deste modo uma biblioteca.

5 A triagem da biblioteca foi realizada pela hibridização de colônia descrita em Molecular Cloning 2ª edição [J. Sambrook, E. F. Fritsch e T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p1.90 (1989)] usando a sonda de DNA da metanol desidrogenase produzida como descrito acima, para produzir deste modo uma cepa tendo um plasmídeo em que um  
10 fragmento de gene da metanol desidrogenase foi clonado. Depois, o plasmídeo foi recuperado da cepa e foi nomeado pUMDH. A determinação da seqüência de nucleotídeo de um fragmento clonado em pUMDH revelou que o gene da metanol desidrogenase de *M metilotrophus* ATCC 53528 teve uma seqüência de nucleotídeo 95 % ou mais homóloga a um gene da metanol desidrogenase de *M metilotrophus* cepa W3A1 (SEQ ID NO: 13). A  
15 determinação da seqüência de nucleotídeo revelou que o fragmento PvuJI de cerca de 5,5 kb incluíram um gene de tamanho natural da metanol desidrogenase e uma região de cerca de 2,5 kb a montante do lado 5' do gene. A seqüência de nucleotídeo foi determinada usando um kit de seqüenciamento de ciclo terminador de pigmento (fabricado pela PE Applied Biosystems) e  
20 um seqüenciador de DNA 373A (fabricado pela PE Applied Biosystems).

(2) A aquisição do gene da fitase que é derivado de *Escherichia coli* Cepa K-12 e construção de plasmídeo de secretor de expressão

A seqüência do gene da fitase derivada de *Escherichia coli* Cepa K-12 já foi determinada (Acesso no Genbank Nº AE000200: SEQ ID  
25 NO: 15). Com base na seqüência, os iniciadores mostrados nas SEQ ID NOS: 7 e 8 foram sintetizados e uma região que codifica uma seqüência da fitase (madura) foi amplificada por um método de PCR a partir do DNA cromossômico da *Escherichia coli* Cepa K-12 preparado de acordo com o método de Saito e Miura. A PCR foi realizada usando a Pyrobest DNA

polimerase (fabricada por TAKARA BIO INC.) e as condições de reação foram de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

Subseqüentemente, a região promotora e região de seqüência de sinal da metanol desidrogenase foram amplificadas por um método de PCR usando os iniciadores mostrados nas SEQ ID NOS: 9 e 10 a partir de DNA cromossômico de *M. metilotrophus* ATCC 53528 preparado de acordo com o método de Saito e Miura. A PCR foi realizada usando Pyrobest DNA polimerase (fabricada pela TAKARA BIO INC.) e as condições de reação foram de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O iniciador mostrado na SEQ ID NO: 10 inclui uma seqüência que codifica a seqüência de aminoácido lateral de terminal N da fitase de modo a construir um gene de fusão com a fitase.

Em seguida, 1 µl de soluções de PCR de uma região que codifica a seqüência de fitase (tipo maduro) da *Escherichia coli* Cepa K-12 amplificada como descrito acima e a região promotora e a região de seqüência de sinal de *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528 amplificada como descrito acima foram misturadas para preparar um padrão e a PCR cruzada foi realizada usando os iniciadores das SEQ ID NOS: 9 e 8 para amplificar um gene de fusão da fitase conectado ao promotor e seqüência de sinal de um gene da metanol desidrogenase de *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528. A eletroforese em gel de agarose detectou um fragmento amplificado de cerca de 2,4 kb. O fragmento foi recuperado do gel de agarose usando EASYTRAP Ver.2 (fabricado pela TAKARA 1310 INC.) e inserido no sítio SmaI em pHSG398 (fabricado pela TAKARA 1310 INC.), para produzir deste modo pHSGMappA. A determinação da seqüência de nucleotídeo do fragmento inserido confirmou a construção de um gene de fusão antecipado. Subseqüentemente, um fragmento BamHI-KpnI de pHSGMappA foi recuperado do gel de agarose usando EASYTRAP Ver.2 (fabricado por TAKARA BIO INC.) e as extremidades do fragmento foram feitos abruptos

usando um kit DNA blunting (fabricado pela TAKARA 1310 INC.). Em seguida, um fragmento EcoRI de pAYCTER3 construído no Exemplo 1 (1) foi recuperado do gel de agarose usando EASYTRAP Ver.2 (fabricado pela TAKARA BIO INC.) e as extremidades do fragmento foram feitas abruptas usando um kit DNA blunting (fabricado pela TAKARA BIO INC.), seguido pela inserção do fragmento BamHI-KpnI abrupto, para produzir deste modo pAYCMappA. A determinação da seqüência de nucleotídeo do fragmento inserido confirmou a construção de um gene de fusão heterólogo antecipado.

(3) Expressão do gene da fitase em *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528

10 *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528 foi transformado com pAYCMappA (obtido pela conexão da seqüência promotora e seqüência de sinal da metanol desidrogenase derivada de *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528 ao gene da fitase derivado de *Escherichia coli* Cepa K-12) construído acima (2) e com pAYCTER3 (controle), respectivamente e cepas que cresceram em meio de SEIIA ágar (5 g de sulfato de amônio, 1,9 g de  $K_2HPO_4$ , 1,56 g de  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , 200 mg de sulfato de magnésio, 72 mg de cloreto de cálcio, 5  $\mu$ g de sulfato de cobre, 25  $\mu$ g de sulfato de manganês, 23  $\mu$ g de sulfato de zinco, 9,7 mg de tricloreto de ferro e 15 g de ágar foram dissolvidos em água a 1 L e a solução foi ajustada ao pH 7,0) contendo 25 mg/l de ampicilina e 1 % de metanol foram selecionadas. Subseqüentemente, a *M. metilotrophus* cepa ATCC 53528 selecionada tendo pAYCMappA ou pAYCTER3 foi cultivada em meio líquido SEIIA contendo 25 mg/l de ampicilina e 2 % de metanol a 37°C por 48 horas. Depois da conclusão da cultura, os sobrenadantes de cultura de células bacterianas de *M. metilotrophus* cepas ATCC 53528 tendo pAYCMappA ou pAYCTER3 foram submetidas à SDS-PAGE e como um resultado, uma proteína tendo um peso molecular objeto foi detectada apenas no sobrenadante de cultura da cepa tendo pAYCMappA. Subseqüentemente, os sobrenadantes de cultura das cepas foram usados como soluções de enzima bruta para determinar a

atividade de fitase. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o relato publicado (J AOAC Int. Maio-Junho de 1994; 77(3): 760-4.). Como um resultado, no caso de *M metilotrophus* ATCC 53528 tendo pAYCTER3, a atividade enzimática não foi detectada no sobrenadante de cultura, enquanto  
5 que no caso de *M metilotrophus* ATCC 53528 tendo pAYCMappA, a atividade enzimática foi detectada (60 FTU/ml, 37°C, pH 5,5) no sobrenadante de cultura, que revelou que a cepa secretou fitase no sobrenadante de cultura.

Exemplo 3: Expressão secretora de fosfatase ácida que é derivada de cepa de  
10 *Morganella morganii* em *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528

(1) Aquisição do gene da fosfatase ácida que é derivado de cepa da *Morganella morganii* e construção de um plasmídeo para a expressão secretora

A seqüência de um gene da fosfatase ácida derivada de cepa da  
15 *Morganella morganii* já foi determinada (Acesso no Genbank Nº AB035805: SEQ ID NO: 25). Com base na seqüência, os iniciadores mostrados nas SEQ ID NOS: 27 e 28 foram sintetizados e uma região que codifica uma seqüência da fosfatase ácida (tipo maduro) foi amplificada por um método de PCR a partir do DNA cromossômico de cepa da *Morganella morganii* preparada de  
20 acordo com o método de Saito e Miura. A PCR foi realizada usando Pyrobest DNA polimerase (fabricado pela TAKARA BIO INC.) e as condições de reação foram de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O iniciador mostrado na SEQ ID NO: 27 inclui uma seqüência que codifica a seqüência de aminoácido lateral do terminal C na seqüência de sinal da  
25 metanol desidrogenase de modo a construir um gene de fusão com a metanol desidrogenase de *M metilotrophus*.

Subseqüentemente, a região promotora e a região de seqüência de sinal da metanol desidrogenase foram amplificadas por um método de PCR usando os iniciadores mostrados nas SEQ ID NOS: 9 e 29 a partir de DNA

cromossômico de *M metilotrophus* ATCC 53528 preparado de acordo com o método de Saito e Miura. A PCR foi realizada usando Pyrobest DNA polimerase (fabricado pela TAKARA BIO INC.) e as condições de reação foram de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

5                   Em seguida, 1 µl das soluções de reação da PCR de uma região que codifica a seqüência da fosfatase ácida (madura) da cepa de *Morganella morganii* amplificada como descrita acima e a região promotora e região da seqüência de sinal de *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528 amplificadas como descrito acima foram misturadas para preparar um padrão  
10 e a PCR cruzada foi realizada usando os iniciadores das SEQ ID NOS: 9 e 28 para amplificar um gene de fusão da fosfatase ácida conectado ao promotor e seqüência de sinal de um gene da metanol desidrogenase de *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528. A Eletroforese em gel de agarose detectou um  
15 fragmento amplificado de cerca de 1,8 kb. O fragmento foi recuperado do gel de agarose usando EASYTRAP Ver.2 (fabricado pela TAKARA BIO INC.) e inserido no sítio SmaI em pHSG398 (fabricado pela TAKARA BIO INC.), para produzir deste modo pHSGMphoC. A determinação da seqüência de nucleotídeo do fragmento inserido confirmou a construção de um gene de fusão antecipado. A seqüência de nucleotídeo foi determinada usando um kit  
20 seqüenciador de ciclo terminador de pigmento (fabricado pela PE Applied Biosystems) e um Seqüenciador de DNA 373A (fabricado pela PE Applied Biosystems). Subseqüentemente, um fragmento BamHI-KpnI de pHSGMphoC foi recuperado do gel de agarose usando EASYTRAP Ver.2 (fabricado pela TAKARA BIO INC.) e as extremidades do fragmento foram  
25 terminadas abruptas usando um kit DNA blunting (fabricado pela TAKARA BIO INC.). Em seguida, um fragmento SmaI de pAYCTER3 construído no Exemplo 1 (1) foi recuperado do gel de agarose usando EASYTRAP Ver.2 (fabricado pela TAKARA BIO INC.) e seguido pela inserção do fragmento BamHI-KpnI terminado de modo abrupto, para produzir deste modo

pAYCMphoC. A determinação da seqüência de nucleotídeo do fragmento inserido confirmou a construção de um gene de fusão heterólogo.

(2) Expressão do gene da fosfatase ácida em *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528

5                    *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528 foi transformado com pAYCMphoC (obtido pela conexão da seqüência promotora e seqüência de sinal da metanol desidrogenase derivada de *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528 ao gene da fosfatase ácida derivado da cepa de *Morganella morgani*) construído acima (1) e com pAYCTER3 (controle) e cepas que cresceram em meio SEIIA ágar contendo 25 mg/l de ampicilina e 1 % de metanol foram selecionados. Subseqüentemente, as cepas de *M. metilotrophus* ATCC 53528 selecionadas tendo pAYCMphoC ou pAYCTER3 foram cultivadas em meio líquido SEIIA contendo 25 mg/l de ampicilina e 2 % de metanol a 37°C por 48 horas. Depois da conclusão da cultura, os sobrenadantes de cultura de células bacterianas de cepas de *M metilotrophus* ATCC 53528 tendo pAYCMphoC ou pAYCTER3 foram submetidos à SDS-PAGE e como um resultado, uma proteína tendo um peso molecular objeto de cerca de 25 kDa foi detectada apenas no sobrenadante de cultura da cepa tendo pAYCMphoC. Subseqüentemente, os sobrenadantes de cultura das cepas foram usados como soluções de enzima bruta usando substrato pNPP para determinar a atividade de fosfatase. Como um resultado, no caso de *M metilotrophus* ATCC 53528 tendo pAYCTER3, a atividade enzimática não foi detectada no sobrenadante de cultura, enquanto que no caso de *M metilotrophus* ATCC 53528 tendo pAYCMappA, a atividade enzimática foi detectada no sobrenadante de cultura, que revelou que a cepa secretou fosfatase ácida no sobrenadante de cultura.

Exemplo 4: Expressão secretora de fitase que é derivada da *Escherichia coli* Cepa K-12 substituída na seqüência de sinal em *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528

(1) Construção de plasmídeo secretor de expressão para a fitase que é derivada da *Escherichia coli* Cepa K-12 substituída na seqüência de sinal

A região promotora da metanol desidrogenase foi amplificada por um método de PCR usando os iniciadores mostrados nas SEQ ID NOS: 5 30 e 31 do DNA cromossômico de *M metilotrophus* ATCC 53528 preparado de acordo com o método de Saito e Miura. A PCR foi realizada usando Pyrobest DNA polimerase (fabricado pela TAKARA BIO INC.) e as condições de reação foram de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O iniciador mostrado na SEQ ID NO: 30 inclui uma seqüência de 10 reconhecimento de uma enzima de restrição Hind III.

De modo a usar uma seqüência de sinal de fitase derivada da *E. coli* Cepa K-12, um gene da fitase que inclui uma seqüência de sinal foi amplificada por um método de PCR usando os iniciadores mostrados nas SEQ ID NOS: 32 e 33 de DNA cromossômico da *E. coli* Cepa K-12 preparados de 15 acordo com o método de Saito e Miura. A PCR foi realizada usando Pyrobest DNA polimerase (fabricado pela TAKARA. BIO INC.) e as condições de reação foram de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O iniciador mostrado na SEQ ID NO: 32 inclui uma seqüência que codifica a seqüência de aminoácido lateral de terminal C na seqüência promotora da 20 metanol desidrogenase de modo a construir um gene de fusão com a metanol desidrogenase de *M metilotrophus* e o iniciador mostrado na SEQ ID NO: 33 inclui uma seqüência de reconhecimento de uma enzima de restrição KpnI.

Em seguida, 1 µl das soluções da reação de PCR de uma região que codifica a seqüência da fitase de *Escherichia coli* Cepa K-12 25 amplificada como descrito acima e a região promotora de *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528 amplificada como descrito acima foram misturadas para preparar um padrão e a PCR cruzada foi realizada usando os iniciadores das SEQ ID NOS: 30 e 33 para amplificar um gene de fusão de uma seqüência de sinal e um gene maduro da fitase de *E. coli* que foi

conectada ao promotor de um gene da metanol desidrogenase de *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528. A eletroforese em gel de agarose detectou um fragmento amplificado de cerca de 2,4 kb. O fragmento HindIII-KpnI foi recuperado do gel de agarose usando EASYTRAP Ver.2 (fabricado pela  
5 TAKARA BIO INC.) e inserido no sítio HindIII-KpnI em pAYCTER3 do Exemplo 1 (1), para produzir deste modo pAYCAappA. A determinação da seqüência de nucleotídeo do fragmento inserido confirmou a construção de um gene de fusão antecipado. A seqüência de nucleotídeo foi determinada usando um kit seqüenciador de ciclo terminador de pigmento (fabricado pela  
10 PE Applied Biosystems) e um Seqüenciador de DNA 373A (fabricado pela PE Applied Biosystems).

Por outro lado, de modo a usar uma seqüência de sinal da fosfatase ácida da cepa de *Morganella morganii*, um gene da fosfatase ácida que inclui uma seqüência de sinal foi amplificada por um método de PCR  
15 usando os iniciadores mostrados nas SEQ ID NOS: 34 e 28 a partir de DNA cromossômico da cepa de *M. morganii* preparada de acordo com o método de Saito e Miura. A PCR foi realizada usando Pyrobest DNA polimerase (fabricado pela TAKARA BIO INC.) e as condições de reação foram de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O iniciador mostrado  
20 na SEQ ID NO: 34 inclui uma seqüência que codifica a seqüência de aminoácido lateral de terminal C na seqüência promotora de metanol desidrogenase de modo a construir um gene de fusão com a metanol desidrogenase de *M metilotrophus*.

1 µl das soluções da reação de PCR do gene da fosfatase ácida  
25 amplificada como descrito acima e a região promotora mencionada acima da metanol desidrogenase foram misturados para preparar um padrão e a PCR cruzada foi realizada usando os iniciadores das SEQ ID NOS: 30 e 28 para amplificar um gene de fusão de uma seqüência de sinal e um gene maduro da fosfatase ácida de *M. morganii* que foi conectado ao promotor de um gene da

metanol desidrogenase de *M metilotrophus* ATCC 53528. Além disso, o promotor do gene da metanol desidrogenase de *M metilotrophus* ATCC 53528 e a seqüência de sinal da fosfatase ácida de *M morganii* foram amplificados usando o gene de fusão como um padrão e usando os iniciadores mostrados nas SEQ ID NOS: 30 e 35. O iniciador mostrado na SEQ ID NO: 35 inclui uma seqüência que codifica a seqüência de aminoácido do lado de terminal N em uma seqüência madura da fitase de modo a construir um gene de fusão com a fitase da *E. coli*.

10 1 µl das soluções de PCR do gene de fusão da região promotora da metanol desidrogenase e a seqüência de sinal da fosfatase ácida amplificada como descrito acima e o gene da fitase amplificada no Exemplo 2 (2) foram misturados para preparar um padrão e a PCR cruzada foi realizada usando os iniciadores das SEQ ID NOS: 30 e 33 para amplificar um gene de fusão da seqüência de sinal da fosfatase ácida de *M morganii* e um gene 15 maduro da fitase de *E. coli* que foi conectado ao promotor do gene da metanol desidrogenase de *M metilotrophus* ATCC 53528. A eletroforese em gel de agarose detectou um fragmento amplificado de cerca de 2,4 kb. O fragmento amplificado foi tratado com as enzimas de restrição HindIII e KpnI e o fragmento HindIII-KpnI foi recuperado do gel de agarose usando 20 EASYTRAP Ver.2 (fabricado pela TAKARA BIO INC.) e inserido no sítio HindIII-KpnI em pAYCTER3 obtido no Exemplo 1 (1), para produzir deste modo pAYCCappA. A determinação da seqüência de nucleotídeo do fragmento inserido confirmou a construção de um gene de fusão antecipado. A seqüência de nucleotídeo foi determinada usando um kit seqüenciador de 25 ciclo terminador de pigmento (fabricado pela PE Applied Biosystems) e um Seqüenciador de DNA 373A (fabricado pela PE Applied Biosystems).

(2) Expressão da fitase madura de *E. coli* conectada à seqüência de sinal da fitase de *E. coli* e a seqüência de sinal da fosfatase ácida de *M morganii* em *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528

*M. metilotrophus* ATCC 53528 foi transformada com pAYCAappA construído em (1) acima (obtido pela conexão da seqüência promotora da metanol desidrogenase derivada de *M. metilotrophus* ATCC 53528 e a seqüência de sinal da fitase derivada de *E. coli* a um gene de seqüência madura) e com pAYCCappA (obtido pela conexão da seqüência promotora da metanol desidrogenase derivada de *M. metilotrophus* ATCC 53528 e a seqüência de sinal da fosfatase ácida derivada de *M. morganii* ao gene da seqüência madura da fitase derivada de *E. coli*) e com pAYCTER3 (controle) e cepas que cresceram em meio SEIIA ágar contendo 25 mg/l de ampicilina e 1 % de metanol foram selecionadas. Subseqüentemente, as cepas de *M. metilotrophus* ATCC 53528 selecionadas tendo pAYCAappA, pAYCCappA ou pAYCTER3 foram cultivadas em meio líquido SEIIA contendo 25 mg/l de ampicilina e 2 % de metanol a 37°C por 48 horas. Depois da conclusão da cultura, os sobrenadantes de cultura de células bacterianas das cepas de *M. metilotrophus* ATCC 53528 tendo pAYCAappA, pAYCCappA ou pAYCTER3 foram submetidos à SDS-PAGE e como um resultado, uma proteína tendo um peso molecular objeto foi detectado apenas nos sobrenadantes de cultura da cepa tendo pAYCAappA e a cepa tendo pAYCCappA. Subseqüentemente, os sobrenadantes de cultura das cepas foram usados como soluções de enzima bruta para determinar a atividade da fitase. Como um resultado, no caso de *M. metilotrophus* ATCC 53528 tendo pAYCTER3, a atividade enzimática não foi detectada no sobrenadante de cultura, enquanto que nos casos de *M. metilotrophus* ATCC 53528 tendo pAYCAappA e pAYCCappA, as atividades enzimáticas foram detectadas nos sobrenadantes de cultura, que revelou que as cepas secretaram fitase no sobrenadante de culturas. A atividade enzimática foi determinada pelo mesmo método como descrito no Exemplo 2 acima.

Exemplo 5: Expressão secretora de fitase que é derivada de *Escherichia coli* Cepa K-12 substituída por promotor em *Metilophilus metilotrophus* ATCC

53528

(1) Construção de plasmídeo secretor de expressão para a fitase que é derivada de *Escherichia coli* Cepa K-12 substituída por promotor

De modo a usar um promotor tac, uma região promotora tac  
5 foi amplificada por um método de PCR usando pKK223-3 (fabricado pela Pharmacia) como um padrão e usando os iniciadores mostrados nas SEQ ID NOS: 36 e 37. A seqüência do promotor tac é mostrado na SEQ ID NO: 12. A PCR foi realizada usando Pyrobest DNA polimerase (fabricado pela TAKARA BIO INC.) e as condições de reação foram de acordo com o  
10 protocolo recomendado pelo fabricante. O iniciador mostrado na SEQ ID NO: 36 inclui uma seqüência de reconhecimento de um enzima de restrição EcoRI.

Um gene de fusão de uma seqüência de sinal da metanol desidrogenase derivada de *M metilotrophus* e fitase derivada de *E. coli* (madura) foi amplificada por um método de PCR usando pAYCMappA  
15 obtido no Exemplo 2 (2) como um padrão e usando os iniciadores mostrados nas SEQ ID NOS: 38 e 39. A PCR foi realizada usando Pyrobest DNA polimerase (fabricado pela TAKARA, BIO INC.) e as condições de reação foram de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O iniciador mostrado na SEQ ID NO: 38 inclui uma seqüência parcial do promotor tac de  
20 modo que a construir um gene de fusão com o promotor tac, enquanto que o iniciador mostrado na SEQ ID NO: 39 inclui uma seqüência de uma enzima de restrição EcoRI.

Subseqüentemente, 1 µl das soluções de reação de PCR de uma região que codifica a seqüência promotora tac amplificada como descrita  
25 acima e uma região que codifica um gene de fusão de uma seqüência de sinal da metanol desidrogenase derivada de *M metilotrophus* e a fitase derivada de *E. coli* (madura) amplificada como descrito acima foram misturadas para preparar um padrão e a PCR cruzada foi realizada usando os iniciadores das SEQ ID NOS: 36 e 39 para amplificar um gene obtido pela fusão da

seqüência de sinal da metanol desidrogenase derivada de *M metilotrophus* conectada ao promotor tac e o gene maduro da fitase derivada de *E. coli*. A eletroforese em gel de agarose detectou um fragmento amplificado de cerca de 1,6 kb. O fragmento amplificado foi tratado com EcoRI e o fragmento de EcoRI foi recuperado do gel de agarose usando EASYTRAP Ver.2 (fabricado pela TAKARA BIO INC.) e inserido no sítio EcoRI em pAYCTER3 obtido no Exemplo 1 (1), para produzir deste modo pAYCptacMappA. A determinação da seqüência de nucleotídeo do fragmento inserido confirmou a construção de um gene de fusão antecipado. A seqüência de nucleotídeo foi determinada usando um kit seqüenciador de ciclo terminador de pigmento (fabricado pela PE Applied Biosystems) e um Seqüenciador de DNA 373A (fabricado pela PE Applied Biosystems).

(2) Expressão de fitase que é derivada de *E. coli* conectada ao promotor tac em *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528

*M metilotrophus* ATCC 53528 foi transformada com pAYCptacMappA construído em (1) acima (obtido pela conexão da seqüência promotora tac e a seqüência de sinal da metanol desidrogenase derivada de *Metilophilus metilotrophus* ATCC 53528 ao gene da seqüência madura de fitase derivada de *E. coli*) e com pAYCTER3 (controle) e as cepas que cresceram em meio SEIIA ágar contendo 25 mg/l de ampicilina e 1 % de metanol foram selecionadas. Subseqüentemente, as cepas de *M metilotrophus* ATCC 53528 selecionadas tendo pAYCptacMappA ou pAYCTER3 foram cultivadas em meio líquido SEIIA contendo 25 mg/l de ampicilina e 2 % de metanol a 37°C por 48 horas. Depois da conclusão da cultura, os sobrenadantes de cultura de células bacterianas das cepas de *M metilotrophus*. ATCC 53528 tendo pAYCptacMappA ou pAYCTER3 foram submetidas a SDS-PAGE e como um resultado, uma proteína tendo um peso molecular objeto foi detectada apenas no sobrenadante de cultura da cepa tendo pAYCptacMappA. Subseqüentemente, os sobrenadantes de cultura das cepas

foram usados como soluções de enzima bruta para determinar a atividade da fitase. Como um resultado, no caso de *M. metilotrophus* ATCC 53528 tendo pAYCTER3, a atividade enzimática não foi detectada no sobrenadante de cultura, enquanto que no caso de *M. metilotrophus* ATCC 53528 tendo pAYCPTacMappA, a atividade enzimática foi detectada no sobrenadante de cultura, que revelou que a cepa secretou fitase no sobrenadante de cultura. A atividade enzimática foi determinada pelos mesmos métodos como aqueles descritos no Exemplo 2 acima.

Exemplo 6: Expressão secretora de beta-lactamase que é derivada de *Escherichia coli* Cepa K-12 em *Metilobacillus glycogenes* ATCC 29475

(1) Construção de plasmídeo de expressão que funcione em *Metilobacillus glycogenes* ATCC 29475, pAYCTER-tet

A cepa de *M. glycogenes* ATCC 29475 tem resistência à ampicilina e estreptomicina e tem sensibilidade à tetraciclina, assim um gene de resistência à tetraciclina foi introduzida no plasmídeo secretor de expressão pAYCTER3 produzido no Exemplo 1 (1). Isto é, um gene resistente à tetraciclina foi amplificado por um método de PCR usando pRK310 (descrito em Plasmid. Março de 1985; 13(2): 149-53) como um padrão e usando iniciadores das SEQ ID NOS: 23 e 24. A eletroforese em gel de agarose detectou um fragmento amplificado de cerca de 1,5 kb. O fragmento amplificado foi tratado com um enzima de restrição BamHI e recuperado do gel de agarose usando EASYTRAP Ver.2 (fabricado pela TAKARA BIO INC.) e inserido no sítio BamHI em pAYCTER3 obtido no Exemplo 1 (1), para produzir deste modo pAYCTER-tet. A determinação da seqüência de nucleotídeo do fragmento inserido confirmou a construção de um gene de fusão antecipado. Os iniciadores mostrados nas SEQ ID NOS: 23 e 24 incluem seqüências de reconhecimento da enzima de restrição BamHI e a seqüência de nucleotídeo foi determinada usando um kit seqüenciador de ciclo terminador de pigmento (fabricado pela PE Applied Biosystems) e um

Seqüenciador de DNA 373A (fabricado pela PE Applied Biosystems).

(2) Expressão secretora de beta-lactamase em *Metilobacillus glycogenes* ATCC 29475

*Metilobacillus glycogenes* ATCC 29475 foi transformada dentro de pAYCTER-tet construído em (1) acima e uma cepa que cresceu com meio de SEIIA ágar (5 g de sulfato de amônio, 1,9 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,56 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 200 mg de sulfato de magnésio, 72 mg de cloreto de cálcio, 5 µg de sulfato de cobre, 25 µg de sulfato de manganês, 23 µg de sulfato de zinco, 9,7 mg de tricloreto de ferro e 15 g de ágar foram dissolvidos em água até 1 L e a solução foi ajustada ao pH 7,0) contendo 5 mg/l de tetraciclina e 1 % de metanol foi selecionada. Subseqüentemente, a *M glycogenes* ATCC 29475 selecionada tendo pAYCTER-tet foi cultivada em meio líquido SEIIA contendo 5 mg/l de tetraciclina e 2 % de metanol a 30°C por 48 horas. Depois da conclusão da cultura, o sobrenadante de cultura das células bacterianas de *M. glycogenes* ATCC 29475 tendo pAYCTER-tet foi submetido a SDS-PAGE, para detectar deste modo uma proteína tendo o mesmo peso molecular como a beta-lactamase no sobrenadante de cultura.

A determinação da seqüência de terminal N da proteína usando um seqüenciador de proteína PP SQ-21A (fabricado pela Shimadzu Corporation) revelou que a seqüência foi uma seqüência madura de beta-lactamase e foi confirmado que a beta-lactamase foi secretada no sobrenadante de cultura.

Exemplo 7: Expressão secretora de fitase que é derivada de *Escherichia coli* Cepa K-12 em *Metilobacillus glycogenes* ATCC 29475

(1) Construção de plasmídeo secretor de expressão para a fitase que é derivada de *Escherichia coli* Cepa K-12 em *Metilobacillus glycogenes* ATCC 29475

De modo a realizar a expressão secretora de fitase derivada de *E. coli* na cepa de *M glycogenes* ATCC 29475, um fragmento tratado com

BamHI do gene resistente à tetraciclina produzido no Exemplo 6 (1) foi inserido no sítio BamHI no plasmídeo secretor de expressão da fitase pAYCPtacMappA produzido no Exemplo 5 (1), para produzir deste modo pAYCPtacMappA-tet. A determinação da seqüência de nucleotídeo do  
5 fragmento inserido confirmou a construção de um gene de fusão antecipado. A seqüência de nucleotídeo foi determinada usando um kit seqüenciador de ciclo terminador de pigmento (fabricado pela PE Applied Biosystems) e um Seqüenciador de DNA 373A (fabricado pela PE Applied Biosystems).

Expressão da fitase que é derivada de *E. coli* em  
10 *Metilobacillus glycogenes* ATCC 29475

*Metilobacillus glycogenes* ATCC 29475 foi transformado com pAYCPtacMappA-tet construído em (1) acima ou com pAYCTER-tet criado no Exemplo 6 (2) (controle) e as cepas que cresceram em meio de SEIIA ágar contendo 5 mg/l de tetraciclina e 1 % de metanol foram selecionadas.  
15 Subseqüentemente, as cepas de *M. glycogenes* ATCC 29475 selecionadas tendo pAYCPtacMappA-tet ou pAYCTER-tet foram cultivadas em meio líquido SEIIA contendo 5 mg/l de tetraciclina e 2 % de metanol a 37°C por 48 horas. Depois da conclusão da cultura, os sobrenadantes de cultura de células bacterianas da cepas de *M. glycogenes* ATCC 29475 tendo  
20 pAYCPtacMappA-tet ou pAYCTER-tet foram submetidos à SDS-PAGE e como um resultado, uma proteína tendo um peso molecular objeto foi detectada apenas no sobrenadante de cultura da cepa tendo pAYCPtacMappA-tet. Subseqüentemente, os sobrenadantes de cultura das  
25 cepas foram usados como soluções de enzima bruta para determinar a atividade da fitase. Como um resultado, no caso de *M. glycogenes* ATCC 29475 tendo pAYCTER-tet, a atividade enzimática não foi detectada no sobrenadante de cultura, enquanto que no caso de *M. glycogenes* ATCC 29475 tendo pAYCPtacMappA-tet, a atividade enzimática foi detectada no sobrenadante de cultura, que revelou que a cepa secretou fitase no

sobrenadante de cultura. A atividade enzimática foi determinada pelo mesmo método como aquele descrito no Exemplo 2 acima.

#### Aplicabilidade Industrial

5 De acordo com a presente invenção, é possível realizar produção secretora de uma proteína eficientemente e em custo baixo. Em particular, é possível realizar a produção secretora de uma proteína industrialmente útil, por exemplo, fitase ou semelhante.

LISTAGEM DA SEQUÊNCIA

<110> Ajinomoto Co., INC.  
 <120> C627-C6042  
 <130> Método para produzir uma proteína  
 <150> JP2005-139798  
 <151> 2005-05-12  
 <160> 39  
 <170> PatentIn version 3.1  
 <210> 1  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Iniciador PCR  
 <400> 1  
 aacgggtggc tactacagcc agcacaacag 30  
 <210> 2  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Iniciador PCR  
 <400> 2  
 ttttcagcca cgatcaggtt gccgttttcg 30  
 <210> 3  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> DNA sintético  
 <400> 3  
 aattcgagct cggtaccggg ggatcctcta gaggcgacct gcaggcatgc aagctta 57  
 <210> 4  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> DNA sintético  
 <400> 4  
 gatctaagct tgcattgctg caggctgact ctaggagatc cccgggtacc gagctcg 57

<210> 5  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
  
 <220>  
 <223> Iniciador PCR  
  
 <400> 5  
 ctatgatcat ttgcctggcg gcagtagcgc 30  
  
 <210> 6  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
  
 <220>  
 <223> Iniciador PCR  
  
 <400> 6  
 cttagatctc aaaaagagtt tgtagaaacg c 31  
  
 <210> 7  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
  
 <220>  
 <223> Iniciador PCR  
  
 <400> 7  
 cagagtgagc cggagctgaa gct 23  
  
 <210> 8  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
  
 <220>  
 <223> Iniciador PCR  
  
 <400> 8  
 acagttcttc gtttgtcatc agc 23  
  
 <210> 9  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
  
 <220>  
 <223> Iniciador PCR  
  
 <400> 9  
 ctgttctgc acctgcatgg catggc 26  
  
 <210> 10

<211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> Iniciador PCR

<400> 10  
 agcttcagct cgggctcact ctgtgccaca gccaggccgg aatgc

46

<210> 11  
 <211> 1000  
 <212> DNA  
 <213> *Methylophilus methylotrophus*

<220>  
 <223> promotor de metanol desidrogenase

<400> 11  
 ctgttcctgc acctgcatgg catggcgcgc caataccctg ttttctttca gtgtacgctc 60  
 aagatcttgc tctaccaggc attgctcggg catatcgacc agataacccat gaatctgggc 120  
 agcatcatga atatcttcag cggggacgta aataaagcgg gcgccgacat agcaaggcaa 180  
 cccatccggc cgacggatct gcagtttatt gaaattgatt tccttgtgat gctgcaactg 240  
 cagcacaaac tccggccaat gaaaagaaaa cagacggctg gcattgcggt tgggtgctgag 300  
 cgggcgggcag atacgggtcaa aagcacgatt atgcatgcca atattgcctt caacatccag 360  
 caccacgttg cccgtcaggc cgccatcaaa aagcgtgata tagagttgct ggctgttgcg 420  
 taactgcatt tcagtttggt tgcggcgctg aatttctgcg tggatctcct gcatgctcgc 480  
 ctggctgaac cacacactca gtaacacaaa cacaaacagg gtgagcggga tttcatccag 540  
 ttgggcatat tcataggtca gcagccaggc ggtgacacgt tccggccaagt caaattgtga 600  
 cgacaaaaca aaagtccagtg ccacgcctgc gatcacgatg agcgtgtcac gactggagcg 660  
 gcttaatttg cccagctttt gaatgtcagt aatcacaggg atagaccggt tataagaatg 720  
 catgatgagg tgaccaaata cttccaaatt gcttctgcac gcgaatatga gggcatgta 780  
 cagacatgcg cactatagac cacattcatt gccattgccc cgtgaaaaat tccctttatt 840  
 ggccggctctg taggaatgaa ttcttgaatc catcataggg aatctttcat ctattgcctt 900  
 tgttagaaat tattaacaat tcggttcgtg aagtgcggca ttcggggggg tgtctgccac 960  
 aacacttaa aaacgcattc ttaagagatt gggagaaagt 1000

<210> 12  
 <211> 151  
 <212> DNA  
 <213> *Escherichia coli*

<220>  
 <223> tac promoter

<400> 12  
 cccgttctgg ataatgtttt ttgcgccgac atcataacgg ttctggcaaa tattctgaaa 60  
 tgagctgttg acaattaatc atcggctcgt ataatgtgtg gaattgtgag cggataacaa 120  
 tttcaccctg caggcaaagg agatgagcgt a 151

<210> 13  
 <211> 1722  
 <212> DNA  
 <213> *Methylophilus methylotrophus*

<220>  
 <223> gene metanol desidrogenase

<220>  
 <221> CDS

&lt;222&gt; (1)..(1722)

&lt;400&gt; 13

atg gca gat gca gac ctg gac aag cag gtg aat aca gcc ggt gct tgg	48
Met Ala Asp Ala Asp Leu Asp Lys Gln Val Asn Thr Ala Gly Ala Trp	
1 5 10 15	
cca att gca acg ggt ggc tac tac agc cag cac aac agt ccg ctg gca	96
Pro Ile Ala Thr Gly Gly Tyr Tyr Ser Gln His Asn Ser Pro Leu Ala	
20 25 30	
caa att aac aaa tcc aac gtt aaa aac gtc aaa gca gcc tgg tca ttt	144
Gln Ile Asn Lys Ser Asn Val Lys Asn Val Lys Ala Ala Trp Ser Phe	
35 40 45	
tca acg ggt gtc ttg aat ggt cac gaa ggt gcg cca ttg gtc atc ggt	192
Ser Thr Gly Val Leu Asn Gly His Glu Gly Ala Pro Leu Val Ile Gly	
50 55 60	
gac atg atg tat gtg cac tcc gct ttt cca aac aat act tat gcg ctg	240
Asp Met Met Tyr Val His Ser Ala Phe Pro Asn Asn Thr Tyr Ala Leu	
65 70 75 80	
aat ctg aac gat cca ggc aag att gtc tgg caa cac aag cct aag caa	288
Asn Leu Asn Asp Pro Gly Lys Ile Val Trp Gln His Lys Pro Lys Gln	
85 90 95	
gat gct tcc acc aaa gcc gtg atg tgc tgt gac gtg gtt gac cgt ggt	336
Asp Ala Ser Thr Lys Ala Val Met Cys Cys Asp Val Val Asp Arg Gly	
100 105 110	
ctg gct tac ggc gcg ggg caa att gtt aaa aaa caa gcc aac ggt cac	384
Leu Ala Tyr Gly Ala Gly Gln Ile Val Lys Lys Gln Ala Asn Gly His	
115 120 125	
ttg ctg gcg ttg gat gcc aaa act ggc aaa atc aac tgg gaa gta gaa	432
Leu Leu Ala Leu Asp Ala Lys Thr Gly Lys Ile Asn Trp Glu Val Glu	
130 135 140	
gtg tgt gat cca aaa gtg ggt tca aca ctg aca caa gcg cct ttt gtg	480
Val Cys Asp Pro Lys Val Gly Ser Thr Leu Thr Gln Ala Pro Phe Val	
145 150 155 160	
gct aaa gac acg gta ttg atg ggg tgt tca ggt gct gag ctg ggt gta	528
Ala Lys Asp Thr Val Leu Met Gly Cys Ser Gly Ala Glu Leu Gly Val	
165 170 175	
cgf ggt gct gtg aac gcc ttt gac ctg aaa aca ggt gaa ttg aaa tgg	576
Arg Gly Ala Val Asn Ala Phe Asp Leu Lys Thr Gly Glu Leu Lys Trp	
180 185 190	
cgf gca ttt gca acc ggt tct gat gac tct gtt cgc ctg gcc aaa gac	624
Arg Ala Phe Ala Thr Gly Ser Asp Asp Ser Val Arg Leu Ala Lys Asp	
195 200 205	
ttc aac agt gca aac cca cat tac ggt caa ttc ggc ctg ggg act aaa	672
Phe Asn Ser Ala Asn Pro His Tyr Gly Gln Phe Gly Leu Gly Thr Lys	
210 215 220	
acc tgg gaa ggc gat gcc tgg aaa att ggt ggc ggt acc aac tgg ggt	720
Thr Trp Glu Gly Asp Ala Trp Lys Ile Gly Gly Gly Thr Asn Trp Gly	
225 230 235 240	
tgg tat gcc tat gac cct aaa ttg aac ctg ttc tac tac ggt tca ggt	768
Trp Tyr Ala Tyr Asp Pro Lys Leu Asn Leu Phe Tyr Tyr Gly Ser Gly	
245 250 255	
aac ccg gcc cca tgg aac gaa acc atg cgt cct ggc gac aac aag tgg	816
Asn Pro Ala Pro Trp Asn Glu Thr Met Arg Pro Gly Asp Asn Lys Trp	
260 265 270	
acg atg acc atc tgg ggt cgt gac ctc gac acc ggc atg gcg aaa tgg	864
Thr Met Thr Ile Trp Gly Arg Asp Leu Asp Thr Gly Met Ala Lys Trp	
275 280 285	
ggc tac caa aaa acg ccg cat gat gag tgg gac ttt gct ggt gtg aat	912
Gly Tyr Gln Lys Thr Pro His Asp Glu Trp Asp Phe Ala Gly Val Asn	
290 295 300	
cag atg gtg ctg act gat caa cca gtc aac ggc aaa atg acg ccg ctg	960
Gln Met Val Leu Thr Asp Gln Pro Val Asn Gly Lys Met Thr Pro Leu	
305 310 315 320	

ctg agc cac atc gac cgt aac ggt atc ttg tac aca ctg aac cgc gaa 1008  
 Leu Ser His Ile Asp Arg Asn Gly Ile Leu Tyr Thr Leu Asn Arg Glu  
 325 330 335  
 aac ggc aac ctg atc gtg gct gaa aaa gtg gac ccg gct gtc aac gtg 1056  
 Asn Gly Asn Leu Ile Val Ala Glu Lys Val Asp Pro Ala Val Asn Val  
 340 345 350  
 ttc aaa aaa gtg gac ctg aaa act ggg aca cca gtc cgt gac ccg gaa 1104  
 Phe Lys Lys Val Asp Leu Lys Thr Gly Thr Pro Val Arg Asp Pro Glu  
 355 360 365  
 ttc gcg aca cgt atg gac cat aaa ggc acc aac att tgt cca tcc gcg 1152  
 Phe Ala Thr Arg Met Asp His Lys Gly Thr Asn Ile Cys Pro Ser Ala  
 370 375 380  
 atg ggc ttc cac aac cag ggt gtt gac tct tac gat cca gaa agc cgc 1200  
 Met Gly Phe His Asn Gln Gly Val Asp Ser Tyr Asp Pro Glu Ser Arg  
 385 390 395 400  
 acc ttg tac gct ggc ctg aac cac att tgt atg gat tgg gag ccg ttc 1248  
 Thr Leu Tyr Ala Gly Leu Asn His Ile Cys Met Asp Trp Glu Pro Phe  
 405 410 415  
 atg ctg cca tac cgt gcc ggt cag ttc ttc gtt ggt gca acg ctg gcg 1296  
 Met Leu Pro Tyr Arg Ala Gly Gln Phe Phe Val Gly Ala Thr Leu Ala  
 420 425 430  
 atg tac cct ggc ccg aac ggc cca acc aag aaa gaa atg ggt cag att 1344  
 Met Tyr Pro Gly Pro Asn Gly Pro Thr Lys Lys Glu Met Gly Gln Ile  
 435 440 445  
 cgt gca ttt gac ctg acc act ggt aaa gct aaa tgg act aag tgg gag 1392  
 Arg Ala Phe Asp Leu Thr Thr Gly Lys Ala Lys Trp Thr Lys Trp Glu  
 450 455 460  
 aaa ttc gcg gct tgg ggc ggt act ttg tac acc aaa ggt ggc ctg gtt 1440  
 Lys Phe Ala Ala Trp Gly Gly Thr Leu Tyr Thr Lys Gly Gly Leu Val  
 465 470 475 480  
 tgg tat gca acg ctg gat ggt tac ctg aaa gcc ttg gat aac aaa gac 1488  
 Trp Tyr Ala Thr Leu Asp Gly Tyr Leu Lys Ala Leu Asp Asn Lys Asp  
 485 490 495  
 ggt aaa gag ctg tgg aac ttc aag atg cca tct ggt ggt atc gga tcg 1536  
 Gly Lys Glu Leu Trp Asn Phe Lys Met Pro Ser Gly Gly Ile Gly Ser  
 500 505 510  
 cca atg act tac tcc ttt aaa ggc aag caa tac atc ggc agc atg tac 1584  
 Pro Met Thr Tyr Ser Phe Lys Gly Lys Gln Tyr Ile Gly Ser Met Tyr  
 515 520 525  
 ggt gtt ggc ggc tgg cct ggc gtg ggt ctg gtg ttt gac ctg aca gac 1632  
 Gly Val Gly Gly Trp Pro Gly Val Gly Leu Val Phe Asp Leu Thr Asp  
 530 535 540  
 ccg agt gct ggt ttg ggt gcg gtg ggt gcg ttc aga gaa ctg caa aac 1680  
 Pro Ser Ala Gly Leu Gly Ala Val Gly Ala Phe Arg Glu Leu Gln Asn  
 545 550 555 560  
 cac aca caa atg ggc ggt ggc ctg atg gtg ttc agc ctg taa 1722  
 His Thr Gln Met Gly Gly Gly Leu Met Val Phe Ser Leu  
 565 570

<210> 14

<211> 573

<212> PRT

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<220>

<223> proteína de metanol desidrogenase

<400> 14

Met Ala Asp Ala Asp Leu Asp Lys Gln Val Asn Thr Ala Gly Ala Trp  
 1 5 10 15  
 Pro Ile Ala Thr Gly Gly Tyr Tyr Ser Gln His Asn Ser Pro Leu Ala  
 20 25 30  
 Gln Ile Asn Lys Ser Asn Val Lys Asn Val Lys Ala Ala Trp Ser Phe



Pro Ser Ala Gly Leu Gly Ala Val Gly Ala Phe Arg Glu Leu Gln Asn  
 545 550 555 560  
 His Thr Gln Met Gly Gly Gly Leu Met Val Phe Ser Leu  
 565 570

<210> 15  
 <211> 1299  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

<220>  
 <223> gene fitase

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1299)

<400> 15  
 atg aaa gcg atc tta atc cca ttt tta tct ctt ctg att ccg tta acc 48  
 Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr  
 1 5 10 15  
 ccg caa tct gca ttc gct cag agt gag ccg gag ctg aag ctg gaa agt 96  
 Pro Gln Ser Ala Phe Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser  
 20 25 30  
 gtg gtg att gtc agt cgt cat ggt gtg cgt gct cca acc aag gcc acg 144  
 Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr  
 35 40 45  
 caa ctg atg cag gat gtc acc cca gac gca tgg cca acc tgg ccg gta 192  
 Gln Leu Met Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val  
 50 55 60  
 aaa ctg ggt tgg ctg aca ccg cgc ggt ggt gag cta atc gcc tat ctc 240  
 Lys Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 gga cat tac caa cgc cag cgt ctg gta gcc gac gga ttg ctg gcg aaa 288  
 Gly His Tyr Gln Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys  
 85 90 95  
 aag ggc tgc ccg cag tct ggt cag gtc gcg att att gct gat gtc gac 336  
 Lys Gly Cys Pro Gln Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp  
 100 105 110  
 gag cgt acc cgt aaa aca ggc gaa gcc ttc gcc gcc ggg ctg gca cct 384  
 Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro  
 115 120 125  
 gac tgt gca ata acc gta cat acc cag gca gat acg tcc agt ccc gat 432  
 Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp  
 130 135 140  
 ccg tta ttt aat cct cta aaa act ggc gtt tgc caa ctg gat aac gcg 480  
 Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala  
 145 150 155 160  
 aac gtg act gac gcg atc ctc agc agg gca gga ggg tca att gct gac 528  
 Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp  
 165 170 175  
 ttt acc ggg cat cgg caa acg gcg ttt cgc gaa ctg gaa cgg gtg ctt 576  
 Phe Thr Gly His Arg Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu  
 180 185 190  
 aat ttt ccg caa tca aac ttg tgc ctt aaa cgt gag aaa cag gac gaa 624  
 Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu  
 195 200 205  
 agc tgt tca tta acg cag gca tta cca tcg gaa ctc aag gtg agc gcc 672  
 Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala  
 210 215 220  
 gac aat gtc tca tta acc ggt gcg gta agc ctc gca tca atg ctg acg 720

Asp	Asn	Val	Ser	Leu	Thr	Gly	Ala	Val	Ser	Leu	Ala	Ser	Met	Leu	Thr		
225					230					235					240		
gag	ata	ttt	ctc	ctg	caa	caa	gca	cag	gga	atg	ccg	gag	ccg	ggg	tgg	768	
Glu	Ile	Phe	Leu	Leu	Gln	Gln	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Glu	Pro	Gly	Trp		
			245						250					255			
gga	agg	atc	acc	gat	tca	cac	cag	tgg	aac	acc	ttg	cta	agt	ttg	cat	816	
Gly	Arg	Ile	Thr	Asp	Ser	His	Gln	Trp	Asn	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	His		
			260					265						270			
aac	gcg	caa	ttt	tat	ttg	cta	caa	cgc	acg	cca	gag	gtt	gcc	cgc	agc	864	
Asn	Ala	Gln	Phe	Tyr	Leu	Leu	Gln	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Ala	Arg	Ser		
		275					280						285				
cgc	gcc	acc	ccg	tta	tta	gat	ttg	atc	aag	aca	gcg	ttg	acg	ccc	cat	912	
Arg	Ala	Thr	Pro	Leu	Leu	Asp	Leu	Ile	Lys	Thr	Ala	Leu	Thr	Pro	His		
	290					295					300						
cca	ccg	caa	aaa	cag	gcg	tat	ggt	gtg	aca	tta	ccc	act	tca	gtg	ctg	960	
Pro	Pro	Gln	Lys	Gln	Ala	Tyr	Gly	Val	Thr	Leu	Pro	Thr	Ser	Val	Leu		
305				310						315					320		
ttt	atc	gcc	gga	cac	gat	act	aat	ctg	gca	aat	ctc	ggc	ggc	gca	ctg	1008	
Phe	Ile	Ala	Gly	His	Asp	Thr	Asn	Leu	Ala	Asn	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu		
			325						330					335			
gag	ctc	aac	tgg	acg	ctt	ccc	ggt	cag	ccg	gat	aac	acg	ccg	cca	ggt	1056	
Glu	Leu	Asn	Trp	Thr	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly		
			340					345					350				
ggt	gaa	ctg	gtg	ttt	gaa	cgc	tgg	cgt	cgg	cta	agc	gat	aac	agc	cag	1104	
Gly	Glu	Leu	Val	Phe	Glu	Arg	Trp	Arg	Arg	Leu	Ser	Asp	Asn	Ser	Gln		
		355					360					365					
tgg	att	cag	ggt	tcg	ctg	gtc	ttc	cag	act	tta	cag	cag	atg	cgt	gat	1152	
Trp	Ile	Gln	Val	Ser	Leu	Val	Phe	Gln	Thr	Leu	Gln	Gln	Met	Arg	Asp		
	370					375					380						
aaa	acg	ccg	ctg	tca	tta	aat	acg	ccg	ccc	gga	gag	gtg	aaa	ctg	acc	1200	
Lys	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Glu	Val	Lys	Leu	Thr		
385					390					395					400		
ctg	gca	gga	tgt	gaa	gag	cga	aat	gcg	cag	ggc	atg	tgt	tcg	ttg	gca	1248	
Leu	Ala	Gly	Cys	Glu	Glu	Arg	Asn	Ala	Gln	Gly	Met	Cys	Ser	Leu	Ala		
			405					410						415			
ggt	ttt	acg	caa	atc	gtg	aat	gaa	gca	cgc	ata	ccg	gcg	tgc	agt	ttg	1296	
Gly	Phe	Thr	Gln	Ile	Val	Asn	Glu	Ala	Arg	Ile	Pro	Ala	Cys	Ser	Leu		
			420					425						430			
taa																1299	

<210> 16  
 <211> 432  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<220>  
 <223> proteína fitase

<400> 16  
 Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Pro Gln Ser Ala Phe Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser  
 20 25 30  
 Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr  
 35 40 45  
 Gln Leu Met Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val  
 50 55 60  
 Lys Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Gly His Tyr Gln Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys  
 85 90 95  
 Lys Gly Cys Pro Gln Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp

			100					105					110			
Glu	Arg	Thr	Arg	Lys	Thr	Gly	Glu	Ala	Phe	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Pro	
			115					120					125			
Asp	Cys	Ala	Ile	Thr	Val	His	Thr	Gln	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Pro	Asp	
			130					135					140			
Pro	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Lys	Thr	Gly	Val	Cys	Gln	Leu	Asp	Asn	Ala	
145						150				155					160	
Asn	Val	Thr	Asp	Ala	Ile	Leu	Ser	Arg	Ala	Gly	Gly	Ser	Ile	Ala	Asp	
						165				170					175	
Phe	Thr	Gly	His	Arg	Gln	Thr	Ala	Phe	Arg	Glu	Leu	Glu	Arg	Val	Leu	
			180					185						190		
Asn	Phe	Pro	Gln	Ser	Asn	Leu	Cys	Leu	Lys	Arg	Glu	Lys	Gln	Asp	Glu	
			195				200						205			
Ser	Cys	Ser	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	Pro	Ser	Glu	Leu	Lys	Val	Ser	Ala	
			210				215						220			
Asp	Asn	Val	Ser	Leu	Thr	Gly	Ala	Val	Ser	Leu	Ala	Ser	Met	Leu	Thr	
225						230						235			240	
Glu	Ile	Phe	Leu	Leu	Gln	Gln	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Glu	Pro	Gly	Trp	
						245				250					255	
Gly	Arg	Ile	Thr	Asp	Ser	His	Gln	Trp	Asn	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	His	
			260					265						270		
Asn	Ala	Gln	Phe	Tyr	Leu	Leu	Gln	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Ala	Arg	Ser	
			275					280						285		
Arg	Ala	Thr	Pro	Leu	Leu	Asp	Leu	Ile	Lys	Thr	Ala	Leu	Thr	Pro	His	
			290				295						300			
Pro	Pro	Gln	Lys	Gln	Ala	Tyr	Gly	Val	Thr	Leu	Pro	Thr	Ser	Val	Leu	
305						310						315			320	
Phe	Ile	Ala	Gly	His	Asp	Thr	Asn	Leu	Ala	Asn	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	
				325						330				335		
Glu	Leu	Asn	Trp	Thr	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	
			340					345						350		
Gly	Glu	Leu	Val	Phe	Glu	Arg	Trp	Arg	Arg	Leu	Ser	Asp	Asn	Ser	Gln	
			355					360					365			
Trp	Ile	Gln	Val	Ser	Leu	Val	Phe	Gln	Thr	Leu	Gln	Gln	Met	Arg	Asp	
			370				375						380			
Lys	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Glu	Val	Lys	Leu	Thr	
385						390					395				400	
Leu	Ala	Gly	Cys	Glu	Glu	Arg	Asn	Ala	Gln	Gly	Met	Cys	Ser	Leu	Ala	
				405					410					415		
Gly	Phe	Thr	Gln	Ile	Val	Asn	Glu	Ala	Arg	Ile	Pro	Ala	Cys	Ser	Leu	
			420					425						430		

<210> 17

<211> 81

<212> DNA

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<220>

<223> gene codificando uma seqüência de sinal de metanol desidrogenase

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(81)

<400> 17

atg	aaa	ctg	aaa	tca	tcc	cgt	gcc	gtt	gtt	ggc	gct	ttg	gtt	ggg	ggc	48
Met	Lys	Leu	Lys	Ser	Ser	Arg	Ala	Val	Val	Gly	Ala	Leu	Val	Gly	Gly	
1				5				10						15		
ttg	ttt	gca	agc	att	tcc	ggc	ctg	gct	gtg	gca						81
Leu	Phe	Ala	Ser	Ile	Ser	Gly	Leu	Ala	Val	Ala						
			20						25							

<210> 18  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Methylophilus methylotrophus

<220>  
 <223> seqüência de sinal de metanol desidrogenase

<400> 18  
 Met Lys Leu Lys Ser Ser Arg Ala Val Val Gly Ala Leu Val Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Phe Ala Ser Ile Ser Gly Leu Ala Val Ala  
 20 25

<210> 19  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> Methylophilus methylotrophus

<220>  
 <223> gene codificando uma seqüência de sinal de fitase

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(66)

<400> 19  
 atg aaa gcg atc tta atc cca ttt tta tot ctt ctg att ccg tta acc 48  
 Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr  
 1 5 10 15  
 ccg caa tct gca ttc gct 66  
 Pro Gln Ser Ala Phe Ala  
 20

<210> 20  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Methylophilus methylotrophus

<220>  
 <223> seqüência de sinal de fitase

<400> 20

Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Pro Gln Ser Ala Phe Ala  
 20

<210> 21  
 <211> 864  
 <212> DNA  
 <213> Methylophilus methylotrophus

<220>  
 <223> promoter of sigma E gene

<400> 21  
 gatcaaaaac gatttggcat gcggatggta aaggcaggtg gggtgaaact gcacaaattc 60  
 caggttggct acccggcaac cggcccgcga tcccatcgca atcccgtcac cggactgat 120

gtctgggttg	gtggtatata	agtagacctt	gcctgcgccc	cctggtgcca	tcacgggtga	180
ttgtgcggag	agagtaatca	ccttgccgga	ctggttggtg	agcacatagg	cgcccaggca	240
acggttgggg	ccgtccggtt	cggtctgctt	gaagagttta	tgctgtgtga	tcagatcgac	300
tgcaatgtga	tgttcaagga	tggatgatatt	cggggtgctcg	cgcacacggt	cggtcaaggt	360
tgtctgcacc	gcttgtccgg	tggcatcagc	gacatgcacc	acgcgpcgat	ggctatggcc	420
gccttcacgc	gtcaggtgca	ggcggtcac	ttcagcctcg	cgggtaaaat	taacccttg	480
ctgtaataac	cattcaatac	tggcacggcc	attggtgacc	accatgcgcg	tgacctcgct	540
gtcacataat	ccagcgcgg	catccaatgt	atctttaata	tgggcttcta	ctgaatcctc	600
gttgtaaga	actgcagcaa	tccccctg	cgcccagttg	ctggcactca	tggtaattc	660
acgtttgctc	agtatgcata	ccctatgatt	atctgccagg	cgtaaggcca	atgactggcc	720
tgccagacca	ctgccaataa	tcagcacatc	gaacatttta	ttcataggat	ggtgggggtca	780
atggaacttt	gaagagatgt	tcaggtcata	tcaattgcca	acattgctat	ttgacattgt	840
aggcaaaaa	taagggatga	gacg				864

<210> 22

<211> 1276

<212> DNA

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<220>

<223> promotor de gene de proteína de ribossoma

<400> 22

gatctggcac	aaacattgaa	caattaggca	gtctcccttt	ccaaattaaa	tcgtgtattg	60
gataaaatag	cgtttgttac	gcacagactg	agcatttttt	ctgtaggta	atcaatgggc	120
atattgaaca	aacttccagg	tggagtacg	taccccagcc	ataaagaatg	gcagttatta	180
aaaaaactgc	caaaatgggtg	gctgggtggg	acagtactgt	tcgcagcccc	tattgtgcat	240
gcctgggtggc	aagacgggtga	tttgctgacg	catgatattg	agcgtacctc	catgtttctg	300
ggcctgctgt	ttaccttctg	gttttttata	ggcgcgatga	tgattggcct	gatagtgatc	360
attatcatga	aagggccagg	ctatgtatca	gaccttatt	acctaccaa	ggaagacaaa	420
agcctggaga	atccaccag	agaggaataa	gtgcttgatt	gcaacatgaa	aatcagttta	480
taatcgcctg	tttttcaacc	ttgccacact	ttgttcgtga	ccttttaagt	gttttgacac	540
aaaaagggtt	ggctctgaag	gtggctttaa	accacaagga	aatctcatgc	gacactatga	600
aatcgtgttt	attgttcacc	ctgaccagag	tgaacaagtg	cctgcgatga	ttgagcgтта	660
ccgcgcacaa	atcacaggca	atggcggcaa	catccaccgt	ctggaagact	ggggccgccc	720
tcaacttgcc	tacccaattc	aaaagtaca	caaagcgcac	tatgtgttga	tgaacatcga	780
gtgcagccag	gaagtgcctg	aagagctgga	gcatggcttc	aaatttaacg	atgctgtatt	840
acgtcacctg	accatctcga	ctaaaacagc	cgtcacagca	ccaagcccaa	tgatgaaaga	900
ggaaaaatcc	aaaaccatcg	taggtgatgc	acctgctgcg	accactgagg	cagctgctta	960
agggttgtga	atagctggt	gattgctgca	accattcact	ctggtgaagc	gttgctgttac	1020
acaccggcag	gcttaccctt	gttgcgattg	caattgcaac	atgattcaga	acagcaagaa	1080
gccgggatga	atcgcaaggt	gcagtgtcag	ttacccgcag	tactgattgg	tgaaaaagcc	1140
aatctgcat	tgcaaacgcg	cgatcaaatc	aaagtaaaaag	ggtttttggc	acaacgcagt	1200
gcaaagagca	cacaggtggt	actgcacata	caagagttac	agcgaataca	gtattaaaga	1260
atttaaggag	tttcaa					1276

<210> 23

<211> 39

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador PCR

<400> 23

cccgatccg	cacggatcac	tgtattcggc	tgcaacttt	39
-----------	------------	------------	-----------	----

<210> 24

<211> 40

<212> DNA

<213> Sequência artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Iniciador PCR

&lt;400&gt; 24

cccggatccc cgtgttgcta ggatggttgt tcttggatca

40

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 750

&lt;212&gt; DNA

<213> *Morganella morganii*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(747)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; gene codificando fosfatase ácida

&lt;400&gt; 25

atg aag aag aat att atc gcc ggt tgt ctg ttc tca ctg ttt tcc ctt	48
Met Lys Lys Asn Ile Ile Ala Gly Cys Leu Phe Ser Leu Phe Ser Leu	
1 5 10 15	
tcc gcg ctg gcc gcg atc ccg gcg ggc aac gat gcc acc acc aag ccg	96
Ser Ala Leu Ala Ala Ile Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro	
20 25 30	
gat tta tat tat ctg aaa aat gaa cag gct atc gac agc ctg aaa ctg	144
Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Glu Gln Ala Ile Asp Ser Leu Lys Leu	
35 40 45	
tta ccg cca ccg ccg gaa gtc ggc agt att cag ttt tta aat gat cag	192
Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Gln Phe Leu Asn Asp Gln	
50 55 60	
gca atg tat gag aaa ggc cgt atg ctg cgc aat acc gag cgc gga aaa	240
Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Met Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys	
65 70 75 80	
cag gca cag gca gat gct gac ctg gcc gca ggg ggt gtg gca acc gca	288
Gln Ala Gln Ala Asp Ala Asp Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Ala	
85 90 95	
ttt tca ggg gca ttc ggc tat ccg ata acc gaa aaa gac tct ccg gag	336
Phe Ser Gly Ala Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ser Pro Glu	
100 105 110	
ctg tat aaa ctg ctg acc aat atg att gag gat gcc ggt gat ctt gcc	384
Leu Tyr Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala	
115 120 125	
acc cgc tcc gcc aaa gaa cat tac atg cgc atc cgg ccg ttt gcg ttt	432
Thr Arg Ser Ala Lys Glu His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe	
130 135 140	
tac ggc aca gaa acc tgt aat acc aaa gat cag aaa aaa ctc tcc acc	480
Tyr Gly Thr Glu Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Lys Lys Leu Ser Thr	
145 150 155 160	
aac gga tct tac ccg tca ggt cat acg tct atc ggc tgg gca acc gca	528
Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala	
165 170 175	
ctg gtg ctg gcg gaa gtg aac ccg gca aat cag gat gcg att ctg gaa	576
Leu Val Leu Ala Glu Val Asn Pro Ala Asn Gln Asp Ala Ile Leu Glu	
180 185 190	
cgg ggt tat cag ctc gga cag agc ccg gtg att tgc ggc tat cac tgg	624
Arg Gly Tyr Gln Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp	
195 200 205	
cag agt gat gtg gat gcc gcg ccg att gtc ggt tca gcc gct gtc gcg	672
Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Ala Val Ala	

```

      210                      215                      220
aca tta cat tcc gat ccg gca ttt cag gcg cag tta gcg aaa gcc aaa      720
Thr Leu His Ser Asp Pro Ala Phe Gln Ala Gln Leu Ala Lys Ala Lys
225                      230                      235                      240
cag gaa ttt gca caa aaa tca cag aaa taa
Gln Glu Phe Ala Gln Lys Ser Gln Lys
                      245

```

```

<210> 26
<211> 249
<212> PRT
<213> Morganella morganii

```

```

<220>
<223> gene codificando fosfatase ácida

```

```

<400> 26
Met Lys Lys Asn Ile Ile Ala Gly Cys Leu Phe Ser Leu Phe Ser Leu
1                      5                      10                      15
Ser Ala Leu Ala Ala Ile Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro
                20                      25                      30
Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Glu Gln Ala Ile Asp Ser Leu Lys Leu
                35                      40                      45
Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Gln Phe Leu Asn Asp Gln
                50                      55                      60
Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Met Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys
65                      70                      75                      80
Gln Ala Gln Ala Asp Ala Asp Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Ala
                85                      90                      95
Phe Ser Gly Ala Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ser Pro Glu
                100                      105                      110
Leu Tyr Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala
                115                      120                      125
Thr Arg Ser Ala Lys Glu His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe
130                      135                      140
Tyr Gly Thr Glu Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Lys Lys Leu Ser Thr
145                      150                      155                      160
Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala
                165                      170                      175
Leu Val Leu Ala Glu Val Asn Pro Ala Asn Gln Asp Ala Ile Leu Glu
                180                      185                      190
Arg Gly Tyr Gln Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp
                195                      200                      205
Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Ala Val Ala
210                      215                      220
Thr Leu His Ser Asp Pro Ala Phe Gln Ala Gln Leu Ala Lys Ala Lys
225                      230                      235                      240
Gln Glu Phe Ala Gln Lys Ser Gln Lys
                245

```

```

<210> 27
<211> 50
<212> DNA
<213> Sequência artificial

```

```

<220>
<223> Iniciador PCR

```

```

<400> 27
gcatttccgg cctggctgtg gcagcgatcc cggcgggcaa cgatgccacc

```

<210> 28  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
  
 <220>  
 <223> Iniciador PCR  
  
 <400> 28  
 ttatttctgt gatttttgtg caaattcc 28

<210> 29  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
  
 <220>  
 <223> Iniciador PCR  
  
 <400> 29  
 tgccacagcc aggccggaaa tgcttgcaaa caagc 35

<210> 30  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
  
 <220>  
 <223> Iniciador PCR  
  
 <400> 30  
 ggcaagcttc tgttctctgca cctgcatggc atggcgcgc 39

<210> 31  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
  
 <220>  
 <223> Iniciador PCR  
  
 <400> 31  
 acttttctccc aatctcttaa gaatgcg 27

<210> 32  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
  
 <220>  
 <223> Iniciador PCR  
  
 <400> 32  
 ttcttaagag attgggagaa agtatgaaag cgatcttaat ccatt 46

<210> 33  
 <211> 32

<212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
  
 <220>  
 <223> Iniciador PCR  
  
 <400> 33  
 ggcggtacca cagttcttcg tttgtcatca gc 32  
  
 <210> 34  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
  
 <220>  
 <223> Iniciador PCR  
  
 <400> 34  
 ttcttaagag attgggagaa agtatgaaga agaattattat cgccggttgt c 51  
  
 <210> 35  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
  
 <220>  
 <223> Iniciador PCR  
  
 <400> 35  
 agcttcagct ccggctcact ctgggccagc gcggaaaggg aaaac 45  
  
 <210> 36  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
  
 <220>  
 <223> Iniciador PCR  
  
 <400> 36  
 ttggaattcc ccgttctgga taatgttttt tgc 33  
  
 <210> 37  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
  
 <220>  
 <223> Iniciador PCR  
  
 <400> 37  
 tacgctcatc tcctttgcct gcaggg 26  
  
 <210> 38  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial

<220>

<223> Iniciador PCR

<400> 38

tgcaggcaaa ggagatgagc gtaatgaaac tgaaatcatc ccgtgc

46

<210> 39

<211> 32

<212> DNA

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Iniciador PCR

<400> 39

gccgaattca cagttcttcg tttgtcatca gc

32

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir uma proteína, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar uma bactéria que assimila metanol tendo uma construção de DNA que contenha uma seqüência promotora que funcione na bactéria que assimila metanol e uma seqüência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo contendo uma seqüência de sinal e uma seqüência da proteína alvo que está operavelmente conectada à seqüência promotora, em um meio líquido contendo metanol como uma fonte principal de carbono para permitir que a bactéria secrete a proteína alvo e recuperar a proteína alvo secretada.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a seqüência promotora que funciona na bactéria que assimila metanol é selecionada do grupo que consiste de um promotor da metanol desidrogenase, um promotor tac, um promotor  $\sigma E$  e um promotor de proteína ribossômica.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a seqüência promotora é uma seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 11, 12, 21 ou 22.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a seqüência de sinal é uma seqüência de sinal de uma proteína selecionada da metanol desidrogenase, fitase e fosfatase ácida.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a seqüência de sinal tem uma seqüência de aminoácido selecionada da SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 20.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a bactéria que assimila metanol é uma bactéria selecionada do grupo que consiste de bactérias pertencentes aos gêneros *Metilophilus*, *Metilobacillus*, *Metilophaga*, *Achromobacter*,

*Pseudomonas*, *Protaminobacter*, *Metanomona*, *Microcycclus* e *Metilobactéria*.

5 7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a proteína é selecionada do grupo que consiste de fitase, interleucina, transglutaminase, interferon, insulina, fosfatase ácida e peptídeo sintase.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a bactéria que assimila metanol é uma bactéria que assimila metanol forçada.

10 9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a bactéria que assimila metanol forçada é selecionada do grupo que consiste de bactérias pertencentes aos gêneros *Metilophilus*, *Metilobacillus* e *Metilophaga*.

RESUMO“MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA PROTEÍNA”

Cultivando-se uma bactéria que assimile metanol tendo uma construção de DNA contendo uma seqüência promotora que funcione na bactéria que assimila metanol e uma seqüência de nucleotídeo que codifique um polipeptídeo contendo uma seqüência de sinal e uma seqüência de proteína objeto, que são conectadas à seqüência promotora tal que possam ser expressadas, em um meio líquido contendo metanol como uma fonte principal de carbono, a bactéria é deixada para secretar a proteína objeto e a proteína objeto secretada é recuperada.