



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

(11) PI 0516504-0 B1



(22) Data do Depósito: 14/10/2005

(45) Data de Concessão: 08/12/2020

(54) Título: POLIPEPTÍDEO TENDO ATIVIDADE FITASE, SEU USO, MOLÉCULA DE DNA RECOMBINANTE CODIFICANDO O MESMO, CONSTRUÇÃO DE DNA, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA TRANSFORMADA, MÉTODO PARA PRODUZIR O REFERIDO POLIPEPTÍDEO, BEM COMO COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO O MESMO

(51) Int.Cl.: C12N 9/16; C12N 15/55; C12N 15/63.

(30) Prioridade Unionista: 15/10/2004 DE 10 2004 050 410.5.

(73) Titular(es): AB ENZYMES GMBH.

(72) Inventor(es): KHANH QUOC NGUYEN; BRUNO WINTER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2005011108 de 14/10/2005

(87) Publicação PCT: WO 2006/042719 de 27/04/2006

(85) Data do Início da Fase Nacional: 16/04/2007

(57) Resumo: POLIPEPTÍDEO TENDO ATIVIDADE DE FITASE E SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO CODIFICANDO O MESMO. A invenção diz respeito a uma molécula de DNA recombinante que, sob expressão em uma célula hospedeira procarjótica ou eucariótica, codifica um polipeptídeo tendo atividade de fitase, em que a molécula de DNA recombinante compreende uma sequência de DNA selecionada de a) sequências de DNA que foram obtidas por variações da sequência de fitase de *E. coli* do tipo selvagem madura, em que pelo menos um aminoácido na região de posição 189 a 211 e/ou um aminoácido na região de posição 137 a 152 é mutado quando comparado à sequência do tipo selvagem, b) sequências de DNA tendo uma homologia de 70 % a 100 % às sequências de acordo com a), c) sequências de DNA que estão relacionadas com as sequências de acordo com a) e b) devido à degeneração do código genético, em que a molécula de DNA recombinante está, sob expressão em uma célula hospedeira adequada, associada a uma atividade aumentada da proteína desse modo codificada no sobrenadante de cultura, como também as proteínas codificadas pela mesma.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"POLIPEPTÍ-
DEO TENDO ATIVIDADE FITASE, SEU USO, MOLÉCULA DE DNA RE-
COMBINANTE CODIFICANDO O MESMO, CONSTRUÇÃO DE DNA, VE-
TOR, CÉLULA HOSPEDEIRA TRANSFORMADA, MÉTODO PARA PRO-
DUZIR O REFERIDO POLIPEPTÍDEO, BEM COMO COMPOSIÇÃO COM-
PREENDENDO O MESMO".**

A presente invenção refere-se a uma molécula de DNA recombi-
nante que codifica um polipeptídeo tendo atividade de fitase, e o polipeptídeo
codificado como tal. Especificamente, a invenção refere-se a uma molécula de
10 DNA recombinante que codifica um polipeptídeo tendo atividade de fitase, em
que a sequência de DNA foi obtida por uma variação da fitase de *E. coli* do
tipo selvagem madura, em que as posições de aminoácido definidas são mo-
dificadas quando comparadas à sequência do tipo selvagem. Além disso, a
invenção refere-se a um método para expressar a fitase recombinante como
15 também seu uso em tecnologia de alimento e alimentação.

Ácido fítico ou mioinositol-1,2,3,4,5,6-hexaquisdiidrogenofosfato (abre-
viado como hexaquisfosfato de mioinositol) é a fonte principal de inositol e a forma
de armazenamento primária de fosfato em semente de planta. Nas sementes de
legumes, aproximadamente 70 % do teor de fosfato estão presentes como um sal
20 de potássio, magnésio e de cálcio misturado de ácido fítico. Semente, grãos de
cereal e legumes são componentes importantes de preparações de alimento e
alimentação, em particular de preparações de alimentação de animais; mas cere-
ais e legumes também ganham importância crescente na nutrição humana.

As unidades de fosfato de ácido fítico ligam-se como um complexo
25 de cátions bivalentes e trivalentes como íons de metal, isto é íons fisiologicamen-
te importantes para a nutrição como cálcio, íon, zinco e magnésio como também
os elementos de traço manganês, cobre e molibdênio. Além deste, ácido fítico
também liga proteínas através de interação eletrostática até certo ponto.

Ácido fítico e seus sais, os fitatos, são freqüentemente não me-
30 tabolizados visto que não podem ser absorvidos do trato gastrointestinal, isto
é nem os fósforos contidos neles nem os íons de metal quelado nem as pro-
teínas ligadas estão fisiologicamente disponíveis para nutrição.

Como fósforo é um elemento essencial para o crescimento de todos os organismos, alimento e alimentação têm que ser suplementados com fosfato inorgânico. Os íons essenciais fisiologicamente para nutrição

5 como ferro e cálcio muito freqüentemente têm que ser suplementados também. Além disso, o valor fisiológico de nutrição de qualquer dieta é reduzido visto que as proteínas estão ligadas através de ácido fítico. Por conseguinte, ácido fítico é freqüentemente denotado como um fator contrário ao valor nutricional ("Anti-Nährwertfaktor").

10 Além disso, os fósforos do fitato são excretados por meio do trato gastrointestinal dos animais devido a uma falta de metabolismo, que leva à poluição de fosfato indesejada do ambiente que pode, por exemplo, levar à eutroficação das águas e ao crescimento excessivo de algas.

15 Ácido fítico ou fitatos (no seguinte, estes termos são usados como sinônimos exceto do contrário indicado) podem ser degradados através de fitases. Semente de planta contendo ácido fítico contém enzimas de fitases endógenas. Sob sua ingestão, os fitatos em alimento e alimentação são teoricamente hidrolisáveis pelas fitases de plantas endógenas, pelas fitases da flora intestinal e pelas fitases da mucosa intestinal. Em prática, porém, o potencial de hidrólise das fitases de plantas endógenas e das fitases que

20 ocorrem no intestino, se presentes, é sem dúvida insuficiente para assegurar significativamente a biodisponibilidade da ligação fosforosa nos fitatos. Desse modo, fitases exógenas são freqüentemente adicionadas ao alimento e alimentação.

25 Fitases podem ser produzidas através de plantas como também através de microorganismos. Entre os microorganismos, bactérias produtoras de fitase como também fungos e leveduras produtores de fitase são conhecidos.

30 Os produtores de fitase de ocorrência natural têm, porém, a desvantagem que a fitase é apenas formada em certas quantidades e com propriedades definidas. Como explicado acima, existe, porém, uma necessidade aumentada por fitase, especificamente para indústrias de alimento e alimentação.

Um objetivo da presente invenção é, desse modo, fornecer um polipeptídeo tendo atividade de fitase, que possa ser produzido economicamente. Especificamente, será possível produzir a fitase em custo eficaz. A fitase deve também manter as propriedades essenciais da fitase de *E. coli* do tipo selvagem natural, mas deverá se distinguir por uma atividade aumentada no sobrenadante de cultura e uma segregabilidade melhorada, respectivamente. Especificamente, a habilidade para melhorar a disponibilidade de fosfato in vivo e in vitro como também a adequabilidade de um auxiliar de assadura contam com as propriedades essenciais da fitase do tipo selvagem natural.

Um outro objetivo da presente invenção é fornecer um gene para um polipeptídeo tendo atividade de fitase que, sob expressão em uma célula hospedeira, resulta em uma atividade aumentada da proteína assim codificada no sobrenadante de cultura e uma secreção aumentada do polipeptídeo, respectivamente. Será possível produzir o polipeptídeo de forma econômica e em custo eficaz. Especificamente, a expressão do polipeptídeo resultará em rendimentos aumentados em microorganismos eucarióticos comparado à expressão da fitase do tipo selvagem. Além disso, as seqüências de DNA que codificam o polipeptídeo, construtos de DNA correspondentes e vetores, como também uma fonte para a enzima recombinante sendo adequada para o uso comercial para alimento e alimentação e em processos industriais, e composições contendo a enzima de acordo com a invenção, serão fornecidos.

Foi agora surpreendentemente descoberto que uma mutação na região do aminoácido inclusivo 189 ao 211 inclusivo e/ou da posição inclusiva do aminoácido 137 ao 152 inclusivo da fitase de *E. coli* do tipo selvagem resulta em uma atividade aumentada no sobrenadante de cultura inteira pela proteína fitase sem afetar os efeitos benéficos e propriedades essenciais da fitase de *E. coli* do tipo selvagem.

Várias fitases de *E. coli* são descritas em literatura, por exemplo em Dassa et al., 1990, J., Bacteriol. 172:5997-5500 (no. de acesso M58708). Mutantes geneticamente modificados da fitase de *E. coli* que resultam em

uma estabilidade térmica aumentada e/ou atividades específicas mais altas foram também descritos (Rodriguez et al., 2000, Arch. Biochem. Biophys., 382: 105112, Lanahan et al., 2003, Pedido de Patente US 2003 0157646 A1, WO 01/90333). Uma mutagênese sítio-específica de fitase *Escherichia coli*

5 com propriedades enzimáticas melhoradas é também descrita em WO 01/36607. Porém, o mutante Val-Tyr na posição 200 descrito aqui não corresponde à mutação na posição 200 de acordo com a invenção, visto que outro modo de contar a sequência foi usado de acordo com WO 01/36607, isto é a sequência líder foi incluída na contagem. Desse modo, posição 222
10 na sequência de acordo com a dita publicação (WO 01/36607) corresponde à posição 200 da contagem de acordo com a invenção. Outras proteínas tendo atividade de fitase são descritas em WO 99/08539, WO 01/90333, WO 02/095003, WO 03/038035, WO 03/038111, WO 04/015084 e WO 00/71728.

Além disso, a publicação Garrett et al., Applied Environ. Microbiol., 2004, 70 (5), 3041-3046 descreve mutantes da fitase de *E. coli* tendo
15 estabilidade térmica e gastrointestinal aumentada.

Porém, a técnica anterior não contém uma descrição de mutações na fitase de *E. coli* que resulta em uma produção aumentada de uma enzima procariótica sob expressão por um microorganismo eucariótico. Além
20 disso, a técnica anterior não contém indicações sobre como alcançar uma atividade aumentada de tais enzimas produzidas no sobrenadante de cultura por uma variação e especificamente uma mutação da fitase de *E. coli*. Especificamente, a técnica anterior não contém uma indicação sobre a significação funcional das posições 198 a 211 e/ou das posições 137 a 152 da sequência de fitase de *E. coli* do tipo selvagem. Mais particularmente, a técnica
25 anterior não contém uma indicação sobre a significação funcional de posição 200 da sequência de fitase de *E. coli* do tipo selvagem.

Este objetivo é solucionado por uma molécula de DNA recombinante que, em expressão em uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica, codifica um polipeptídeo tendo atividade de fitase, em que a molécula
30 de DNA recombinante compreende uma sequência de DNA selecionada de a) sequências de DNA que foram obtidas por variações da sequência de fi-

tase de *E. coli* do tipo selvagem madura, em que pelo menos um aminoácido na região de posição 189 a 211 e/ou um aminoácido na região de posição 137 a 152 é mutado quando comparado à sequência do tipo selvagem, b) sequências de DNA tendo uma homologia de 70 % a 100 % às sequências de acordo com a), c) sequências de DNA que estão relacionadas às sequências de acordo com a) e b) devido à degeneração do código genético, em que a molécula de DNA recombinante está, sob expressão em uma célula hospedeira adequada, associada a uma atividade aumentada da proteína assim codificada no sobrenadante de cultura, como também por um polipeptídeo tendo atividade de fitase e sendo codificado por uma das ditas moléculas de DNA recombinantes.

A invenção também refere-se a um método para produzir um polipeptídeo tendo atividade de fitase de acordo com as técnicas recombinantes, compreendendo cultivar células hospedeiras procarióticas e/ou eucarióticas contendo uma sequência de ácido nucléico de acordo com a invenção, sob condições condutivas para a expressão da enzima como também a recuperação subsequente da enzima. A invenção, além disso, refere-se ao uso do dito polipeptídeo tendo atividade de fitase em métodos convencionais, por exemplo, em métodos que liberam minerais de complexos de fitato em materiais de planta em in vitro, por exemplo, no tratamento de alimentação, ou seu uso na assadura in vivo, isto é a administração do polipeptídeo tendo atividade de fitase a animais. Além disso, a invenção refere-se ao uso das sequências de polinucleotídeos de acordo com a invenção para produzir sondas para encontrar sequências similares, que codificam enzimas correspondentes, em outros organismos como também para transformar células hospedeiras.

Além disso, a invenção refere-se a uma sequência sinal derivada do gene da fitase de *Aspergillus niger*.

As figuras inclusas ilustram a invenção em mais detalhes:

Figura 1: SDS-PAGE dos sobrenadantes de cultura de cepas transformadas com plasmídeos pKDa2 e pKDa4. Rotas 1 e 6 contêm proteínas marcadoras. A descrição específica está contida no exemplo 6 e tabela

3.

Figura 2: mapa de plasmídeo de pKDa2 (mutante de Tyr²⁰⁰)

Figura 3: mapa de plasmídeo de pKDa9 (tipo selvagem)

Figura 4: mapa de plasmídeo de Da2pUC3

5 Figura 5: seqüência de DNA codificando a fitase de *E. coli* do tipo selvagem (uso de códon de *E. coli*) Dassa et al., 1990, J. Bacteriol. 172: 5497-5500, no. de acesso: M58704), proteína madura.

10 O plasmídeo Da2pUC3 foi depositado sob número de acesso DSM 16396 no dia 7 de maio de 2004 no Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig de acordo com as provisões do Tratado de Budapeste.

15 Foi surpreendentemente descoberto que mutação de aminoácido na região de posição 198 a 211 (incluindo os valores-limites) e/ou uma mutação de aminoácido na região de posição 137 a 152 (incluindo os valores-limite) da seqüência de fitase de *E. coli* do tipo selvagem está associada a uma atividade significativamente aumentada no sobrenadante de cultura sob expressão em uma célula hospedeira. Preferivelmente, pelo menos um aminoácido na região de posição 197 a 209 (incluindo os valores-limite) e/ou um aminoácido na região de posição 137 a 152 (incluindo os valores-limites)

20 é mutado quando comparado à seqüência do tipo selvagem. Mais preferivelmente, pelo menos um aminoácido na posição 198, 200, 205 e 207 e/ou na posição 144, 145 e 152 é mutado. Mutações preferidas na região de posição 189 a 211 são Val 200 → Leu, Val 200 → Ile, Val 200 → Pro, Val 200 → Tyr, Leu 198 → Ile, Val 205 → Leu, Val 205 → Ile, Leu 207 → Tyr, Leu

25 207 → Phe e na região de posição 137 a 152 Ile 144 → Tyr, Leu 145 → Ile, Ile 152 → Phe. Outras mutações preferidas são Val 200 → Leu, Val 200 → Pro, Val 200 → Tyr e Ile 144 → Tyr. É especialmente preferido que uma mutação esteja presente na posição Val 200. Este aminoácido é preferivelmente substituído por um aminoácido aromático como tirosina, por um aminoácido hidrofóbico como leucina ou isoleucina ou através de prolina. Preferivelmente, a mutação na posição 200 é Tyr. Além disso, também mutantes du-

30 plos podem ser gerados com a condição que mutação Ile 144 → Tyr não

seja associada a uma mutação de Val 200, como também com a outra condição que mutação Ile 152 → Phe não seja combinada com qualquer mutação de Leu 207. Um mutante duplo preferido é Leu 198 → Ile em combinação com Leu 145 → Ile. Sem estar preso pela explanação teórica a seguir, é

- 5 esperado que alterações em duas regiões de estrutura espaçadamente adjacentes da fitase, isto é uma folha β e a hélice α seja um resultado da modificação de acordo com a invenção, e que estas regiões sejam desse modo, alteradas através de interação hidrofóbica para resultar em uma densidade de empacotamento melhor. A densidade de empacotamento por sua vez
- 10 resulta em uma atividade aumentada no sobrenadante de cultura e secreção de uma dessas enzimas modificadas, respectivamente. Dentro do escopo da condição acima, qualquer mutação pode ser feita e combinada nas ditas regiões contanto que um microorganismo transformado com uma sequência de DNA correspondente segregue da célula a fitase codificada em quantida-
- 15 des aumentadas e, respectivamente, com a propriedade de resultar em atividade aumentada (atividade total) no sobrenadante de cultura, em que a atividade enzimática e outras as propriedades fisiológicas da fitase de *E. coli* do tipo selvagem são mantidas. Preferivelmente, a melhoria da atividade no sobrenadante de cultura e da eficiência de secreção de um mutante, respectivamente, é de pelo menos 10 %, mais preferido pelo menos 20 %, quando
- 20 comparado à fitase de *E. coli* do tipo selvagem em medição sob condições idênticas. A determinação da atividade enzimática da fitase e a medição de outras propriedades fisiológicas da fitase podem ser realizadas de acordo com métodos conhecidos per se.

- 25 A obtenção de um aumento da atividade no sobrenadante de cultura e da eficiência de secreção da fitase, respectivamente, em pelo menos 10 % quando comparado à eficiência de secreção da fitase do tipo selvagem foi surpreendente e não foi óbvio. Foi em particular surpreendente que o mutante Val 200 → Tyr estivesse associado a um aumento da eficiência de secreção em 100 % quando comparado à fitase do tipo selvagem (cf.
- 30 exemplo 4).

Tentativas para melhorar as propriedades da fitase na técnica

anterior são relatadas. Desse modo, a publicação Archives Biochem. Biophys., 2000, 382 (1), 105-122 descreve as atividades da fitase no sobrenadante de cultura sob secreção pela levedura *Pichia Pastoris* na página 109,

tabela 3. A fitase de *E. coli* do tipo selvagem (que não é precisamente de

5 sequência idêntica à sequência pKDa4 de acordo com a invenção) foi segregada a 117 ml^{-1} de unidades após 96 horas. É para ser observado que a determinação da atividade de acordo com a dita publicação não é idêntica à determinação da atividade de acordo com exemplo 4 da presente invenção. De acordo com a técnica anterior na publicação mencionada acima, o substrato é incubado com a enzima em pH 2,5. De acordo com a invenção, a incubação é realizada em pH 5,0. Como pode ser considerado das curvas na
10 página 109, figura 3 da publicação, 117 U ml^{-1} em pH 2,5 corresponderiam aproximadamente a apenas 60 U ml^{-1} em pH 5 (52 % de atividade residual). Desse modo, a atividade enzimática da fitase de *E. coli* do tipo selvagem
15 segregada, codificada pelo uso de códon do tipo selvagem de *E. coli*, na dita publicação é substancialmente menor que a atividade da enzima segregada de 158 a 188 U ml^{-1} obtida com a cepa de *T. reesei* transformada de pKDa4.

A sequência de DNA que corresponde à sequência de fitase mutada de acordo com a invenção pode ser realizada usando qualquer uso de
20 códon desde que o nível de secreção não seja afetado adversamente pelo uso de códon. Desse modo, por exemplo, a idade de códon do microorganismo usado para expressão pode ser usada mas também o uso de códon de *E. coli* e uma variação deste, respectivamente, podem ser usados. Além disso, a sequência de fitase de *E. coli* mutada de acordo com a inven-

25 ção pode conter também variações de sequência. Assim, quaisquer variações podem ser feitas além das mutações descritas acima, contanto que a propriedade de alcançar uma atividade mais alta no sobrenadante de cultura e eficiência de secreção, respectivamente, não seja adversamente afetada e contanto que a atividade enzimática e outras propriedades essenciais da
30 fitase do tipo selvagem de *E. coli* sejam mantidas.

Variações correspondentes são bem-conhecidas por uma pessoa versada na técnica de DNA recombinante e compreendem as mutações

acima como também as variações exemplares expostas abaixo.

De acordo com a invenção, adição e/ou deleção de moléculas do polipeptídeo modificadas de acordo com a invenção pode(m) ser usada(s). Desse modo, o polipeptídeo modificado de acordo com a invenção tendo uma atividade de fitase pode ser alongado adicionando seqüências adicionais às extremidades N-terminal e/ou C-terminal. Assim, moléculas híbridas podem ser criadas tendo outras propriedades vantajosas. Por exemplo, proteínas de fusão e proteínas que são nativamente segregadas em altas quantidades, respectivamente, podem ser adicionadas por meio das quais a eficiência de secreção é também melhorada. Além disso, segmentos de seqüência ativos de outras enzimas podem ser adicionados para obter enzimas tendo especificidade múltipla. Além disso, seqüências polares e não-polares podem ser adicionadas para especificamente influenciar as propriedades de solubilidade e a capacidade para passar a membrana ("Membrangängigkeit"), respectivamente, da tal enzima obtida. Preferivelmente, a extremidade N-terminal é ligada a uma fitase de *Aspergillus* ou uma fosfatase de ácido. Alongamentos do término C da seqüência de fitase de *E. coli* mutada podem ser feitos da mesma maneira. Assim, fitases tendo uma estrutura quaternária alterada podem ser obtidas.

De acordo com a invenção, também segmentos de seqüência do polipeptídeo tendo atividade de fitase podem ser deletados contanto que a propriedade da secreção aumentada e a atividade no sobrenadante de cultura, respectivamente, em que a atividade de fitase é mantida, não sejam afetadas.

As mutações, alongamentos e mutilações podem ser realizadas por métodos conhecidos per se na técnica anterior.

As modificações do polipeptídeo tendo atividade de fitase levadas em conta correspondem às respectivas mutações e modificações, respectivamente, da molécula de DNA correspondente. De acordo com a invenção, também tais seqüências hibridando sob condições relaxadas ou rigorosas com as seqüências de acordo com a invenção são levadas em conta. Além disso, a invenção também se refere a tais seqüências que exibem uma

homologia de pelo menos 70 %, mais preferido de pelo menos 90 % e em particular pelo menos 95 % em relação à seqüência de nucleotídeo reivindicada e suas partes reivindicadas, respectivamente, contanto que as respectivas seqüências resultem em um aumento da atividade no sobrenadante de cultura e a eficiência de secreção, respectivamente, do polipeptídeo tendo atividade de fitase codificada por ele. Preferivelmente, a homologia é de 70 a 100 por cento. O grau de identidade é assim preferivelmente determinado, de forma que o número de resíduos da seqüência mais curta participando na comparação e tendo uma contraparte "correspondente" na outra seqüência é determinado. Para o propósito da presente invenção, a homologia é assim preferivelmente determinada como sempre usando os algoritmos usuais. De acordo com a invenção, apenas os cDNAs das proteínas maduras respectivas são levados em consideração para comparação. Similarmente, preferivelmente as contra partes de seqüência idênticas foram determinadas de acordo com a invenção como seqüências homólogas usando programas de computação conhecidos. Um exemplo para um tal programa é o programa Clone Manager Suite contendo a parte de programa Align Plus e sendo distribuído por Scientific & Educational Software, Durham, NC, EUA. Assim, uma comparação de duas seqüências de DNA como definidas acima é realizada usando o alinhamento local opcional ou de acordo com o método FastScan - MaxScore ou de acordo com o método Needleman-Wunsch e retendo os valores predefinidos. Especificamente, a versão de programa "Clone Manager 7 Align Plus 5" com as funções "Compare Two Sequences/Local Fast Scan-Max Score/Compare DNA sequences" foi aplicado de acordo com a invenção para calcular a homologia. Assim, os algoritmos acessíveis das fontes a seguir foram usados: Hirschberg, D. S. 1975. A linear space algorithm for computing longest common subsequences. Commun Assoc Comput Mach 18: 341-343; Myers, E. W. e W. Miller. 1988. Optimal alignments in linear space. CABIOS 4:1, 11-17; Chao, K-M, W. R. Pearson e W. Miller. 1992. Aligning two sequences within a specified diagonal band. CABIOS 8:5, 481-487. Além disso, a invenção refere-se também às seqüências de DNA que estão relacionadas às seqüências de acordo com a inven-

ção devido à degeneração do código genético como também variantes alélicas destes. A degeneração do código genético pode assim resultar devido à degeneração natural ou devido a um uso de códon especificamente selecionado. Variantes alélicas de ocorrência natural podem ser identificadas usando

5 técnicas bem-conhecidas de biologia molecular, como a reação em cadeia de polimerase (PCR) e técnicas de hibridação.

Uma sequência de DNA que codifica um polipeptídeo de acordo com a invenção pode ser usada para transformar quaisquer células hospedeiras como células de fungos, leveduras, bactérias, plantas ou de mamíferos. Desse modo, células transformadas se distinguem por uma secreção
10 aumentada da fitase. A enzima de fitase assim produzida também resulta em uma liberação de fosfato eficiente dos fosfatos de mioinositol.

Os termos proteína, peptídeo e polipeptídeo são para ser usados alternadamente. Um polipeptídeo ou enzima tendo atividade de fitase ou
15 uma fitase deverá designar qualquer enzima sendo capaz de causar a liberação de fosfato inorgânico de vários fosfatos de mioinositol. Exemplos para tais substratos de fosfato de mioinositol (fitase) são ácido fítico e quaisquer sais deste, por exemplo, fitato de sódio ou fitato de potássio ou sais misturados. Quaisquer isômeros posicionais dos di-, tri-, tetra- ou pentafosfatos de
20 mioinositol podem também servir como substrato de fitase. A atividade de fitase pode ser determinada usando qualquer ensaio em que um dos ditos substratos é usado. A variante de fitase de acordo com a invenção compreende variantes de polipeptídeo que derivam de uma fitase específica por deleção ou adição de um ou mais aminoácidos na extremidade N-terminal
25 e/ou C-terminal da proteína nativa, deleção ou adição de um ou mais aminoácidos em uma ou mais posições na proteína nativa, ou substituição de um ou mais aminoácidos em uma ou mais posições na fitase. A geração de tais variantes é comumente conhecida na técnica. Por exemplo, variantes de sequência de aminoácido dos polipeptídeos podem ser feitas através de mutação no DNA. Métodos para mutagênese e alteração de sequência de nucleotídeo são bem-conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488 (1985), Kunkel et al., Methods in Enzymol.,
30

154:367 (1987), Patente U. S. no.: 4.873.192, Walker e Gaastra, eds., Techniques in Molecular Biology, Mac Millan Publishing Company, Nova Iorque, (1983). Indicações em substituições de aminoácido adequadas que não afetam a atividade biológica da proteína de interesse são encontradas no modelo de Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D. C. (1987). Substituição conservadora como a permuta de um aminoácido por outro aminoácido tendo propriedades similares é preferida.

A invenção também se refere às composições de ácido nucléico ou de proteína isolados ou substancialmente purificadas. Nelas, um polinucleotídeo/polipeptídeo purificado ou isolado e segmento destes, respectivamente, designam um polinucleotídeo e polipeptídeo e segmento destes, respectivamente, os quais estão presentes em uma forma isolada de seu ambiente nativo. Um segmento de ácido polinucleico ou polipeptídeo isolado pode estar presente em uma forma purificada ou pode estar presente em um ambiente não nativo, como, por exemplo, uma célula hospedeira transgênica. Por exemplo, um segmento de polinucleotídeo ou proteína isolados ou purificados ou uma parte biologicamente ativa destes é essencialmente livre de outro material celular ou meio de cultura sob produção de acordo com técnicas recombinantes ou é essencialmente livre de precursores químicos ou outros compostos químicos. Preferivelmente, um polinucleotídeo isolado está livre de seqüências (preferivelmente, seqüências de codificação de proteínas) naturalmente flanqueando o ácido nucléico (isto é seqüências localizadas nas extremidades 5' - e 3' - do ácido nucléico) no DNA genômico do organismo do qual o ácido nucléico é derivado. De acordo com modalidades diferentes, a molécula de ácido nucléico isolada pode, por exemplo, conter menos que aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb ou 0,1 kb de seqüências de nucleotídeo naturalmente flanqueando a molécula de ácido nucléico no DNA genômico da célula da qual o ácido nucléico deriva. Uma proteína que é essencialmente livre de material celular compreende composições de proteína ou polipeptídeo tendo menos que aproximadamente 70 %, 50 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (em base do peso seco) de proteína de con-

taminação. Quando a proteína de acordo com a invenção ou um fragmento biologicamente ativo desta for produzido recombinantemente, o meio de cultura preferivelmente compreende menos que aproximadamente 70 %, 50 %, 30 %, 20 %, 10 % ou 5 % (em base do peso seco) de precursores químicos ou substâncias químicas não-proteináceas. Fragmentos e variantes das seqüências de nucleotídeo de acordo com as invenções ou proteínas ou segmentos de proteína codificados por eles estão também dentro do escopo da invenção. Um fragmento designa uma parte da seqüência de nucleotídeo ou uma parte da seqüência de aminoácido e, desse modo, uma parte do polipeptídeo ou proteína, que é codificada por ele.

A invenção também se refere aos cassetes de expressão que podem ser usados para a transferência ("Einschleusung") de uma estrutura de leitura aberta que codifica uma fitase de acordo com a invenção em uma célula hospedeira. Eles preferivelmente compreendem uma região de iniciação de transcrição que é ligada à estrutura de leitura aberta. Um tal cassete de expressão pode conter uma pluralidade de sítios de restrição para inserir a estrutura de leitura aberta e/ou outros DNAs, por exemplo uma região reguladora de transcrição e/ou genes marcadores selecionáveis. O cassete de transcrição compreende na direção de 5' → 3' da transcrição uma região de iniciação de transcrição e de translação, a seqüência de DNA de interesse e uma região de terminação de transcrição e de translação, que é funcional em uma célula microbiana. A região de terminação pode ser nativa vis-à-vis à região de iniciação de transcrição, pode ser nativa vis-à-vis à seqüência de DNA de interesse ou pode derivar de qualquer outra fonte.

O termo "estrutura de leitura aberta" (ORF) designa a seqüência de aminoácido que é codificada entre os códons de começo e de interrupção de translação como uma seqüência de codificação. Os termos "códon de começo" e "códon de parada" designam uma unidade de três nucleotídeos contíguos (códon) em uma seqüência de codificação, que especifica o começo e a parada da cadeia da síntese de proteína (translação de mRNA).

"Ligação operável" designa em conexão a um ácido nucléico uma ligação como uma parte da mesma molécula de ácido nucléico em um

posicionamento e orientação apropriados para o começo transcripcional do promotor. DNA operavelmente ligado a um promotor está sob controle da regulação de iniciação de transcrição do promotor. Sequências de codificação podem ser operavelmente ligadas com a sequência reguladora em ori-

5 entação sentido ou anti-sentido. Com referência aos polipeptídeos, ligação operável significa a ligação como uma parte do mesmo polipeptídeo, isto é por meio de ligações de peptídila.

Quaisquer promotores podem ser usados de acordo com a invenção. Um promotor designa a sequência de nucleotídeo, que está usual-
10 mente a montante (5') vis-à-vis à sequência de codificação, e controla a expressão da sequência de codificação fornecendo o reconhecimento para a RNA polimerase e outros fatores, que são necessários para uma transcrição correta. O promotor usado de acordo com a invenção pode compreender um promotor mínimo, isto é uma sequência de DNA curta de uma caixa de TA-
15 TA e outras sequências, que especificam o sítio de iniciação de transcrição, que são ligados aos elementos reguladores para controlar a expressão.

O promotor de acordo com a invenção pode também compreender uma sequência de nucleotídeo que compreende um promotor mínimo e elementos reguladores, que é capaz de controlar a expressão de uma se-
20 quência de codificação ou um RNA funcional. Este tipo de sequência de promotor consiste em elementos a montante proximais e distais, em que os elementos posteriores são freqüentemente designados como intensificadores. Por conseguinte, um intensificador é uma sequência de DNA que pode estimular a atividade de promotor e pode ser um elemento intrínseco do
25 promotor ou um elemento heterólogo inserido para aumentar o nível de expressão ou especificidade de tecido de um promotor. Ele pode funcionar em ambas as orientações e pode até mesmo funcionar em um local a montante ou a jusante do promotor. Intensificadores como também outros elementos promotores a montante ligam as proteínas de ligação de DNA específicas da
30 sequência que medeiam seus efeitos. Promotores podem ser derivados de um gene nativo em sua entidade ou podem ser compostos de elementos diferentes, que derivam de promotores de ocorrência natural diferentes ou

podem até mesmo ser compostos de segmentos de DNA sintéticos. Um promotor pode também conter seqüências de DNA que estão envolvidas na ligação de fatores de proteína que controlam a eficiência da iniciação de transcrição como uma resposta às condições fisiológicas ou condições atribuíveis ao desenvolvimento.

Elementos promotores, em particular elementos de TATA que são inativos ou têm uma atividade de promotor fortemente reduzida na ausência de uma ativação a montante são designadas como promotores mínimos ou promotores centrais. Na presença de um fator de transcrição apropriado ou de fatores de transcrição apropriados, respectivamente, a função do promotor mínimo resulta na permissão para a transcrição. Desse modo, um promotor mínimo ou central apenas consiste em todos os elementos básicos que são necessários para iniciação de transcrição, por exemplo uma caixa de TATA e/ou um iniciador.

A invenção também se refere aos vetores contendo o DNA de acordo com a invenção. Os ditos vetores compreendem quaisquer plasmídeos, cosmídeos, fagos e outros vetores bifilamentares ou unifilamentares, de forma linear ou circular, que podem opcionalmente ser autotransmissíveis ou mobilizáveis, e que podem transformar um hospedeiro procariótico ou eucariótico por meio de integração no genoma celular ou que são extracromossômicos (por exemplo autonomamente replicando plasmídeos tendo uma origem de replicação).

Vetores, plasmídeos, cosmídeos, cromossomos artificiais de levedura (YACs), cromossomos artificiais bacterianos (BACs) e segmentos de DNA para uso para a transformação de células em geral compreendem o DNA que codifica fitase de acordo com a invenção como também um outro DNA, como cDNA, um gene ou genes, a serem transferidos ou introduzidos, respectivamente, nas células. Os ditos constructos de DNA podem compreender ainda estruturas como promotores, intensificadores, poli-ligantes ou também genes reguladores, quando necessário. Um dos segmentos de DNA ou genes selecionados para introdução celular convenientemente codifica uma proteína que é expressa em células transformadas assim obtidas (re-

combinantes) e que leva a um traço triável ou selecionável e/ou conversão de um fenótipo melhorado para a célula transformada.

A construção de vetores que podem ser usados de acordo com a invenção é conhecida por uma pessoa versada na técnica fazendo referência à descrição acima (cf. por exemplo Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y. (1989)). O cassete de expressão de acordo com a invenção pode conter um ou mais sítios de restrição para colocar o nucleotídeo de codificação de fitase sob regulação de uma seqüência de regulação. O cassete de expressão pode também conter um sinal de terminação operavelmente ligado ao polinucleotídeo como também seqüências de regulação, que são necessárias para uma translação correta do polinucleotídeo. O cassete de expressão contendo o polinucleotídeo de acordo com a invenção pode ser quimérico, isto é pelo menos um de seus componentes é heterólogo com relação a pelo menos um dos outros componentes. A expressão do polinucleotídeo no cassete de expressão pode estar sob controle de um promotor constitutivo, um promotor induzível, um promotor regulado, um promotor viral ou um promotor sintético.

Os vetores já podem conter elementos reguladores, por exemplo, promotores, ou as seqüências de DNA de acordo com a invenção podem ser manipuladas para conter tais elementos. Elementos promotores adequados que podem ser usados são conhecidos na técnica e são, por exemplo, o promotor de cbh 1 ou de cbh 2 para *Trichoderma reesei*, o promotor de amy para *Aspergillus oryzae*, o promotor de xy1, glaA, alcA, aphA, tpiA, gpdA, suc1 e pkiA para *Aspergillus niger*. Elementos promotores adequados, que podem ser usados para expressão em levedura, são conhecidos na técnica e são, por exemplo, o promotor pho5 ou o promotor de gap para expressão em *Saccharomyces Cervisiae* e para *Pichia pastoris*, por exemplo promotor de aox1 ou o promotor de fmd ou o promotor de mox para *H. polymorpha*.

DNA adequado para introdução em células pode compreender DNA derivado ou isolado de qualquer fonte além do DNA de acordo com a invenção. Um exemplo para um DNA derivado é uma seqüência de DNA que

foi identificada como um fragmento útil em um dado organismo e que foi depois quimicamente sintetizada em uma forma substancialmente pura. Um exemplo para um tal DNA é uma seqüência de DNA adequada que foi, por exemplo, obtida pelo uso de endonucleases de restrição, de forma que ele possa também ser manipulado de acordo com a invenção, por exemplo, ele possa ser amplificado. Tal DNA é usualmente chamado de um DNA recombinante. Desse modo, um DNA adequado compreende DNA completamente sintético, DNA semi-sintético, DNA isolado de fontes biológicas e DNA derivado de RNA introduzido. Em geral, o DNA introduzido é nenhum constituinte original do genótipo do DNA recipiente, mas, de acordo com a invenção, também um gene pode ser isolado de um genótipo dado e pode ser opcionalmente modificado e, subsequente, cópias múltiplas do gene podem ser introduzidas no mesmo genótipo, por exemplo para intensificar a produção de um produto de um gene dado.

15 O DNA introduzido compreende sem limitação DNA de genes, como, por exemplo, de bactérias, leveduras, fungos ou vírus. O DNA introduzido pode compreender genes modificados ou sintéticos, porções de genes ou genes quiméricos incluindo genes do mesmo genótipo ou de um diferente.

20 O DNA usado de acordo com a invenção para transformação pode ser circular, linear, bifilamentar ou unifilamentar. Em geral, o DNA está presente em forma de um DNA quimérico, como um DNA de plasmídeo, também contendo regiões flanqueadas pelas seqüências de regulação que ajudam na expressão do DNA recombinante que está presente na célula transformada. Por exemplo, o próprio DNA pode conter um promotor ou pode consistir neste que é ativo em uma célula e que é derivado de uma fonte que é diferente da dita célula, ou um promotor pode ser usado que já está presente na célula, isto é a célula alvo para transformação.

25 Em geral, o DNA introduzido é relativamente pequeno, menos que aproximadamente 30 kb para minimizar a suscetibilidade vis-à-vis degradação física, química ou enzimática aumentando com o tamanho do DNA.

A seleção de um vetor de expressão adequado depende das

células hospedeiras. Vetores de expressão para levedura ou fungos podem compreender uma origem de replicação, um promotor adequado e intensificador mas também quaisquer sítios de ligação de ribossoma necessários, sítios de poliadenilação, sítios doador "splice" e acceptor "splice", seqüências

5 de terminação de transcrição e seqüências de flanqueamento de 5' não-transcritas

Exemplos para células hospedeiras adequadas são: células fúngicas do gênero *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Mucor*, *Penicillium*, etc como, por exemplo, leveduras do gênero *Kluyveromyces*,

10 *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Trichosporon*, *Schwanniomyces*, *Hansenula*, *Pichia* e similares. Sistemas hospedeiros adequados são, por exemplo, fungos como *Aspergilli*, por exemplo *Aspergillus niger* (ATCC 9192) ou *Aspergillus ficuum* (NRLL 3135) ou *Trichoderma* (por exemplo *Trichoderma reesei* QM6a) e leveduras como *Saccharomyces*, por exemplo e *Saccharomyces Cerevisiae* ou *Pichia*, como, por exemplo, *Pichia pastoris* ou *Hansenula*,

15 por exemplo *H. polymorpha* (DSMZ 70277). Tais microorganismos podem ser obtidos de depósitos reconhecidos, por exemplo da American Type Culture Collection (ATCC), o Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) ou o Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

20 GmbH (DSMZ) ou quaisquer outros depósitos.

O cassete de expressão pode conter na direção 5'-3'-transcricional uma região de transcrição e iniciação de translação do polinucleotídeo de acordo com a invenção e uma região de transcrição e terminação que são funcionais in vivo ou in vitro. A região de terminação pode ser

25 nativa com relação à região de iniciação de transcrição pode ser nativo com respeito ao polinucleotídeo ou pode ser de outra origem. As seqüências reguladoras podem estar localizadas a montante (seqüências de não-codificação de 5') dentro (intron) ou a jusante (seqüências de não-codificação de 3') de uma seqüência de codificação e podem influenciar a

30 transcrição, o processamento de RNA ou a estabilidade e/ou a translação da seqüência de codificação associada. Seqüências reguladoras podem, sem limitação, compreender intensificadores, promotores, sítios de ligação de

repressor, seqüências de líderes de translação, íntrons ou seqüências sinais de poliadenilação. Elas podem compreender seqüências naturais e sintéticas como também seqüências que são uma combinação de seqüências sintéticas e naturais.

- 5 O vetor usado de acordo com a invenção pode também compreender seqüências adequadas para amplificar a expressão.

Exemplos para promotores que podem ser usados de acordo com a invenção são os promotores que são conhecidos por controlarem a expressão nas células eucarióticas. Quaisquer promotores tendo a capacidade para expressão em fungos filamentosos podem ser usados. Exemplos
10 são um promotor que é fortemente induzido através de amido ou celulose, por exemplo um promotor para glucoamilase ou α -amilase do gênero *Aspergillus* ou celulase (celobioidrolase) do gênero *Trichoderma*, um promotor para enzimas na via glicolítica, como cinase de fosfoglicerat (PGK) e gliceralde-
15 ído-3-fosfato desidrogenase (GPD), etc. O promotor de celobioidrolase I, celobioidrolase II, amilase, glucoamilase, xilanase ou de enolase é preferido.

Dois métodos principais para controlar a expressão são conhecidos, isto é sobreexpressão e subexpressão. Sobreexpressão pode ser alcançada mediante inserção de uma ou mais cópias extras do gene selecionado. Para subexpressão há dois métodos principais, que são usualmente
20 designados como "sub-regulação anti-sentido" e "sub-regulação sentido" na técnica. Em geral estes métodos são designados como "silenciamento de gene". Ambos destes métodos resultam em uma inibição da expressão do gene alvo.

25 Além do uso de um promotor específico, outros tipos de elementos podem influenciar a expressão de transgenes. Foi especialmente mostrado que os íntrons têm um potencial para intensificar a expressão de transgene. O cassete de expressão pode até mesmo compreender outros elementos, por exemplo, aqueles que podem ser regulados através de elementos endógenos ou exógenos como proteínas de dedo de zinco incluindo
30 proteínas de dedo de zinco de ocorrência natural ou proteínas de dedo de zinco quiméricas.

O cassete de expressão usado de acordo com a invenção pode também conter elementos intensificadores ou elementos promotores a montante.

Vetores para o uso de acordo com a invenção podem ser construídos para obter um elemento intensificador. Os constructos de acordo com a invenção, desse modo, compreendem o gene de interesse junto com uma sequência de DNA de 3' que age como um sinal para terminar a transcrição e para permitir poliadenilação do mRNA desse modo obtido. Qualquer sequência sinal que permite secreção do organismo hospedeiro escolhido pode ser usada. A sequência sinal preferida é a sequência sinal de fitase de *Aspergillus niger* ou sequências sinais derivadas dela para secreção de fungos filamentosos.

Uma sequência líder específica pode também ser usada, como a sequência de DNA entre o sítio de iniciação de transcrição e o começo da sequência de codificação, isto é a sequência líder não-transladada pode influenciar a expressão de gene. Sequências líderes preferidas compreendem sequências que controlam a ótima expressão do gene ligado, isto é eles compreendem uma sequência líder de consenso preferida aumentando ou mantendo a estabilidade de mRNA e impedindo uma iniciação de translação indevida. A seleção de tais sequências é bem-conhecida a uma pessoa versada na técnica.

Um gene marcador selecionável ou triável pode ser introduzido no cassete de expressão para melhorar a possibilidade de identificar os transformantes. Tais genes marcadores são bem-conhecidos por uma pessoa versada na técnica.

O cassete de expressão ou um constructo de vetor contendo o cassete de expressão é introduzido em uma célula hospedeira. Uma pluralidade de técnicas está disponível e são bem-conhecidas por uma pessoa versada na técnica para introduzir constructos na célula hospedeira. A transformação de células microbianas pode ser realizada usando polietileno glicol, cloreto de cálcio, infecção viral, DEAE-dextrana, infecções de fago, eletroporação e outros métodos conhecidos na técnica. A transformação de fungos

pode ser realizada de acordo com Penttila et al., Gene 61:155164, 1987. A introdução de um vetor recombinante em leveduras pode ser realizada de acordo com métodos conhecidos per se incluindo eletroporação, uso de esferoplastos, acetato de lítio e similares.

- 5 Assim que o cassete de expressão e a sequência de DNA, respectivamente, de acordo com a invenção são obtidos, eles podem ser inseridos em vetores por métodos conhecidos per se para sobreexpressar o polipeptídeo codificado em sistemas hospedeiros adequados. Porém, seqüências de DNA podem também ser usadas como tal para transformar sistemas
- 10 hospedeiros adequados da invenção para alcançar sobreexpressão do polipeptídeo codificado.

- Assim que uma sequência de DNA de acordo com a invenção foi expressada em uma célula hospedeira adequada em um meio adequado, a fitase codificada pode ser concentrada e/ou isolada de acordo com métodos
- 15 conhecidos per se ou do meio, no caso de a fitase ser segregada no meio, ou do organismo hospedeiro, no caso de a fitase estar intracelularmente presente, por exemplo no espaço periplasmático. Métodos conhecidos para separar os componentes insolúveis do meio de cultura e a biomassa seguidos pelos métodos para concentrar a fitase podem ser aplicados para a produção de soluções de fitase concentradas ou como uma preparação para
- 20 secar a fitase. Por exemplo, métodos de filtração ou métodos de centrifugação podem ser usados para separar os componentes insolúveis, seguidos por métodos de ultrafiltração para concentrar, ou métodos de filtração de fluxo cruzado são aplicados. A secagem pode ser realizada por tentativas de
- 25 liofilização ou pulverização, métodos de granulação, extrusão ou outros métodos. Métodos conhecidos de purificação de proteína para isolar as fitases podem ser aplicados de acordo com a invenção. Por exemplo, métodos cromatográficos ou gelcromatográficos diferentes podem ser aplicados individualmente ou em combinação. Dependendo da célula hospedeira usada
- 30 em um método de produção recombinante, a enzima de acordo com a invenção pode ser modificada ou não covalentemente através de glicosilação. Em células eucarióticas, glicosilação das proteínas segregadas serve para

modular o dobramento de proteína, a estabilidade conformacional, a estabilidade térmica e a resistência vis-à-vis proteólise. Devido a uma aplicação específica da fitase, uma variante glicosilada da enzima pode ser preferida a uma variante não-glicosilada. Por exemplo, o uso de uma fitase glicosilada em alimentação de animal serve para proteger a enzima contra desnaturação térmica durante a peletização de alimentação ou contra inativação proteolítica na passagem através do estômago do animal, por meio da qual a distribuição da enzima ativa no trato intestinal e para o sítio de ação é promovida. Para usos em processamento de alimento, em que a atividade de enzima é apenas desejada durante o processamento e não no produto final, uma fitase que é termo-lábil, isto é não-glicosilada, e suscetível à degradação proteolítica pode ser preferida.

A invenção também se refere às composições de fitase contendo o polipeptídeo de acordo com a invenção. Em geral, as composições de fitase são líquidas ou secas. Composições líquidas contêm a enzima de fitase preferivelmente em uma forma purificada ou enriquecida. Porém, os agentes auxiliares como, por exemplo, um estabilizante com glicerol, Sorbitol ou monopropileno glicol, aditivos como sais, açúcar, conservantes, meios para ajustar o valor de pH, proteínas e sais de fitato ou de fosfato de mioinositol (um substrato de fitase) podem ser adicionados. Tipicamente composições líquidas são suspensões aquosas ou oleosas ou pastas fluidas, respectivamente. As composições líquidas podem ser adicionadas a um alimento ou alimentadas antes ou seguindo uma possível etapa de peletização ou processamento. Composições secas podem ser composições liofilizadas, secadas por atomização ou extrudadas, que podem exclusivamente conter a enzima. Composições secas podem ser grânulos que podem ser facilmente misturados com alimento ou componentes alimentícios, ou, mais preferivelmente, formar um componente de uma pré-mistura. O tamanho de partícula dos grânulos de enzima é preferível compatível para com os outros componentes da mistura. Isto permite dispositivos seguros e convenientes para incorporar as enzimas, por exemplo, em alimento processado, pré-misturas ou alimentação animal.

Uma formulação estável da enzima de fitase de acordo com a invenção pode, por exemplo, ser produzida pulverizando uma mistura de uma solução de enzima líquida sobre um agente de volume como farinha de feijão de soja moída e depois secando a mistura. A redução de umidade e as interações de ligação da fitase com o agente de volume protegem a enzima das influências ambientais como temperatura extrema, que pode ocorrer durante a produção da alimentação. Formulações secas e líquidas podem ser também estabilizadas quando a atividade das enzimas proteolíticas potenciais for reduzida, que pode estar presente como subprodutos na mistura de fermentação líquida usada para a produção da enzima de acordo com a invenção. A mistura de enzima seca desse modo obtida pode ser usada como um suplemento de alimentação para o uso em procriação avícola e suína. Por exemplo, a adição de 250 unidades de enzima de acordo com a invenção a 1 kg da dieta de trigo padrão mostra efeitos similares como 500 unidades de enzima de fitase de *Aspergillus*. Além disso, uma redução da suplementação de fosfato resulta em uma diminuição da poluição de fosfato que por sua vez significativamente reduz a tensão ambiental por procriação animal intensiva.

Assim que uma preparação de enzima seca é obtida, um grânulo de aglomeração pode ser produzido. Portanto, um misturador de alto cisalhamento é usado, por meio do qual o agente de volume e a enzima coaglomeram e um grânulo é formado. Grânulos de absorção são produzidos revestindo os núcleos de um material de suporte pela enzima de acordo com a invenção. Materiais de volume típicos são sal como sulfato de dissódio. Outros materiais de volume compreendem caulim, talco, silicato de alumínio de magnésio e fibras de celulose. Opcionalmente, agentes de ligação como dextrinas são também incorporados nos grânulos de aglomeração.

Materiais de suporte típicos compreendem amido, por exemplo na forma de mandioca, batata, cereais, em particular milho, arroz e trigo ou proteína contendo produtos como por exemplo proteínas de soja. Sais podem também ser usados. Opcionalmente, o grânulo é revestido com uma mistura de revestimento. Um tal grânulo compreende agentes de revesti-

mento, preferivelmente agentes de revestimento hidrofóbicos, óleo de palma desidrogenado e talco e opcionalmente outros aditivos como carbonato de cálcio ou caulim para melhorar a biodisponibilidade no sítio intencionado de ação.

- 5 Adicionalmente, as misturas com fitase podem conter outras substâncias como agentes corantes, aromas, estabilizantes, vitaminas, minerais, outras enzimas de alimento e de alimentação e outras. Isto se refere em particular às assim-chamadas pré-misturas.

- 10 Um aditivo de alimento ou de alimentação é um composto essencialmente puro ou uma composição de vários compostos que são intencionados ou adequados para adição ao alimento ou alimentação. Especificamente, é uma substância que se torna um componente de um alimento ou uma alimentação de acordo com seu propósito intencionado ou influencia as propriedades de um produto de alimento ou alimentação. Desse modo, um
- 15 aditivo de fitase designará uma fitase que não é um constituinte natural das substâncias principalmente usadas para alimento e alimentação ou não está presente nele(a) em uma concentração natural. Por exemplo, a fitase é adicionada sozinha à alimentação separadamente das substâncias de alimentação ou em combinação com outros aditivos de alimentação. Uma pré-
- 20 mistura típica usualmente compreende um ou mais compostos como vitaminas, minerais ou enzimas de fortalecimento alimentício e portadores e/ou excipientes adequados.

- Um aditivo de fitase pronto-para-usar é um aditivo que não é produzido in situ na alimentação ou em alimento processado. Um aditivo de
- 25 fitase pronto-para-usar pode ser administrado diretamente aos seres humanos ou animais ou preferivelmente diretamente após misturar com outros componentes de alimentação ou alimento. Por exemplo, um aditivo de alimentação de acordo com este aspecto da presente invenção é combinado com outras matérias-primas de aditivos de alimentação e alimento para obter
- 30 uma pré-mistura ou alimentação adicional. Tais outros componentes de alimentação compreendem um ou mais outros suplementos de enzima (preferivelmente termoestáveis), outros aditivos de alimentação, minerais e amino-

ácidos. Os aditivos alimentícios desse modo obtidos (combinados) podem compreender tipos diferentes de compostos e podem, depois, ser misturados em sua quantidade apropriada com alimentações como cereal e portadores de proteína para obter uma alimentação animal combinada. O processamento destes componentes para alimentação animal pode ser realizado seguindo mistura com dispositivos de processamento que são conhecidos per se, como uma máquina de peletização dupla, um peletizador a vapor, um expansor ou uma extrusora.

Similarmente, um aditivo alimentício de acordo com esta modalidade da presente invenção pode ser combinado com outros componentes alimentícios por meio dos quais produtos alimentícios processados são produzidos. Tais outros componentes alimentícios compreendem um ou mais suplementos de enzima, vitaminas, minerais e elementos de traço. O suplemento alimentício combinado desse modo obtido pode ser misturado em uma quantidade apropriada com outros componentes alimentícios como cereais e proteínas vegetais para render um alimento processado. O processamento destes compostos em um alimento processado pode ser realizado usando dispositivos de processamento que são conhecidos per se.

Em uma modalidade preferida as composições de fitase de acordo com a invenção adicionalmente compreendem uma quantidade eficaz de uma ou mais enzimas para alimento ou alimentação, preferivelmente selecionados de alfa-galactosidases, beta-galactosidases, laccases, outras fitases, fosfatases, endoglucanases, especialmente endo-beta-1,4-glucanases, endo-beta-1,3(4)-glucanases, endo-1,2-beta-glucanases e endo-1,3-alfa-glucanases, celulasas, xilosidases, galactanases, especialmente arabinogalactanendo-1,9-beta-galactosidases e arabinogalactanendo-1,3-beta-galactosidases, enzimas degradantes de pectina, especialmente pectinases, pectina esterases, pectinliases, poligalacturonases, arabanases, rhamnogalacturonases, rhamno-galacturonanacetilesterases, rhamnogalacturonan-alfa-rhamnosidases, pectato liases e alfa-galacturonidases, mananases, especialmente beta-manosidases, manan acetilesterases, xilan acetilesterases, proteases, xilanases, arabinoxilanases e enzimas lipolíticas como lipases,

fosfolipases e cutinases.

O aditivo de alimentação animal de acordo com a invenção é administrado ao animal antes ou simultaneamente com a alimentação. Preferivelmente, o aditivo de alimentação animal de acordo com a invenção é
5 administrado simultaneamente ao animal com a alimentação.

Uma quantidade eficaz de fitase no alimento e alimentação é aproximadamente 10 - 20.000 PPU/kg, de preferência aproximadamente 10 - 15.000 PPU/kg, mais preferido aproximadamente 10 - 10.000 PPU/kg, em especial aproximadamente 50 - 5.000 PPU/kg, em particular 50 - 2.000
10 PPU/kg de alimentação ou alimento.

A invenção também se refere ao uso de fitase para processar e fabricar alimento e alimentação. Cereais e farinhas para alimento podem ser enzimaticamente tratados com fitase para reduzir o teor de fitina ou dos materiais brutos. Teores de fitina reduzidos melhoram a qualidade do alimento aumentando a disponibilidade dos minerais essenciais como ferro, cálcio e zinco. Além do aumento da qualidade do alimento, o uso de fitase durante o processamento pode melhorar a eficiência total de produção do alimento. Por exemplo, a adição de fitase aos flocos de feijão de soja branco durante a produção de um isolado de proteína de soja pode significativamente aumentar o rendimento e a qualidade da proteína extraível. Assim, a fitase é apenas ativa durante a produção e processamento, e não se encontra mais ativa no produto final. Este aspecto é em particular de importância na produção de massa e em assadura e na produção de outro alimento pronto-para-usar com base em cereal. Similarmente, componentes alimentícios para animais
15 como farinha de feijão de soja torrada ou farinha de óleo de canola podem ser pré-tratados com fitase antes do processo de produção de fato. A remoção dos fatores antinutritivos nos componentes alimentícios para animais antes da produção leva a uma qualidade fisiologicamente mais alta e a ingredientes de alimentação animal mais valiosos. Nestes métodos de processamento, a fitase é ativa durante a produção e usualmente não é mais ativa no trato digestivo do animal sob ingestão da alimentação tratada.
20
25
30

Além do uso de fitase como um meio auxiliar no processamento

de alimentação, a presente invenção também se refere ao uso da fitase de acordo com a invenção como um auxiliador de digestão ("Verdauungshilfe"). Fitase na forma de conservantes pode ser ingerida juntamente com ingestão de alimento para distribuir a enzima ativa no trato gastrointestinal.

- 5 A fitase de acordo com a invenção pode ser vantajosamente empregada também tanto em animais monogástricos quanto poligástricos, especialmente em bezerros. Alimento para peixe e molusco ("Schalentiere") pode também ser suplementado com fitase para melhorar a exploração do alimento e para reduzir o teor de fósforos excretados na procriação animal
- 10 intensiva. A alimentação de acordo com a invenção pode também ser administrada em animais como avícula, por exemplo frangos, perus, gansos, patos como também porcos, cavalos, gado, ovelhas, cabras, cachorros e gatos como também peixe e molusco. Porém, administrar a alimentação de acordo com a invenção para porcos ou avícula é particularmente preferido.
- 15 Formulações de fitase de acordo com a invenção podem também ser combinadas com outros ingredientes, por meio dos quais composições de alimentação novas e particularmente vantajosas são criadas. Como explicado acima, a disponibilidade de fosfato de planta é baixa em farinha de feijão de soja e cereais devido à ligação ao ácido fítico. Desse modo, fosfato
- 20 inorgânico é adicionado à alimentação para assegurar uma provisão fosforosa adequada dos animais. Porém, estas alimentações contêm muito fosfato total e desse modo levam a uma poluição do ambiente com fosfato. Especificamente, a alimentação animal de acordo com a invenção compreende a combinação de uma fitase de acordo com a invenção com ingredientes de
- 25 alimentação de animais para fornecer uma alimentação contendo teores essencialmente reduzidos de fosforoso inorgânico adicionado. Em uma modalidade preferida a alimentação de acordo com a invenção compreende ingredientes de alimentação típicos, micronutrientes, elementos de traço, vitaminas, etc. como também uma quantidade eficaz de fitase e fósforoso i-
- 30 norgânico, em que a quantidade da fitase do fósforo é entre 50 e 20.000 unidades de fitase/kg de alimentação e menos que 0,45 % de fósforo inorgânico, preferivelmente entre teores de 100 - 10.000 unidades de fitase/kg de ali-

mentação e menos que 0,225 % de fósforo inorgânico, em particular teores de 150 - 10.000 unidades de fitase/kg de alimentação e menos que 0,15 % de fosforoso inorgânico, em particular teores de 200 - 20.000 unidades de fitase/kg de alimentação e nenhum fósforo inorgânico adicional.

- 5 A invenção também se refere a melhorar o ganho de peso e a razão de conversão de alimentação (FCR) em nutrição animal como também o uso da fitase de acordo com a invenção em um destes métodos. Uma fitase de acordo com a invenção permite ganho de peso melhorado e uma razão de conversão de alimentação melhorada, em particular em associação
- 10 com a alimentação tendo pouco fosfato inorgânico. De acordo com os métodos da invenção, o teor de fosfato inorgânico na alimentação pode ser reduzido para teores abaixo de 0,45 %, preferivelmente abaixo de 0,225 %. Preferivelmente, nenhum fosfato inorgânico é adicionado. Por uma disponibilidade de fosfato aumentada devido à adição da enzima de acordo com a invenção, a mineralização de osso dos animais pode ser significativamente
- 15 melhorada, que é em particular de importância em animais de crescimento rápido.

- De acordo com outra modalidade a invenção também refere-se ao uso da enzima de acordo com a invenção em assadura, por meio do qual
- 20 o desenvolvimento, elasticidade e/ou estabilidade da massa e/ou o volume, a estrutura friável e/ou a resistência do bem assando ("Backgut") ao envelhecimento ("Altbackenwerden") é/são melhorada(s). Embora a preparação da enzima de acordo com a invenção possa ser usada para a produção de massa ou produtos assados de qualquer tipo de farinha, por exemplo com
- 25 base em centeio, cevada, aveias ou milho, a preparação de enzima de acordo com a invenção provou ser particularmente útil na produção de massa ou produtos de padaria de trigo ou de uma proporção substancialmente de trigo. Os produtos de padaria que podem ser produzidos com uma preparação de enzima de acordo com a invenção compreendem pão, paezinhos franceses,
- 30 baguetes e similares. Para assadura, a preparação de enzima de acordo com a invenção pode ser usada com uma outra atividade de enzima, como, por exemplo, xilanase, lipase, amilase, oxidase ou laccase além da fitase ou

pode ser usada em combinação com outras enzimas como lipase, amilase, oxidase (por exemplo glicoseoxidase, peroxidase).

Os exemplos a seguir ilustram a invenção em mais detalhes.

EXEMPLO 1: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FITASE

5 A atividade da fitase foi medida em uma mistura de ensaio de ácido fítico de 0,5 % (aproximadamente 5 mM), citrato de sódio 200 mM, pH 5,0. Após 15 minutos de incubação a 37° C a reação foi parada adicionando um mesmo volume de 15 % de ácido tricloroacético. Os íons de fosfato liberados foram quantitativamente determinados a 820 nm misturando 100 µl da
10 mistura de ensaio com 900 µl de H₂O e 1 ml de H₂SO₄ 0,6 M, 2 % de ácido ascórbico e 0,5 % de molibdato de amônio após incubação a 50° C e uma duração de 20 min. Soluções de fosfato de potássio padrão foram usadas como uma referência.

EXEMPLO 2: CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS pKDa2 E pKDa4

15 A sequência de codificação de fitase de *E. coli* (Dassa et al. 1990, J. Bacteriol. 172:5497-5500, no. de acesso: M58704) foi gerada e sintetizada usando o uso de códon de *T. reesei* (<http://www.kazusa.or.jp/codon>). Todos os fragmentos sintetizados foram seqüenciados e os fragmentos com e sem mutações foram associados, por meio dos quais agora variantes de
20 fitase foram produzidas. Em uma das variantes por fim obtidas, o aminoácido Val²⁰⁰ (GTG) do gene de fitase foi alterado para Tyr²⁰⁰ (TAC). Esta variante foi chamada Da2. O polinucleotídeo original não-mutado ("Stammpolynucleotid") foi chamado Da4. Os clones de gene de fitase de *E. coli* maduros foram amplificados por PCr. A sequência de DNA tendo o códon de CAG
25 (Gln) na posição 1 compreende uma estrutura de leitura aberta de 1.230 pb e codifica uma enzima tendo 410 aminoácidos (SEQ ID NO: 1/2).

O peptídeo sinal (18 aminoácidos) de fitase de *A. niger* (SEQ ID NO: 3/4) foi usado para segregar a fitase de *E. coli* de *Trichoderma reesei*. O gene sintético tendo a sequência sinal de fitase de *A. niger* modificada e a
30 sequência de fitase de *E. coli* madura que contem a mutação V200Y foi clonado no plasmídeo pUC18. O vetor desse modo desenvolvido foi chamado Da2pUC3 e foi depositado de acordo com as condições acima como DSM

16396. O plasmídeo depositado contém o DNA com o uso de códon fúngico com modificações leves de acordo com os sítios de clivagem requeridos para as enzimas de restrição como pode ser deduzido da tabela 1 a seguir:

TABELA 1:

<i>T. reesei</i>			gene de fitase sintética	
uso fúngico	códon	freqüência por mil	número de tripletos no gene de fitase de <i>E. coli</i> sintética	freqüência por mil no gene de fitase de <i>E. coli</i> sintética
Ala	GCC	43,3	20	48,8
Ala	GCT	19,1	10	24,4
Ala	GCG	16,0	4	9,8
Ala	GCA	10,3	3	7,3
Arg	CGC	14,3	12	29,3
Arg	CGT	7,0	6	14,6
Arg	CGA	6,4	0	0,0
Arg	AGG	5,5	1	2,4
Arg	CGG	5,1	3	7,3
Arg	AGA	2,5	0	0,0
Asn	AAC	43,3	13	31,7
Asn	AAT	10,3	3	7,3
Asp	GAC	37,5	14	34,1
Asp	GAT	15,7	5	12,2
Cys	TGC	12,8	5	12,2
Cys	TGT	4,0	3	7,3
Gln	CAG	37,1	24	58,5
Gln	CAA	8,6	5	12,2
Glu	GAG	31,1	17	41,5
Glu	GAA	6,9	4	9,8
Gly	GGC	54,4	16	39,0
Gly	GGT	16,9	6	14,6
Gly	GGA	13,0	6	14,6
Gly	GGG	8,2	1	2,4

<i>T. reesei</i>			gene de fitase sintética	
uso fúngico	códon	freqüência por mil	número de tripletos no gene de fitase de <i>E. coli</i> sintética	freqüência por mil no gene de fitase de <i>E. coli</i> sintética
His	CAC	18,3	7	17,1
His	CAT	4,0	1	2,4
Ile	ATC	29,9	11	26,8
Ile	ATT	15,1	0	0,0
Leu	CTG	26,1	27	65,9
Leu	CTC	25,1	21	51,2
Leu	CTT	9,9	5	12,2
Leu	TTG	6,7	0	0,0
Leu	CTA	1,8	0	0,0
Leu	TTA	0,3	0	0,0
Lys	AAG	38,5	13	31,7
Lys	AAA	3,4	1	2,4
Met	ATG	18,8	5	12,2
Phe	TTC	21,3	7	17,1
Phe	TTT	13,5	4	9,8
Pro	CCC	23,3	14	34,1
Pro	CCT	15,0	9	22,0
Pro	CCG	13,4	6	14,6
Pro	CCA	7,1	0	0,0
Ser	TCC	21,6	8	19,5
Ser	AGC	21,3	9	22,0
Ser	TCG	19,3	5	12,2
Ser	TCT	14,0	4	9,8
Ser	TCA	6,4	0	0,0
Ser	AGT	4,1	0	0,0
Thr	ACC	29,0	18	43,9
Thr	ACG	20,6	10	24,4
Thr	ACT	14,0	5	12,2
Thr	ACA	6,3	0	0,0

<i>T. reesei</i>			gene de fitase sintética	
uso fúngico	códon	freqüência por mil	número de tripletos no gene de fitase de <i>E. coli</i> sintética	freqüência por mil no gene de fitase de <i>E. coli</i> sintética
Trp	TGG	17,6	8	19,5
Tyr	TAC	27,1	4	9,8
Tyr	TAT	9,0	1	2,4
Val	GTC	36,3	14	34,1
Val	GTG	14,8	5	12,2
Val	GTT	11,7	4	9,8
Val	GTA	2,2	0	0,0

No plasmídeo pKDa2 (Tyr²⁰⁰ mutante), o gene sintético está flanqueado a montante por um sítio de restrição de *SacI* de 16 pares de base do códon de começo e por um sítio de restrição *Bam*HI imediatamente a jusante do códon de parada. Os 16 pares de base a montante do códon de começo pertencem ao promotor de *cbhl* de *T. reesei* (Shoemaker et al., 1983, Bio/Technology 1, 691-696). O gene sintético foi clivado com *SacI* e *Bam*HI e foi inserido nos sítios de clivagem *SacI* e *Bam*HI seguindo o promotor de celobioidrolase I de *T. reesei* no plasmídeo pALK487 (WO 94/28117). Este constructo de plasmídeo foi chamado pKDa1. Um fragmento de *Eco*RI/*Spe*I de 4,78 kb de comprimento cego nas extremidades do plasmídeo pALK424 (WO 93/24621) contendo o marcador *amdS* e as seqüências de *cbhl* de flanqueamento de 3' foi clonado para o sítio de clivagem *Stu*I de pKDa1, por meio do qual a vetor de expressão de fitase pKDa2 foi obtido. O dito vetor foi mapeado por endonucleases de restrição e a seqüência completa do fragmento sintetizado foi confirmada através de seqüenciação.

A construção do vetor de expressão pKDa4 (tipo selvagem) foi analogamente realizada.

Os cassetes de expressão isolados dos plasmídeos pKDa2 e pKDa4, respectivamente, contêm o material genético a seguir:

20 Promotor *cbhl* (celobioidrolase I): O fragmento de *Eco*RI/*Sac*II de 2,2 kb contendo o promotor de *cbhl* é derivado de *Trichoderma reesei* QM6a.

A região de promotor também trabalha como DNA homólogo (junto com o fragmento de 3' de *cbhl*; ver abaixo) para controlar a integração do DNA transformante no locus de *cbhl*.

Seqüência sinal: O peptídeo sinal de fitase de *A. niger* (SEQ ID NO: 3/4) foi usado para segregar a fitase de *E. coli* de *Trichoderma reesei*.

Gene de fitase de *E. coli*: O gene de fitase de *E. coli* sintética (SEQ ID NO: 1) incluindo a seqüência sinal de fitase de *A. niger* modificada para expressão em *T. reesei* foi fundida entre o promotor de *cbhl* e o terminador de *cbhl*.

Terminador de *cbhl*: O fragmento de *Bam*HI/*Stu*I de 0,75 kb de comprimento contendo o terminador de *cbhl* foi adicionado subsequente à fitase de *E. coli* para assegurar a terminação da transcrição.

Gene de *amdS*: O gene, incluindo seu promotor e seu terminador, foi isolado de *Aspergillus nidulans* VH1-TRSX6 e codifica acetamidase (Hynes et al., 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3: 1430-1439; Kelly e Hynes, 1985, *EMBO J.*, 4: 475-47). Acetamidase permite que a cepa cresça usando acetamida como a fonte de nitrogênio simples, e esta característica foi usada para selecionar o transformante. O fragmento de 3,1 kb (*Spe*I/*Bam*HI com as extremidades cegas) contém 1,007 bps da região de promotor, 1,897 bps da região de codificação (incluindo íntrons) e 183 bps da região de terminador do gene de *amdS*.

Fragmento de *cbhl* de 3': O fragmento (1,7 kb, *Bam*HI/*Eco*RI, iniciando 1,4 kb após o códon de parada do gene) foi isolado de *T. reesei* ALKO2466. A cepa ALKO2466 é derivada da cepa ALKO233 (Harkki et al., 1991, *Enzyme Microb. Technol.* 13: 227-233). O fragmento de 3' é usado junto com a região de promotor para integração alvejada do cassete de expressão de fitase no locus de *cbhl* através de recombinação homóloga.

O constructo foi escolhida quanto à descoberta direcionada e substituição do gene de *cbhl* de cópia simples que está presente em *T. reesei* RH3780d, para estudar o efeito da mutação por uma cópia simples do gene.

EXEMPLO 3: TRANSFORMAÇÃO DE *Trichoderma reesei* COM pKDa2 E pKDa4 PARA OBTENÇÃO DE TRANSFORMANTE DE CÓPIA SIMPLES

RH 3780d de *T. reesei* foi transformado separadamente com os

cassetes de expressão linearizados isolados dos plasmídeos pKDa2 e pKDa4. As técnicas para transformar e manter o *T. reesei* foram aquelas de acordo com Penttilä et al (1987, Gene 61: 155-164). Os transformantes foram selecionados e purificados duas vezes através de isolamento de esporo simples. Aqueles transformantes tendo a eficiência de secreção mais alta foram selecionados de todos os transformantes. Estes transformantes com DNA do plasmídeo pKDa2 foram designados RH 31068 e RH 31069, transformantes com DNA de pKDa4 foram designados RH 31071-31075, e usados para outra caracterização.

10 EXEMPLO 4: SECREÇÃO DE FITASE EM FRASCOS AGITADOS

Transformantes que carregam os cassetes de expressão de pKDa2 e pKDa4, respectivamente, foram cultivadas em frascos agitados em meio de indução de celulase tendo a composição a seguir: concentrado de proteína de leite Nutrica 2 %, lactose 1 %, DSG 1,5 %, KH_2PO_4 5 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 %, pó de infusão de milho 0,5 %, água de torneira de equilíbrio, ajuste do valor de pH antes da esterilização para 5,3. Os filtrados da cultura obtidos após o crescimento de 6 dias foram usados para análise de SDS-PAGE e para determinação da atividade de fitase. Os resultados mostraram que as atividades de fitase mais altas foram observadas no meio de cultura com transformante contendo o cassete de expressão de pKDa2. As atividades expostas na tabela 2 abaixo são atividades máximas que foram obtidas na fermentação dos melhores transformantes no período de 6 dias.

Tabela 2: PRODUÇÃO DE FITASE DE *E. coli* POR TRANSFORMANTE CONTENDO O CASSETE DE EXPRESSÃO DE pKDa2 OU pKDa4.

cepa	SDS-PAGE	evento de integração de análise de Southern Blot	número de cópia do cassete de expressão	fitase PPU g^{-1}	cassete de expressão
RH31068	CBHI ⁺	locus de <i>cbhl</i>	uma cópia	417	pKDa2
RH31069	CBHI ⁺	locus de <i>cbhl</i>	uma cópia	411	pKDa2
RH31071	CBHI ⁺	locus de <i>cbhl</i>	uma cópia	188	pKDa4
RH31072	CBHI ⁺	locus de <i>cbhl</i>	uma cópia	182	pKDa4
RH31073	CBHI ⁺	locus de <i>cbhl</i>	uma cópia	171	pKDa4

cepa	SDS-PAGE	evento de integração de análise de Southern Blot	número de cópia do cassete de expressão	fitase PPU g ⁻¹	cassete de expressão
RH31074	CBHI ⁻	locus de <i>cbhl</i>	uma cópia	167	pKDa4
RH31075	CBHI ⁻	locus de <i>cbhl</i>	uma cópia	158	pKDa4
RH3780d	CBHI ⁺			0,7	

Os resultados acima mostram que as cepas transformadas com o cassete de expressão pKDa2 contendo o mutante Tyr²⁰⁰ exibem a secreção de fitase, que é aproximadamente duas vezes tão alta quanto aquela das cepas transformadas com a sequência fitase de *E. coli* do tipo selvagem pKDa4.

5 EXEMPLO 5: SOUTHERN BLOTTING

A análise de Southern Blot foi executada em DNAs genômicos que foram isolados da cepa hospedeira RH3780d e transformantes de ambos os constructos para avaliar o resultado de integração do cassete de expressão no genoma. Seguindo clivagem do DNA genômico com *EcoRI* e triagem com um fragmento de *EcoRI* de 9,0 kb, uma banda de hibridação em 9,0 kb estava presente em todos os transformantes. O tamanho daquela banda correspondeu ao fragmento do cassete de expressão de 9,0 kb sugerindo uma integração intacta do cassete completo no genoma.

A clivagem do DNA com *XbaI* mostrou duas bandas de hibridação em 1,7 e 9,0 kb na cepa hospedeira, enquanto que três bandas de hibridação em 1,7, 4,0 e 7,0 kb estavam presentes em todos os transformantes. Como esperado do evento de permuta dupla, uma integração de uma cópia do cassete de expressão no locus de *cbhl* leva a três bandas de 1,7, 4,0 e 7,0 kb e na ausência da banda do tipo selvagem de 9,0 kb. As bandas de 4,0 e 7,0 kb e na ausência da banda do tipo selvagem de 9,0 kb. As bandas de 4,0 e 7,0 substituem a banda de 9,0 do locus de *cbhl* do hospedeiro e a banda de 1,7 kb ficou inalterada.

As intensidades dos sinais de hibridação não diferem entre os transformantes e aqueles constructos.

Os resultados da análise Southern Blotting, SDS-PAGE e determinação das atividades de fitase estão mostrados acima na tabela 2. A análise

lise de Southern Blot mostrou que todos os transformantes selecionados continham o gene de fitase de *E. coli* e o gene mutado, respectivamente, como cópia simples no locus alvo de *cbhl*.

EXEMPLO 6: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS VARIANTES DE FI-

5 TASE

Sobrenadantes de cepas recombinantes foram separados em Nu-Page BisTris a 10 % de gel de SDS-PAGE e tingidos com Coomassie (Figura 1). Devido à glicosilação pela cepa hospedeira a fitase ocorreu como três bandas entre 44,2 e 53,2 kDa. Todas as amostras foram aplicadas com atividades de fitase
10 iguais. Os géis foram secados e varridos em um escâner de leito chato Agfa com o software Phoretix ID Advanced. As áreas das três bandas foram integradas e os dados estão resumidos na tabela 3 a seguir. Para todas as quatro cepas testadas, a soma da área de todas as três bandas de fitase é igual dentro do escopo da precisão de medição. Isto mostra que a mutação em Da2 não resulta em alterações
15 na atividade específica da enzima e, desse modo, demonstra que a mutação é responsável pela secreção aumentada da proteína de fitase.

TABELA 3: INTEGRAÇÃO DA ÁREA DAS BANDAS DE FITASE NO GEL DE SDS-PAGE USANDO O PROGRAMA PHORETIX ID ADVANCED

banda	PM	RH 31074 (pKDa 4)	RH 31071 (pKDa 4)	RH 31069 (pKDa 2)	RH 31068 (pKDa 2)
		rota 2	rota 3	rota 4	rota 5
1	aprox. 50, 52,3 kDa	56676016	52581584	42442918	41508017
2	aprox. 46,7, 48,8 kDa	35235004	34577257	47107624	43668804
3	aprox. 44,2, 45,6 kDa	18121276	16714340	15716570	13439975
		110032296	103873181	105267112	98616796
soma					
Proteína total/ tra- je-tória [ug]		2,04	1,49	0,85	0,78

Exemplo 7: MELHORIA DA DISPONIBILIDADE DE FOSFATO POR FITASE DE ACORDO COM A INVENÇÃO (MUTANTE DE Tyr²⁰⁰) EM PORCOS

- Um experimento de digestão foi realizado com porcos em dois
- 5 períodos de coletânea subseqüentes de 5 dias sugerindo um período de condicionamento de 9 dias em cada caso. Uma ração com teor reduzido de fosfato digestível com base em malte de milho e malte de feijão de soja extraído foi usada como um controle negativo e foi suplementada com a fitase de acordo com a invenção (o mutante de fitase Tyr²⁰⁰ de *E. coli*) em quantida-
- 10 dades de alimentação de 125, 250, 500 e 750 PPU/kg. A fitase foi adicionada à alimentação inteira por meio de uma pré-mistura. No total, 40 porcos machos castrados em 5 grupos de tratamento foram usados. Todos os grupos de tratamento consistiram em 8 porcos (4 porcos em dois períodos de coletânea subseqüente). Os tratamentos foram como segue:
- 15 controle negativo¹ (NC)
 NC + fitase (125 PPU/kg⁻¹)
 NC + fitase (250 PPU/kg⁻¹)
 NC + fitase (500 PPU/kg⁻¹)
 NC + fitase (750 PPU/kg⁻¹)
- 20 ¹alimentação: 71,5 % de farinha de milho, 28,8 % de malte de feijão de soja extraído
 4,4 g kg⁻¹ P total; 1,9 g kg⁻¹ de não-fitato P; 5,5 g kg⁻¹ de Ca; fitase nativa: 90 PPU/kg⁻¹.

Os parâmetros medidos compreendem fosfato e digestibilidade

25 de cálcio como também retenção de fosfato e de cálcio.

Retenção e excreção de fosfato:

- Os resultados mostram que a digestibilidade de fosfato foi significativamente aumentada em 42,5 % no controle negativo para 59,3, 65,3, 65,0 e 66,3 %, respectivamente, ($p < 0,05$) em todas as quantidades
- 30 adicionadas de fitase (125; 250; 500 e 750 PPU/kg⁻¹ de alimentação). Isto levou a uma diminuição significativa da excreção de fosfato fecal de 203 mg kg⁻¹ 0,75 d⁻¹, medida no grupo de controle negativo, para 142, 120, 121 e

116 mg kg⁻¹ 0,75 d⁻¹ nos grupos de tratamento com alimentação enriquecida de fitase (p < 0,05). A retenção de fosfato melhorou significativamente de 152 mg kg⁻¹ 0,75 d⁻¹, medida no controle negativo, para 221, 232, 231 e 236 mg kg⁻¹ 0,75 d⁻¹ nos grupos de tratamento com alimentação enriquecida de

- 5 fitase (p < 0,05). As diferenças entre os tratamentos de fitase foram significativas entre a dosagem mais baixa (125 PPU kg⁻¹ de alimentação) e todas as outras administrações (p < 0,05).

RETENÇÃO E EXCREÇÃO DE CÁLCIO

- A adição de fitase de acordo com a invenção aumentou significativamente a utilização de cálcio (p < 0,05) em 12,1, 14,3, 15,2 e 14,6 % quando comparado ao grupo de controle. A excreção de cálcio por meio da urina foi relativamente alta (114 mg kg⁻¹ 0,75 d⁻¹) no controle negativo, que foi presumivelmente para designar o baixo teor de P na alimentação. A excreção de cálcio por meio da urina foi reduzida para 108, 118, 95 e 88 mg kg⁻¹ 0,75 d⁻¹ nos grupos de tratamento de fitase, que foi significativa para a quantidade mais alta administrada (750 PPU kg⁻¹, p < 0,05) quando comparado com o controle negativo. A retenção de cálcio medida no controle negativo foi significativamente aumentada (p < 0,05) de 181 mg kg⁻¹ 0,75 d⁻¹ para 240, 245, 266 e 270 mg kg⁻¹ 0,75 d⁻¹ para todos os tratamentos de fitase. As
- 15
- 20 diferenças entre as quantidades adicionadas de fitase foram significativas (p < 0,05) entre as dosagens mais altas (500 e 750 PPU kg⁻¹ de alimentação) quando comparadas às dosagens inferiores (125 e 250 PPU kg⁻¹).

Os resultados mostram que a fitase de acordo com a invenção tiveram um efeito bom na degradação de fitato no trato digestivo de porcos.

- 25 Baixas quantidades da fitase de acordo com a invenção já podem promover a digestibilidade e retenção de cálcio e de fosfato em uma extensão similar como quantidades adicionadas mais altas.

Exemplo 8: MELHORIA DA DISPONIBILIDADE DE FOSFATO PELA FITASE DE ACORDO COM A INVENÇÃO (MUTANTE DE Tyr²⁰⁰) EM

- 30 FRANGOS

Um experimento de digestão foi realizado com galinhas ("Masthühner") em dois períodos de coletânea. Um período de coletânea de 4 dias

foi realizado seguindo um período de condicionamento em gaiolas de também 4 dias. Os períodos de coletânea foram realizados ao término da fase inicial e ao término da fase de crescimento. Uma ração com teor reduzido de fosfato digestível, com base em malte de milho e malte de soja extraído, foi usada como um controle negativo e foi suplementada com a fitase de acordo com a invenção em quantidades de 125 e 250 PPU kg^{-1} de alimentação. Adicionalmente, um outro tratamento foi realizado com o teor de fosfato recomendado sem adição de fitase. No total 24 frangos foram atribuídos a 4 grupos de tratamento. Os grupos de tratamento consistiram em 6 frangos por período de coletânea. O tratamento é como segue:

Controle negativo¹ (NC)

NC + fitase (125 PPU kg^{-1})

NC + fitase (250 PPU kg^{-1})

Controle positivo²

¹Alimentação: 53,6-56,5 % de farinha de milho; 37,9-34,5 % de malte de feijão de soja extraído; 4,4-4,7 g kg^{-1} de P total; 2,0 g kg^{-1} de P de não-fitato; 6,4-5,9 g kg^{-1} de Ca

²Alimentação: 50,4-54,3 % de farinha de milho; 35,9-35,0 % malte de feijão de soja extraído; 7,3-6,4 g kg^{-1} de P total; 4,5-3,5 g kg^{-1} de P de não-fitato; 9,8-7,8 g kg^{-1} de Ca

Os parâmetros medidos compreendem excreção de fosfato e retenção de fosfato. Os resultados mostram que ambas as quantidades adicionadas de fitase P (125 e 250 PPU kg^{-1} de alimentação) aumentaram a retenção de fosfato e diminuíram a excreção de fosfato. As medições ao término da fase inicial mostraram um aumento significativo da retenção de fosfato de 58,7 % no controle negativo para 64,2 e 63,9 % para o tratamento de fitase ($p < 0,05$). Isto levou a uma redução da excreção de fosfato em frangos tendo recebido a fitase que foi reduzida em 11,4 e 12,7 % (tendência) quando comparada ao controle negativo. Medições ao término da fase de crescimento também mostrou um aumento da retenção de fosfato de 54,7 % no controle negativo para 58,2 e 58,9 % para tratamentos de fitase (tendência). Isto levou a uma diminuição da excreção de fosfato em frangos tendo

recebido a fitase que foi significativamente reduzida ($p < 0,05$) em 11 % e 12,7 % quando comparado ao controle negativo.

EXEMPLO 9: EXPERIMENTO DE ASSADURA: PÃO DE VIENA

Pão de Viena foi assado de 320 g pedaços de massa obtidos
 5 misturando 1,000 g de farinha de trigo (Pfalzer Mühlenwerke, Mannheim, Tipo 550), 30 g de levedura comprimida (Fala GmbH, Alemanha), 20 g de sal, 50 mg de ácido ascórbico, 580 g de água. Após misturar todos os ingredientes em velocidade lenta durante 2 minutos e misturar durante 6 minutos em velocidade alta (Misturador Diosna SP12), a massa teve uma temperatura de
 10 27° C e foi deixada durante 10 minutos em temperatura ambiente (22° C) abaixo de uma cobertura de pano. Seguindo o primeiro período de repouso da massa, a massa foi dividida em pedaços de 320 g cada (± 1 g de tolerância) e configurada em uma forma redonda. Depois disso, um segundo período de repouso da massa de 20 minutos seguiu. Seguindo o segundo período
 15 de repouso de massa, a massa foi formada em um dispositivo mecânico e foi colocada em placas de fermentação cobertas com pano. A massa de pão foi depois fermentada a 32° C sob 85 % de umidade relativa (maturação final) e foi assada após um tempo de maturação de 70 minutos. A massa/o pão foi assada(o) com uma injeção de vapor de 5 segundos durante 35 minutos a
 20 235° C e o forno tendo níveis de inserção múltiplos ("in einem mehrschienigen Ofen") (Winkler & Wachtel, Alemanha).

Os efeitos diferentes da fitase de acordo com a invenção (o mutante Tyr²⁰⁰ de fitase de *E. coli*) nos experimentos de assar foram comparados com uma massa de controle sem adição de fitase em paralelo. O volume
 25 dos pães de controle foi tirada para 100 %.

O volume dos pães de pão foi determinado pelo método de deslocamento de semente de colza ("Rapssamenverdrängungsverfahren"). A reologia da massa e as propriedades do pão foram sensorialmente avaliadas por padeiro especializado/de teste de aplicação qualificada e o volume médio dos três pães por teste foi medido.
 30

Os resultados do experimento de assadura estão resumidos na tabela 9 a seguir:

TABELA 4

experimento											
unidades por kg de farinha											
	0	110	220	430	870	1730	3960	6930	13860	27715	55430
massa após empastar ("Anteigen")											
resistência	4	4,5	4,5	5	5	5	5	5	6	6	6
massa após prova final ("End-gare")											
volume	9	9	9	9	9	4	9	4	4	4	9
estabilidade	4	4	4	5	5	5	5	5	5,5	5,5	5,5

Critérios de avaliação:

critérios de avaliação	1	2	3	4	5	6	7
massa após empastar							
resistência	muito mais macia	mais macia	Ligeiramente mais macia	conforme referência	Ligeiramente mais firme	mais firme	muito mais firme
massa após prova final							
volume	muito menor	Menor	Ligeiramente menor	conforme referência	Ligeiramente maior	maior	bem maior
estabilidade	muito instável	Instável	Ligeiramente instável	conforme referência	Ligeiramente mais estável	mais estável	muito mais estável

Explicação dos critérios de avaliação:

Resistências: dureza da massa, avaliada por um padeiro experiente.

Volume: avaliação visual do volume do pedaço de massa ("Teigling") após prova final.

Estabilidade: teste da capacidade de retenção de gás por pressurização do pedaço de massa após prova final e avaliação do volume dimi-

nuído, que ocorreu.

Os resultados acima mostram que a fitase de acordo com a invenção teve um efeito de estabilização na massa.

5 A fitase de acordo com a invenção teve um efeito de estabilização na massa.

Os experimentos de acordo com os Exemplos 7 a 9 mostram que o mutante de fitase Tyr²⁰⁰ de *E. coli* de acordo com a invenção não é diferente da fitase do tipo selvagem em seu efeito. Porém, o mutante de fitase Tyr²⁰⁰ de *E. coli* de acordo com a invenção é caracterizado pela vantagem de uma atividade
10 mais alta no sobrenadante de cultura em total e uma eficiência de secreção mais alta, respectivamente, quando comparado ao tipo selvagem.

Exemplo 10: CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pKDa41

O plasmídeo pKDa41 compreende o gene de fitase de *E. coli* (WT) sob controle do promotor de *cbhl* de *T. reesei* e o terminador de *cbhl*. A
15 construção é comparável à construção do plasmídeo pKDa4 com a exceção que os 16 pares de base que estavam localizados a montante para o códon de começo de fitase CCGCGGACTGCGCATC ATG foram alterados para CCGCGGACTAGGC ATC e um sítio de restrição de *PacI* imediatamente a jusante do códon de parada.

20 Para construir o plasmídeo pKDa41, o gene de fitase de *E. coli* (WT) foi amplificado do plasmídeo pKDa4 por meio de PCR. O produto de PCR foi clivado com *AvrII* e *PacI* e foi inserido nos sítios de clivagem de *SpeI* e *PacI* seguindo o promotor de *cbhl* de *T. reesei* no plasmídeo pAB489. O plasmídeo resultante tem a designação pKDa41 e foi mapeado por endonucleases de restrição e a sequência de fitase foi confirmada através de se-
25 quenciamento. O cassete de expressão (fragmento de *NotI*) isolado do plasmídeo pKDa41 contém materiais genéticos idênticos como aqueles do plasmídeo pKDa4. O plasmídeo pKDa41 foi usado como material de partida para reduzir as variantes de fitase diversas e como uma referência no exame da
30 expressão de fitase em RH3780d de *T. reesei*.

O plasmídeo pAB489 é o resultado do plasmídeo pALK487 (WO 94/28117) por inserção de outros sítios de restrição (*SpeI* e *PacI*) no sítio de

SacII entre o promotor de *cbhl* e o terminador de *cbhl* contidos em pALK487 como também o fragmento de *EcoRI/SpeI* de 4,78 kb de comprimento do plasmídeo pALK424 (WO 93/24621) apresentado no Exemplo 2 e contendo o marcador de *amdS* e as seqüências de *cbhl* de flanqueamento de 3'. O

- 5 posicionamento dos elementos é o mesmo que em pKDa4 e permite a clonagem direta das variantes de gene para os sítios de clivagem de *SpeI* e *PacI* do sítio de multiclonagem seguindo o promotor de *cbhl* de *T. reesei*.

EXEMPLO 11: CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE VARIANTE FITASE

Os plasmídeos de variante de fitase a seguir foram construídos:

- 10 pPhy-V200L, pPhy-V200P, pPhy-L207F

- Para produzir as variantes de fitase, as mutações do gene de fitase foram realizadas pelo método de PCR analogamente ao princípio que é relatado em Nucleic Acids Research 1989, 17 (2), 723-733 e Nucleic Acids Research 1990, 18 (6), 1656. A construção como também a clonagem dos
- 15 plasmídeos de variante de fitase é idêntica à produção do plasmídeo pKDa41 relatado no Exemplo 10. As seqüências das variantes de fitase foram confirmadas através de seqüenciação.

EXEMPLO 12: TRANSFORMAÇÃO DE RH3780d DE *T. reesei* COM pKDa41 E VARIANTES, RESPECTIVAMENTE

- 20 A transformação de RH3780d de *T. reesei* com os cassetes de expressão isolados do plasmídeo pKDa41 do Exemplo 10 e os plasmídeos de variante de fitase do Exemplo 11 foi analogamente realizada à transformação com os cassetes de expressão isolados dos plasmídeos pKDa2 e pKDa4 (Exemplo 3). Os cassetes de expressão foram isolados como frag-
- 25 mentos de *NotI* dos plasmídeos pKDa2, pKDa4, pKDa41 e plasmídeos de variante de fitase.

Exemplo 13: PRODUÇÃO DE FITASE DE *E. coli* POR CASSETES DE EXPRESSÃO DE pKDa41 E DE VARIANTE DE FITASE EM FRASCOS AGITADOS

- 30 Os transformantes foram crescidos como descritos no Exemplo 4 e a fitase nos filtrados de cultura foi usada para outros exames.

TABELA 5: PRODUÇÃO DE FITASE DE *E. coli* POR TRANSFORMANTES

CONTENDO OS CASSETES DE EXPRESSÃO DE pKDa41 OU DE VARIANTE DE FITASE.

Cepa	SDS-PAGE	número de cópias de cassete de expressão	fitase PPU g ⁻¹	cassete de expressão
RH31551	CBHI ⁻	uma cópia	82	pKDa41
RH31549	CBHI ⁻	uma cópia	76	pKDa41
RH31565	CBHI ⁻	uma cópia	225	pPhy-V200L
RH31567	CBHI ⁻	uma cópia	230	pPhy-V200L
RH31570	CBHI ⁻	uma cópia	291	pPhy-V200P
RH31571	CBHI ⁻	uma cópia	295	pPhy-V200P
RH31559	CBHI ⁻	uma cópia	114	pPhy-L207F
RH31563	CBHI ⁻	uma cópia	112	pPhy-L207F
RH3780d	CBHI ⁺		0,7	

Listagem de Sequência

<110> AB ENZYMES GMBH

<120> POLINUCLEOTÍDEO TENDO ATIVIDADE DE FITASE E SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO CODIFICANDO O MESMO

<130> 14052WO

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Versão 2.1

<210> 1

<211> 1230

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Tyr200 mutante de fitase de E. coli do tipo selvagem madura

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1230)

<400> 1

cag agc gag ccc gag ctg aag ctg gag tcg gtc gtg atc gtc agc cgc 48
 Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser Arg
 1 5 10 15

cac ggc gtg cgt gct cct acc aag gcc acg cag ctg atg cag gac gtc 96
 His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met Gln Asp Val
 20 25 30

acc cct gac gcc tgg ccc acc tgg ccc gtc aag ctt ggc tgg ctg act 144
 Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Trp Leu Thr
 35 40 45

cct cgc ggc ggt gag ctg atc gcc tac ctg gga cac tac caa cgc cag 192
 Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Gln Arg Gln
 50 55 60

cgt ctg gtt gcc gac gga ctg ctg gct aag aag gga tgc ccg cag tct 240
 Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys Lys Gly Cys Pro Gln Ser
 65 70 75 80

ggc cag gtc gcg att atc gcc gat gtc gac gag cgt acc cgt aag acc 288
 Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys Thr
 85 90 95

ggc gaa gcc ttc gct gcc ggc ctg gct cct gac tgt gcc atc acg gtc 336
 Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr Val
 100 105 110

cac acc cag gca gac acg tcc agc ccc gat ccg ctg ttt aac cct ctg 384
 His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro Leu
 115 120 125

aag act ggc gtc tgc caa ctg gat aac gcc aac gtg acc gac gcc atc 432
 Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala Asn Val Thr Asp Ala Ile
 130 135 140

ctc agc agg gct gga ggt tcc atc gcc gac ttc acc ggc cat cgg cag 480
 Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Arg Gln
 145 150 155 160

acg ggc ttc cgc gag ctg gag cgg gtc ctt aat ttt ccc cag tcg aac 528
 Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser Asn
 165 170 175

ctg tgc ctg aag cgt gag aag cag gac gag agc tgt tcc ctg acc cag 576
 Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr Gln
 180 185 190

gca ctg ccg tcg gaa ctg aag tac agc gcc gac aac gtc tcc ctt acc 624
 Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Tyr Ser Ala Asp Asn Val Ser Leu Thr
 195 200 205

ggt gcc gtt agc ctg gct tcc atg ctg acg gag atc ttc ctg ctg cag 672
 Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu Gln
 210 215 220

caa ggc cag gga atg ccc gag cct ggg tgg ggc cgc att acc gat tct 720
 Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp Ser
 225 230 235 240

cac cag tgg aac acc ctg ctg tcg ctt cac aac gcc cag ttc tat ctg 768
 His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe Tyr Leu
 245 250 255

ctc caa cgc acg ccc gag gtt gcc cgc agc cgc gcc acc ccg ctg ctg 816
 Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu Leu
 260 265 270

gac ctc atc gag act gcg ctg acg ccc cac cct ccg cag aag cag gct 864
 Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln Ala
 275 280 285

tac ggt gtc acc ctc ccc act tcc gtc ctg ttt atc gcc ggt cac gac 912
 Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His Asp
 290 295 300

acc aac ctg gcc aat ctc ggc ggc gct ctg gag ctc aac tgg acg ctt 960
 Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Asn Trp Thr Leu
 305 310 315 320

ccc gga cag ccg gat aac act ccc cct ggc ggt gag ctg gtg ttc gaa 1008
 Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe Glu
 325 330 335

cgc tgg cgt cgg ctc agc gac aac tcc cag tgg att cag gtt tgc ctg 1056
 Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser Leu
 340 345 350

gtc ttc cag acc ctg cag cag atg cgc gac aac acg ccc ctg tcc ctc 1104
 Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser Leu
 355 360 365

aat acc cct ccc ggc gag gtc aag ctg acc ctg gcc ggc tgt gaa gag 1152
 Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu Glu
 370 375 380

cgc aac gcc cag ggc atg tgc tct ctc gct ggc ttt acg caa atc gtc 1200
 Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile Val
 385 390 395 400

aac gag gcc cgc atc ccc gct tgc tct ctg 1230
 Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
 405 410

<210> 2

<211> 410

<212> PRT

<213> Sequência Artificial.

<223> Descrição da Sequência Artificial: Tyr200 mutante de fitase de E. coli do
 tipo selvagem madura

<400> 2

Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser Arg
 1 5 10 15

His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met Gln Asp Val
 20 25 30

Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Trp Leu Thr
 35 40 45

Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Gln Arg Gln
 50 55 60

Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys Lys Gly Cys Pro Gln Ser
65 70 75 80

Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys Thr
85 90 95

Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr Val
100 105 110

His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro Leu
115 120 125

Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala Asn Val Thr Asp Ala Ile
130 135 140

Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Arg Gln
145 150 155 160

Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser Asn
165 170 175

Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr Gln
180 185 190

Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Tyr Ser Ala Asp Asn Val Ser Leu Thr
195 200 205

Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu Gln
210 215 220

Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp Ser
225 230 235 240

His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe Tyr Leu
245 250 255

Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu Leu
260 265 270

Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln Ala
275 280 285

Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His Asp
290 295 300

Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Asn Trp Thr Leu
305 310 315 320

Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe Glu
325 330 335

Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser Leu
340 345 350

Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser Leu
 355 360 365

Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu Glu
 370 375 380

Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile Val
 385 390 395 400

Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
 405 410

<210> 3

<211> 54

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Sequência de sinal fitase negro A modificada (sem íntron)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(54)

<400> 5

atg ggc gtc tct gct gtt cta ctt cct ttg tat ctc ctg tct gga gtc 46
 Met Gly Val Ser Ala Val Leu Leu Pro Leu Tyr Leu Leu Ser Gly Val
 1 5 10 15

acc tcc
 Thr Ser

54

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<223> Descrição da Sequência Artificial: Sequência de sinal fitase negro A modificada (sem íntron)

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de DNA recombinante que, sob expressão em uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica, codifica um polipeptídeo tendo atividade de fitase, caracterizada pelo fato de que a molécula de DNA re-
- 5 combinante compreende uma sequência de DNA selecionada de:
- a) sequências de DNA que foram obtidas por variações da sequência de fitase de *E. coli* do tipo selvagem madura, em que as sequências de DNA apresentam pelo menos uma mutação selecionada a partir do grupo Val 200 → Leu, Val 200 → Ile, Val 200 → Pro, Val 200 → Tyr, Leu 207
- 10 → Tyr, Leu 207 → Phe,
- b) sequências de DNA que estão relacionadas às sequências de acordo com a) devido à degeneração do código genético,
- em que a molécula de DNA recombinante é, sob expressão em uma célula hospedeira adequada, associada a uma atividade aumentada da
- 15 proteína desse modo codificada no sobrenadante de cultura.
2. Molécula de DNA recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que tem a sequência de SEQ ID NO: 1.
3. Molécula de DNA recombinante de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que compreende ainda uma sequência
- 20 sinal com a sequência de SEQ ID NO: 3 derivada do gene da fitase de *Aspergillus niger*.
4. Polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que tem atividade de fitase e é codificado por uma molécula de DNA recombinante como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou é obtido por expressão de uma
- 25 célula hospedeira transformada com o mesmo.
5. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que tem a sequência de SEQ ID NO: 2.
6. Construção de DNA tendo a capacidade para controlar a expressão de um gene de fitase mutado em um hospedeiro sob introdução em
- 30 uma célula hospedeira adequada, caracterizada pelo fato de que opcionalmente contém um promotor, opcionalmente sequências sinais e marcadoras, uma sequência de DNA como definida na reivindicação 1 ou 2, um termina-

dor e opcionalmente sequências de flanqueamento de 5' e 3'.

7. Construção de DNA de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o promotor é o promotor de celobioidrolase I, celobioidrolase II, amilase, glucoamilase, xilanase ou de enolase.

5 8. Construção de DNA de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que a sequência sinal é uma sequência sinal de fitase opcionalmente modificada de *Aspergillus niger*., preferencialmente a sequência de SEQ ID NO: 3.

9. Vetor tendo a capacidade para transformar uma célula hospedeira, caracterizado pelo fato de que contém uma construção como definida na reivindicação 6.

10 10. Vetor de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que é o plasmídeo Da2pUC3, depositado sob o número de acesso DSM 16396.

15 11. Célula hospedeira transformada, caracterizada pelo fato de que é selecionada de fungo, levedura e bactérias, contendo uma molécula de DNA recombinante como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e sendo fornecida com a capacidade de expressar um polipeptídeo tendo atividade de fitase.

20 12. Célula hospedeira transformada de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que pertence ao gênero *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Mucor* ou *Penicillium*.

13. Método para produzir fitase, caracterizado pelo fato de que uma célula hospedeira transformada como definida na reivindicação 11 ou 12 é cultivada sob condições condutivas para a formação de fitase, e a fitase desse modo produzida é isolada.

25 14. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um polipeptídeo como definido na reivindicação 4 ou 5, opcionalmente junto com outros agentes auxiliares e/ou ativos.

30 15. Composição de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que é uma composição alimentícia ou de ração.

16. Composição de acordo com a reivindicação 14, caracteriza-

da pelo fato de que a composição é um auxílio de panificação.

17. Uso de um polipeptídeo como definido na reivindicação 4 ou 5 , caracterizado pelo fato de que é para a manufatura de uma preparação para melhorar a utilização de fosfato de nutrição em animais e humanos.

5 18. Uso de um polipeptídeo como definido na reivindicação 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que é para melhorar as propriedades reológicas das massas para a produção de produtos de padaria..

P10510504

1/5

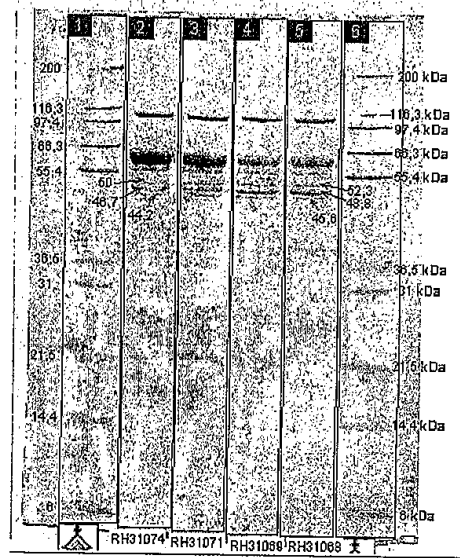


Fig. 1

P10516504

2/5

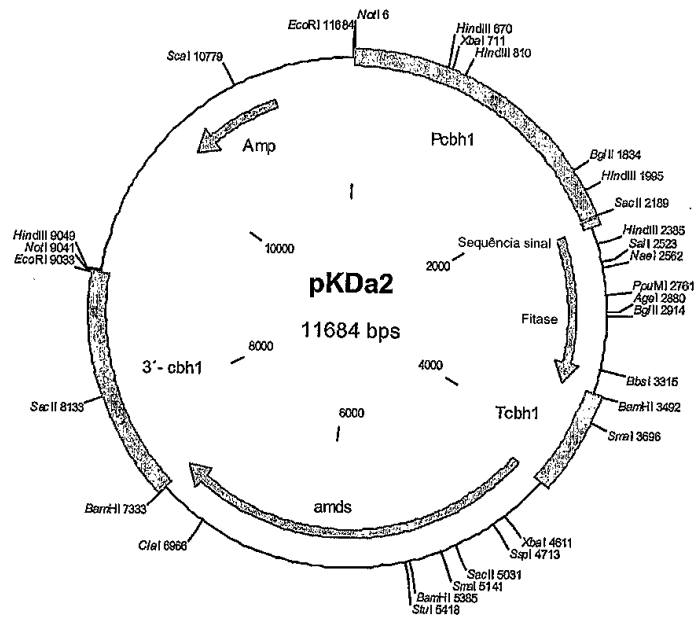


Fig. 2

P10510504

3/5

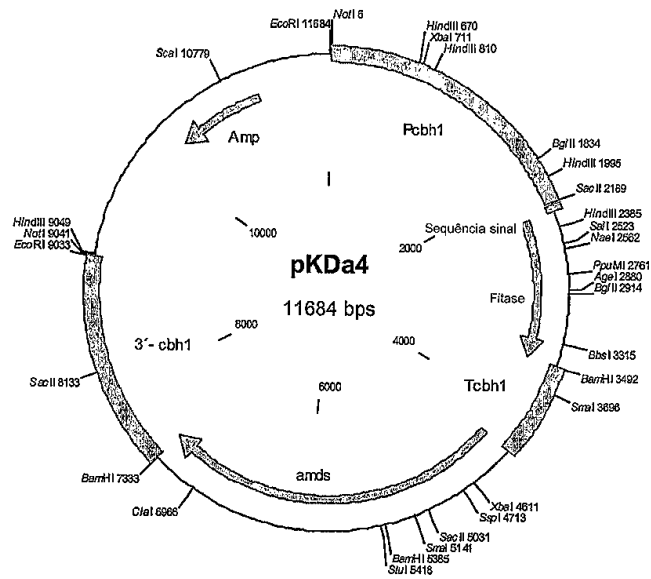


Fig. 3

P10516504

4/5

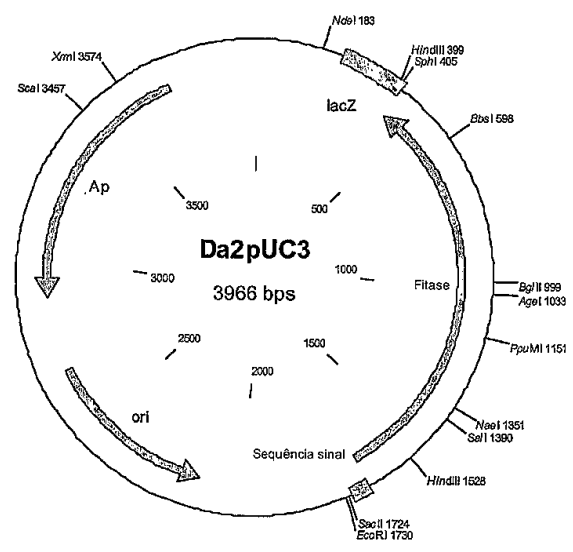


Fig. 4

PI0516504

5/5

```

1  cagagtgagc cggagctgaa gctggaaagt gtggtgattg tcagtcgtca
5  51  tgggtgtgctg gctccaacca aggccacgca actgatgcag gatgtcacc
   101  cagacgcagc gccaacctgg ccggtaaaac tgggttggct gacacgcgg
   151  ggtggtgagc taatcgccca tctcggacat taccacgccc agcgtctggt
   201  agccgacgga ttgctggcga aaaagggtcg ccgcagctct ggtcagggtcg
   251  cgattattgc tgatgtcgac gagcgtaccc gtaaaacagg cgaagccttc
   301  gccgcggggc tggcacotga ctgtgcaata accgtacata ccagggcaga
  10  351  tacgtccagt ccgcatccgt tatttaatcc tctaaaaact ggcgtttgcc
   401  aactggataa cgcgaacgtg actgacgcga tctcagcagc ggcaggaggc
   451  tcaattgctg actttacogg gcacgcgcaa acggcgtttc gcgaactgga
   501  acgggtgctt aattttccgc aatcaaaact gtgccttaaa cgtgagaaac
   551  aggacgaaag ctgttcatta acgcaggcat taccatcgga actcaaggtg
  15  601  agcgccgaca atgtctcatt aaccggtgcg gtaagcctcg catcaatgct
   651  gacggagata tttctcctgc aacaagcaca gggaatgccg gagccggggt
   701  ggggaaggat caccgattca caccagtgga acaccttgct aagtttgcat
   751  aacgcgcaat tttatttgct acaacgcacg ccagaggttg ccgcagcccg
   801  cgccaccccg ttattagatt tgatcaagac agcgttgacg ccccatccac
  20  851  cgcaaaaaca ggcgtatggt gtgacattac ccaactcagt gctgtttatc
   901  gccggacacg atactaatct ggcaaatctc ggccggcgac tggagctcaa
   951  ctggacgctt ccggttcagc cggataaac cccgccaggt ggtgaactgg
  1001  tgtttgaacg ctggcgctcg ctaagcgata acagccagtg gattcaggtt
  1051  tcgctggtct tcagacttt acagcagatg cgtgataaaa cgcgctgttc
  25  1101  attaaatagc ccgccggag aggtgaaact gaccctggca ggatgtgaag
  1151  agcgaaatgc gcaggcgatg tgttcgttgg cagggtttac gcaaatcgtg
  1201  aatgaagcac gcataccggc gtgcagtttg

```

30

Fig. 5