



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

(21) PI 0806886-0 A2



(22) Data de Depósito: 30/01/2008
(43) Data da Publicação: 29/04/2014
(RPI 2260)

(51) Int.Cl.:
A01H 5/00
C12N 9/16
C12N 15/82
C12N 15/55

(54) Título: POLIPEPTÍDEO, FITASE, VARIANTE DE UM POLIPEPTÍDEO, POLINUCLEOTÍDEO, CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLEICO, CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE, MÉTODO PARA PRODUZIR O POLIPEPTÍDEO, E, USO DA FITASE OU DE UMA COMPOSIÇÃO

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 30/01/2007 EP 07101395.7

(73) Titular(es): Novozymes A/S

(72) Inventor(es): Carsten Sjoeholm, Lars Kobberoe Skov, Leonardo de Maria, Soeren Flensted Lassen

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

(86) Pedido Internacional: PCT EP2008051137 de 30/01/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/092901de 07/08/2008

Numeração	30	40	50	60	70	80
AEH25057	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25059	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25058	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25067	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25061	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25072	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25074	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25076	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25075	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25073	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25070	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25069	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25065	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25060	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25068	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25063	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25065	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25062	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25061	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25056	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25051	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
AEH25064	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
SEQ4	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
SEQ6	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					
SEQ2	TQTMRDVTNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRKFOQQQGILSOGSCPPTNSIYV					

***** ; ***** ; ***** ; ***** ; *****

“POLIPEPTÍDEO, FITASE, VARIANTE DE UM POLIPEPTÍDEO, POLINUCLEOTÍDEO, CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLEICO, CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE, MÉTODO PARA PRODUZIR O POLIPEPTÍDEO, E, USO DA FITASE OU DE UMA COMPOSIÇÃO”

5 REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

Este pedido contém uma Listagem de Sequências na forma legível por computador. A forma legível por computador é aqui incorporada como referência.

REFERÊNCIA AOS DEPÓSITOS DE MATERIAL BIOLÓGICO

10 Este pedido contém uma referência aos depósitos de material biológico que têm sido feitos na DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) sob o Tratado de Budapeste e números de acesso designados DSM 18930, DSM 18931, e DSM 18932, cujos depósitos microbianos são aqui incorporados como referências.

15 Campo da invenção

A presente invenção refere-se aos polipeptídeos isolados tendo atividade de fitase e aos polinucleotídeos isolados codificadores dos polipeptídeos. A invenção também se refere aos construtos de ácido nucleico, aos vetores, e às células hospedeiras compreendendo os polinucleotídeos bem como aos métodos para produzir e usar os polipeptídeos.

DESCRIÇÃO DA técnica RELACIONADA

WO 2006/043178 revela uma fitase de *Buttiauxella* P1-29

(depositada como NCIMB 41248) tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:3 em WO 2006/043178, bem como certas suas variantes. A sequência de uma fitase de tipo selvagem de *Buttiauxella* e numerosas suas variantes têm sido submetidas ao banco de dados GENESEQP com os seguintes 5 números de acesso: AEH25051, AEH25056, AEH25057, AEH25058, AEH25059, AEH25060, AEH25061, AEH25062, AEH25063, AEH25064, AEH25065, AEH25066, AEH25067, AEH25068, AEH25069, AEH25070, AEH25071, AEH25072, AEH25073, AEH25074, AEH25075, e AEH25076. Todas estas fitases têm uma percentagem de identidade com qualquer uma 10 das SEQ ID NOs:2, 4 e 6 de acima de 70%, contudo não compreendem pelo menos um de 119N, 120L, e/ou 121E, como definidos acima.

A sequência de uma fitase de *Obesumbacterium proteus* tem sido submetida ao banco de dados UNIPROT com número de acesso Q6U677. Esta fitase, que também é descrita por Zinin et al. em FEMS 15 Microbiology Letters, vol. 236, pp. 283-290, 2004, tem uma percentagem de identidade com SEQ ID NOs:2, 4 e 6 de acima de 70%, contudo nem esta fitase compreende pelo menos um de 119N, 120L, e/ou 121E, como definidos acima.

Um objetivo da presente invenção é fornecer polipeptídeos 20 melhorados tendo atividade de fitase e polinucleotídeos codificadores dos polipeptídeos. As fitases da invenção têm uma atividade específica melhorada, uma capacidade melhorada tal como estabilidade melhorada de temperatura e/ou pH, um perfil de atividade em pH melhorado, um perfil de atividade em temperatura melhorado, um perfil de substrato melhorado, um 25 desempenho melhorado em ração animal in vitro, e/ou um desempenho melhorado em ração animal in vivo.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em um primeiro aspecto, a presente invenção refere-se a um polipeptídeo tendo atividade de fitase e tendo uma sequência de aminoácido

que a) tem pelo menos 70% de identidade com aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e/ou aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6 quando alinhada com a respectiva sequência de aminoácidos usando o programa de Needle com a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade aberta de lacuna de 10,0, e uma penalidade de extensão de lacuna de 0,5; e b) comprehende pelo menos um dos seguintes aminoácidos na posição indicada: 119N, 120L, e/ou 121E, quando alinhada como descrito em a) com aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2 e usando uma numeração de resíduo de aminoácido correspondendo aos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2.

Em uma modalidade particular, o polipeptídeo comprehende pelo menos um dos seguintes aminoácidos na posição indicada: 109Q, 111G, 119N, 120L, e/ou 121E.

Em outra modalidade particular, o polipeptídeo a) tem pelo menos 78% de identidade, tal como, pelo menos 80% de identidade, pelo menos 85% de identidade, pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, pelo menos 96% de identidade, pelo menos 97% de identidade, pelo menos 98% de identidade, pelo menos 99% de identidade com aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e/ou aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6; e b) comprehende pelo menos um dos seguintes aminoácidos na posição indicada: 109Q, 111G, 119N, 120L, 121E, e/ou 193Q.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídeo tendo atividade de fitase e tendo uma sequência de aminoácido que a) tem pelo menos 78% de identidade, tal como, pelo menos 80% de identidade, pelo menos 85% de identidade, pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, pelo menos 96% de identidade, pelo menos 97% de identidade, pelo menos 98% de identidade, pelo menos 99% de identidade com aminoácidos 1413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4,

e/ou aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6; e b) compreende pelo menos um dos seguintes aminoácidos na posição indicada: 1S, 10I, 38S, 66E, 71K, 81A, 109Q, 111G, 119N, 120L, 121E, 141R, 142L, 152M, 155E, 193Q, 214V, 239K, 245D, 248E, 255A,T, 268A,T, 277T, 283D,E, 285K, 287D, 288A,V, 5 293G, 296S, 303L, 314A, 337I, 345A, 350I, 364A, 371K, 372E, 396P, 399K, 406E, e/ou 413P.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídeo tendo atividade de fitase, selecionado do grupo consistindo de: (i) um polipeptídeo compreendendo uma parte madura de SEQ ID NO:2 (tal como a 10 sequência de aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2); (ii) uma variante de (i) compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições: K26E, N37Y, A89T, D92E, T134I,V, H160R, S164F, T171I, T176K, A178P, S188N, D190E, A192G, K207E,T, A2095, D211C, A235V, E248L, Q256H,Y, A261E, N270K, D283N, A288E, 1303F, e/ou N318D; e (iii) uma variante de 15 (i) ou (ii) compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições: N1S, V9I, T38S, E66Q, Q71K, T81A, R141 Q, L142V, T152M, E155D, V214I, K239N, D245E, E248S, A255T, R268A,T, A277T, D283E, N285K, T287D, A288V, D293G, P296S, 1303L, S314A, 1337V, A345S, V350I, A364S, K371 N, E372Q, P396S, K399T, E406V, e/ou Q413P.

20 Em outro aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídeo tendo atividade de fitase, selecionado do grupo consistindo de: (i) um polipeptídeo compreendendo uma parte madura de SEQ ID NO:4 (tal como a sequência de aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4); (ii) uma variante de (i) compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições: K26E, N37Y, A89T, D92E, T134I,V, H160R, 5164F, T171I, T176K, A178P, 5188N, D190E, A192G, K207E,T, A2095, D211C, A235V, 5248L, Q256H,Y, A261E, N270K, E283N, V288E, 1303F, e/ou N318D; e (iii) uma variante de 25 (i) ou (ii) compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições: 51 N, 19V, S38T, Q66E, K71 Q, T81A, Q141R, V142L, M152T, E155D, 1214V,

N239K, E245D, S248E, T255A, A268R,T, T277A, E283D, K285N, D287T, V288A, D293G, 5296P, 1303L, A3145, V3371, 5345A, 1350V, A3645, N371K, E372Q, 5396P, T399K, V406E, e/ou P413Q.

Ainda outro aspecto da invenção refere-se a um polipeptídeo 5 tendo atividade de fitase, selecionado do grupo consistindo de: (i) um polipeptídeo compreendendo uma parte madura de SEQ ID NO:6 (tal como a sequência de aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6); (ii) uma variante de (i) compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições: K26E, N37Y, A89T, D92E, T134I,V, H160R, 5164F, T171I, T176K, A178P, 5188N, 10 D190E, A192G, K207E,T, A2095, D211C, A235V, 5248L, Q256H,Y, A261E, N270K, E283N, V288E, L303F, e/ou N318D; e (iii) uma variante de 15 (i) ou (ii) compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições: N1S, V91, T38S, E66Q, Q71K, A81 T, Q141R, V142L, T152M, D155E, 1214V, N239K, E245D, S248E, A255T, T268A,R, T277A, E283D, K285N, D287T, V288A, G293D, P296S, L303I, A3145, V3371, 5345A, V3501, 5364A, N371K, Q372E, 5396P, T399K, V406E, e/ou Q413P.

Outro aspecto da invenção é direcionado a uma fitase que tem 20 uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 80% de identidade, tal como, pelo menos 85% de identidade, pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, pelo menos 96% de identidade, pelo menos 97% de identidade, pelo menos 98% de identidade, pelo menos 99% de identidade, com aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, ou aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6.

Em outro aspecto, a presente invenção é direcionada a uma 25 variante de fitase que tem uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 70% de identidade, pelo menos 75% de identidade, pelo menos 80% de identidade, tal como, pelo menos 85% de identidade, pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, pelo menos 96% de identidade, pelo menos 97% de identidade, pelo menos 98% de identidade, pelo menos

99% de identidade com um polipeptídeo compreendendo uma parte madura (tal como a sequência de aminoácidos 34-446) de qualquer uma das seguintes sequências de GENESEQP: AEH25057, AEH25059, AEH25058, AEH25067, AEH25071, AEH25072, AEH25074, AEH25076, AEH25073, AEH25070, 5 AEH25069, AEH25066, AEH25060, AEH25068, AEH25063, AEH25065, AEH25062, AEH25061, AEH25056, AEH25051, ou AEH25064; que variante tem atividade de fitase e compreende pelo menos uma das seguintes substituições: N1S, V10I, T38S, Q66E, Q71K, T81A, E109Q, H111G, D119N, 1120L, K121E, Q141R, V142L, T152M, D155E, L193Q, 1214V, 10 N239K, E245D, S248E, V255A,T, R268A,T, A277T, N283D,E, N285K, T287D, E288A,V, D293G, P296S, 1303L, A314S, V337I, S345A, V350I, S364A, N371K, Q372E, S396P, T399K, V406E, e/ou Q413P.

Em uma modalidade particular, a invenção refere-se a uma variante de um polipeptídeo compreendendo uma parte madura (tal como a sequência de aminoácidos 34-446) de GENESEQP:AEH25075, que variante tem atividade de fitase e compreende pelo menos uma das seguintes substituições: N1S, V10I, T38S, Q66E, Q71K, T81A, E109Q, H111G, D119N, 1120L, K121E, Q141R, V142L, T152M, D155E, L193Q, 1214V, N239K, E245D, S248E, V255A,T, R268A,T, A277T, N283D,E, N285K, T287D, E288A,V, D293G, P296S, F303L, A314S, V337I, S345A, V350I, 20 S364A, N371K, Q372E, S396P, T399K, V406E, e/ou Q413P.

Em cada um destes aspectos, para calcular a identidade e determinar as posições de resíduo de aminoácido, é produzido um alinhamento como descrito sob o primeiro aspecto acima.

25 A invenção também se refere-se aos polinucleotídeos codificadores destes polipeptídeos, bem como aos construtos de ácido nucleico, vetores de expressão recombinantes, e células hospedeiras recombinantes compreendendo os polinucleotídeos, e aos métodos para produzir e usar estes polipeptídeos.

Outro aspecto da presente invenção refere-se às composições de ração animal compreendendo uma fitase da presente invenção. A presente invenção também fornece métodos para melhorar o valor nutricional de uma ração animal usando uma fitase da presente invenção.

5 Outro aspecto da presente invenção refere-se aos métodos para tratar proteínas, incluindo proteínas vegetais, com uma fitase da presente invenção.

10 Ainda outro aspecto da invenção presente invenção refere-se aos métodos para produzir um produto de fermentação, tal como, e.g., etanol, cerveja, vinho, sendo que a fermentação é realizada na presença de uma fitase da presente invenção.

DESCRIÇÃO BREVE DAS FIGURAS

15 Figura 1 mostra um alinhamento múltiplo das partes maduras esperadas de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:6 da invenção junto com as sequências com os seguintes números de acesso de GENESEQP: AEH25051, AEH25056, AEH25057, AEH25058, AEH25059, AEH25060, AEH25061, AEH25062, AEH25063, AEH25064, AEH25065, AEH25066, AEH25067, AEH25068, AEH25069, AEH25070, AEH25071, AEH25072, AEH25073, AEH25074, AEH25075, e AEH25076. O alinhamento foi feito usando o método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) usando o programa de computador LASERGENETM MEGALIGNTM (DNASTAR, Inc., Madison, WI) com uma tabela de identidade e os seguintes parâmetros de alinhamento múltiplo: penalidade de lacuna de 10 e penalidade de comprimento de lacuna de 10. Parâmetros de alinhamento pareado são 20 Ktuplo=1, penalidade lacuna=3, janelas=5, e diagonais=5.

25

Figura 2 mostra em alinhamento de UNIPROT número de acesso Q6U677 com aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2. O alinhamento foi feito usando o programa de Needle com a matriz BLOSUM62, uma penalidade de iniciação de lacuna de 10,0 e uma penalidade de extensão de

lacuna de 0,5.

DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Considerações estruturais

As estruturas de três fitases da invenção (parte madura de SEQ 5 ID NOS:2, 4 e 6) foram construídas por modelagem de homologia, usando como um modelo a estrutura de fitase AppA de *E. coli* (Banco e Dados de Proteína id.: 1DKN; Lim et al., *Nat. Struct. Biol.* (2000), vol. 2, pp. 108-113).

Posições 119 a 121 estão faceando a fenda do sítio ativo e portanto é esperado que os aminoácidos específicos nestas posições tenham 10 um efeito sobre atividade específica. Para aumentar a atividade específica, 119N é estimado como a melhor escolha, seguido por 121E, e finalmente 120L.

Posições 109 e 111 estão próximas de um dissulfeto em uma 15 região que está um pouco estressada, assim é esperado que os aminoácidos específicos nestas posições tenham um efeito sobre estabilidade, sobre termoestabilidade em particular. 111G pode ser melhor do que 109Q.

Posição 193 é outra região que pode influenciar a estabilidade da enzima. 193Q pode proporcionar uma estabilidade boa.

Variantes de fitase correspondentes, e outras variantes de fitase 20 (e.g., uma variante compreendendo uma substituição, deleção, e/ou inserção conservativa de um ou mais aminoácidos de aminoácidos), podem ser preparadas por métodos bem conhecidos na técnica e testadas como descrito na parte experimental.

POLIPEPTÍDEOS DE FITASE, PERCENTAGEM DE IDENTIDADE

No presente contexto uma fitase é um polipeptídeo tendo 25 atividade de fitase, i.e. uma enzima que catalisa a hidrólise de fitato (mio-inositol hexaquis-fosfato) para seus (1) mio-inositol e/ou (2) mono-, di-, tri-, tetra- e/ou penta-fosfatos e (3) fosfato inorgânico.

No presente contexto o termo um substrato de fitase inclui,

i.a., ácido fítico e qualquer fitato (sal de ácido fítico), bem como os fosfatos listados sob (2) acima.

O sítio ENZYME na internet (www.expasy.ch/enzyme/) é um repositório de informação relativa à nomenclatura de enzimas. É primariamente baseado nas recomendações do "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology" (IUB-MB) e descreve cada tipo de enzima caracterizada para o qual um número EC ("Enzyme Commission") tem sido fornecido (Bairoch A. "The ENZYME database", 2000, Nucleic Acids Res 28:304-305). Veja também o manual "Enzyme Nomenclature" de NC-IUBMB, 1992).

De acordo com o sítio ENZYME, são conhecidos três tipos diferentes de fitases: uma denominada 3-fitase (nome alternativo 1-fitase; uma mio-inositol hexafosfato 3-fosfo-hidrolase, EC 3.1.3.8), uma denominada 4-fitase (nome alternativo 6-fitase, nome baseado no sistema de numeração-1L e não de numeração-1D, EC 3.1.3.26), e uma denominada 5-fitase (EC 3.1.3.72). Para os propósitos da presente invenção, todos os três tipos estão incluídos na definição de fitase.

Em uma modalidade particular, as fitases da invenção pertencendo à família de histidina-fosfatases ácidas, que inclui a fosfatase ácida de pH 2,5 de *Escherichia coli* (gene *appA*) bem como as fitases fúngicas tais como fitases A e B de *Aspergillus awamorii* (EC: 3.1.3.8) (genes *phyA* e *phyB*). As histidina-fosfatases ácidas compartilham duas regiões de similaridade de sequência, cada uma centradas ao redor de um resíduo de histidina conservado. Estas duas histidinas parecem estar envolvidas no mecanismo catalítico de enzimas. A primeira histidina está localizada na seção N-terminal e forma um intermediário de fósforo-histidina enquanto que a segunda está localizada na seção C-terminal e possivelmente atua como uma doadora de próton.

Em uma outra modalidade particular, as fitases da invenção

têm um motivo de sítio ativo conservado, a saber R-H-G-V-R-A-P, (veja aminoácidos 18 a 24 de SEQ ID NOs:2, 4, e 6).

Para os propósitos da presente invenção a atividade de fitase é determinada na unidade de FYT, uma FYT sendo a quantidade de enzima que 5 libera 1 micro-mol de orto-fosfato inorgânico por min. sob as seguintes condições: pH 5,5; temperatura 37°C; substrato: fitato de sódio ($C_6H_6O_{24}P_6Na_{12}$) em uma concentração de 10,8 mmol/l. Atividade de fitase é preferivelmente determinada usando o ensaio de Exemplo 3 aqui. Outros de 10 ensaios de fitase adequados são os ensaios FYT e FTU descritos em Exemplo 1 de WO 00/20569. FTU é para determinar atividade de fitase em razão e pré-mistura.

Em uma modalidade particular a fitase da invenção é isolada. O termo "isolada" como aqui usado refere-se a um polipeptídeo que é pelo menos 20% pura, preferivelmente pelo menos 40% pura, mais 15 preferivelmente pelo menos 60% pura, ainda mais preferivelmente pelo menos 80% pura, muito mais preferivelmente pelo menos 90% pura, e ainda muito mais preferivelmente pelo menos 95% pura, tal como, pelo menos 96%, 97%, 98%, 99% e pureza maior, conforme determinada por SDS-PAGE. Em particular, é preferido que os polipeptídeos estão em "forma essencialmente 20 pura", i.e., que a preparação de polipeptídeo está essencialmente livre de outro material de polipeptídeo que está nativamente associado. Isto pode ser realizado, por exemplo, pela preparação do polipeptídeo por meio de métodos recombinantes bem conhecidos e/ou por métodos de purificação clássicos.

Quando usado aqui o termo "parte madura" refere-se àquela 25 parte do polipeptídeo que é secretada por uma célula que contém, como parte de seu equipamento genético, um polinucleotídeo codificador do polipeptídeo. Geralmente, a parte de polipeptídeo madura refere-se àquela parte do polipeptídeo que permanece após a parte de peptídeo de sinal N-terminal ter sido clivada uma vez tendo ela cumprido a sua função de direcionar o

polipeptídeo codificado para dentro da rota secretória da célula. Contudo, experiência mostra que algumas vezes truncamentos C-terminais menores ocorrem durante o processo de secreção. O termo parte madura como aqui usado também leva em consideração tais truncamentos C-terminais, se 5 houver. As partes de peptídeo de sinal esperadas de SEQ ID NOS:2, 4 e 6 são aminoácidos -33 a -1 de SEQ ID NO:2, -9 a -1 de SEQ ID NO:4 (esta é um peptídeo de sinal parcial), e aminoácidos -33 a -1 de SEQ ID NO:6 (veja a listagem de sequências incluída com este pedido). SEQ ID NO:8, que é codificada pela SEQ ID NO:7, também é um peptídeo de sinal. Visto que não 10 estamos presentemente cientes de quaisquer truncamentos C-terminais tendo ocorrido durante secreção, as partes maduras esperadas de SEQ ID NOS:2, 4, e 6 são seus aminoácidos 1-413.

Em vários aspectos da presente invenção, a relação entre as 15 sequências de aminoácidos é descrita pelo parâmetro "identidade". Para propósitos da presente invenção, o alinhamento de duas sequências de aminoácidos é determinado pelo uso do programa de Needle do pacote EMBOSS (<http://emboss.org>), preferivelmente em version 2.8.0. O programa de Needle implementa o algoritmo de alinhamento global descrito em Needleman, S. B. e Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453. A matriz 20 de substituição usada é BLOSUM62, a penalidade de abertura (iniciação) de lacuna é 10,0, e a penalidade de extensão de lacuna é 0,5.

O grau de identidade entre uma sequência de aminoácido da 25 presente invenção ("sequência da invenção") e uma sequência de aminoácido mencionada nas reivindicações (e.g. aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2) é calculado como o número de combinações exatas em um alinhamento das duas sequências, dividido pelo comprimento da "sequência da invenção", ou o comprimento de aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, seja qual for o mais curto. O resultado é expressado em identidade percentual.

Uma combinação exata ocorre quando a "sequência da

invenção" e SEQ ID NO:2 têm resíduos de aminoácido idênticos nas mesmas posições da sobreposição (no exemplo de alinhamento abaixo isto é representado por "|"). O comprimento de uma sequência é o número de resíduos de aminoácido na sequência (e.g. o comprimento de aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2 é 413).

No exemplo de alinhamento puramente hipotético abaixo, a sobreposição é a sequência de aminoácidos "HTWGER-NL" de Sequência 1; ou a sequência de aminoácidos "HGWGEDANL" de Sequência 2. No exemplo uma lacuna é indicada por um "-".

10 Exemplo de alinhamento hipotético:

Sequência 1:	ACMSHTWGER-NL
Sequência 2:	HGWGEDANLAMNPS

15 Em uma modalidade particular, a percentagem de identidade de uma sequência de aminoácido de um polipeptídeo com, ou em relação aos, e.g., aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2 é determinada por i) alinhamento das duas sequências de aminoácidos usando o programa de Needle, com a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade aberta de lacuna de 10,0, e uma penalidade de extensão de lacuna de 0,5; ii) contagem do número de combinações exatas no alinhamento; iii) divisão do número de combinações exatas pelo comprimento da mais curta das duas sequências de aminoácidos, e iv) conversão do resultado da divisão de iii) em percentagem.

20 No exemplo hipotético acima, o número de combinações exatas é 6, o comprimento da mais curta das duas sequências de aminoácidos é 12; conformemente a percentagem de identidade é 50%.

25 Outro exemplo de um alinhamento é mostrado em Fig. 2, onde a fitase de *Obesumbacterium proteus* (UNIPROT:Q6U677) é alinhada com aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2. Deste alinhamento parece que a percentagem de identidade de UNIPROT:Q6U677 com os aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2 é 76,3% (315 combinações exatas, o comprimento da

sequência mais curta é 413).

Em modalidades particulares da fitase da invenção (i.e. de acordo com qualquer um dos vários aspectos da mesma), o grau de identidade com qualquer um dos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6 é pelo menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou pelo menos 99%. Em ainda outras modalidades particulares, o grau de identidade é pelo menos 90,0%, 90,2%, 90,4%, 90,6%, 90,8%, 91,0%, 91,2%, 91,4%, 91,6%, 91,8%, 92,0%, 92,2%, 92,4%, 92,6%, 92,8%, 93,0%, 93,2%, 93,4%, 93,6%, 93,8%, 94,0%, 94,2%, 94,4%, 94,6%, 94,8%, 95,0%, 95,2%, 95,4%, 95,6%, 95,8%, 96,0%, 96,2%, 96,4%, 96,6%, 96,8%, 97,0%, 97,2%, 97,4%, 97,6%, 97,8%, 98,0%, 98,2%, 98,4%, 98,6%, 98,8%, 99,0%, 99,2%, 99,4%, 99,6%, ou pelo menos 99,8%.

Em ainda outras modalidades particulares, a fitase da invenção tem (ou tem uma sequência de aminoácido que difere em) não mais do que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou não mais do que 10 alterações em comparação com qualquer um dos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6; não mais do que 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou não mais do que 20 alterações em comparação com qualquer um dos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6; não mais do que 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou não mais do que 30 alterações em comparação com qualquer um dos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6; não mais do que 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, ou não mais do que 40 alterações em comparação com qualquer um dos aminoácidos 1413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6; não mais do que 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, ou não mais

do que 50 alterações em comparação com qualquer um dos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6; não mais do que 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, ou não mais do que 60 alterações em comparação com qualquer um dos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6; não mais do que 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, ou não mais do que 70 alterações em comparação com qualquer um dos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6; não mais do que 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, ou não mais do que 80 alterações em comparação com qualquer um dos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6; não mais do que 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, ou não mais do que 90 alterações em comparação com qualquer um dos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6; não mais do que 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ou não mais do que 100 alterações em comparação com qualquer um dos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6; não mais do que 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, ou não mais do que 110 alterações em comparação com qualquer um dos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6; não mais do que 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, ou não mais do que 120 alterações em comparação com qualquer um dos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6; ou não mais do que 121, 122, 123, ou 124 alterações em comparação com qualquer um dos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6.

Em modalidades alternativas da fitase da invenção, o grau de

identidade com qualquer um dos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6 é pelo menos 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, ou pelo menos 69%.

5 NUMERAÇÃO DE POSIÇÃO

A nomenclatura aqui usada (i.e., de acordo com qualquer um dos vários aspectos da invenção) para definir posições de aminoácido é baseada na sequência de aminoácidos da fitase derivada de *Buttiauxella gaviniae* DSM 18930, a saber a sua sequência madura esperada que é de 10 aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2. Conformemente, no presente contexto, a base para numeração de posições é SEQ ID NO:2 iniciando com N1 e terminando com Q413. Esta numeração de posição é mostrada como a primeira linha no alinhamento de Fig. 1 e esta numeração é também mostrada no alinhamento de Fig. 2 (a linha superior do alinhamento).

15 ALTERAÇÕES, TAIS COMO SUBSTITUIÇÕES, DELEÇÕES, INSERÇÕES

Uma fitase da invenção (i.e., de acordo com qualquer um dos vários aspectos da invenção), pode ser uma de tipo selvagem ou um variante, pode compreender vários tipos de alterações relativas a um modelo (i.e. uma 20 sequência de aminoácidos comparativa ou de referência tal como aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2): Um aminoácido pode ser substituído por outro aminoácido; um aminoácido pode ser deletado; um aminoácido pode ser inserido; bem como qualquer combinação de qualquer número de tais alterações. No presente contexto o termo "inserção" é intencionado para 25 também cobrir extensões N-e/ou C-terminais, e o termo "deleção" é intencionado para também cobrir truncamentos N- e/ou C-terminais.

A nomenclatura geral aqui usada é a seguinte: XDcY, onde "X" e "Y" independentemente designa um código de aminoácido de uma letra, ou um "k", "D" designa um número, e "c" designa uma contagem

alfabética (a, b, c, e assim por diante), que está apenas presente em inserções. Referência pode ser feita à Tabela 1 abaixo que descreve exemplos puramente hipotéticos de aplicação desta nomenclatura a vários tipos de alterações.

Tabela 1

Tipo	Descrição	Exemplo
Substituição	X = Aminoácido em modelo D = Posição em modelo c = vazio Y = Aminoácido em variante	G80A 80 AALNNNSIGVLGVAPS AELYAVKVLGAS GSG : AALNNNSIAVLGVAPS AELYAVKVLGAS GSG
Inserção	X = “*” D = Posição em modelo antes da inserção c = “a” para primeira inserção nesta posição, “b” para a seguinte, etc.	*80aT *80bY *85aS 80 85 AALNN SIG .. VLGVA. PSAELYAVKVLGAS G AALNN SIG TYVLGVAS P S AELYAVKVLGAS G
Deleção	X = Aminoácido em modelo D = Posição em modelo c = vazio Y = “*”	V81* 80 AALNN SIGVLGVAPS AELYAVKVLGAS GSG AALNN SIG . LGVAPS AELYAVKVLGAS GSG
Extensão N-terminal	Inserções na posição “0”.	*0aA *0bT *0cG 1 ...AQ SVPWG ISRVQ ATGAQ SVPWG ISRVQ
Extensão C-terminal	Inserções após o aminoácido N-terminal	*275aS *275bT 270 275 ATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR .. ATSLGSTNLYGSGLVNAEAATRST

NO:2.

Várias alterações na mesma sequência são separadas por "/" (barra diagonal), e.g. a designação "1*/2*/3*" significa que os aminoácidos em número de posição 1, 2, e 3 estão todos deletados, e a designação "104A/105F" significa que o aminoácido no número de posição 104 está substituído por A, e o aminoácido no número de posição 105 está substituído por F.

Alterações alternativas são separadas por "," (vírgula), e.g., a designação "255A,T" significa que o aminoácido na posição 255 é substituído por A ou T.

As vírgulas aqui usadas em várias outras numerações de possibilidades significam o que costumeiramente fazem gramaticalmente, a saber freqüentemente e/ou. E.g., a primeira vírgula na listagem "255A,T, 406E, e/ou 413P" denota uma alternativa (A ou T), enquanto que as duas vírgulas seguintes devem ser interpretadas como opções e/ou: 255A ou 255T, e/ou 406E, e/ou 413P.

No presente contexto, "pelo menos um" (e.g. aminoácidos na posição indicada, ou substituição) significa um(a) ou mais, e.g. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 aminoácidos (ou substituições); ou 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 25, 28, ou 30 aminoácidos (ou substituições); e assim por diante, até um número máximo de alterações de 125, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, ou de 200.

Uma substituição ou extensão sem qualquer indicação de o que substituir o estender com refere-se à inserção de qualquer aminoácido natural, ou não-natural, exceto aquele que ocupa esta posição no modelo.

IDENTIFICAÇÃO DE NÚMEROS DE POSIÇÃO CORRESPONDENTES

Como explicado acima, a fitase madura de *Buttiauxella gaviniae* DSM 18930 (SEQ ID NO:2) é aqui usada como o modelo para a numeração de posição e, deste modo, também a nomenclatura.

Para outra fitase, seja ela uma de tipo selvagem ou uma variante, a posição correspondendo à posição D em SEQ ID NO:2 é verificada pelo alinhamento de duas sequências como especificadas acima na seção intitulada "polipeptídeos de fitase, percentagem de identidade". Do 5 alinhamento, a posição na sequência da invenção correspondendo à posição D de SEQ ID NO:2 pode ser clara e inequivocamente identificada (as duas posições uma sobre a outra no alinhamento).

Aqui alguns exemplos puramente hipotéticos são derivados de Tabela 1 acima que na terceira coluna inclui numerosos alinhamentos de duas 10 sequências:

Considerar a terceira célula na primeira linha de Tabela 1: a sequência superior é o modelo; a inferior a variante. Número de posição 80 refere-se ao resíduo de aminoácido G no modelo. Aminoácido A ocupa a posição correspondente na variante. Conformemente, esta substituição é 15 designada G80A.

Considerar agora a terceira célula na segunda linha de Tabela 1: a sequência superior é de novo o modelo e a inferior a variante. Número de posição 80 de novo se refere ao resíduo de aminoácido G no modelo. A variante tem duas inserções, a saber TY, após G80 e antes V81 no modelo. 20 Enquanto que claro que T e Y teriam seu próprio número de posição "real" na sequência de aminoácidos variante, para os presentes propósitos sempre nos referimos aos números de posição no modelo, e conformemente o T e o Y são ditos em estarem no número de posição 80a e 80b, respectivamente.

Finalmente, considerar a terceira célula na última linha de 25 Tabela 1: número de posição 275 refere-se ao último aminoácido do modelo. Uma extensão C-terminal de ST é dita em estar no número de posição 275a e 275b, respectivamente, embora, de novo, claro que têm seu próprio número de posição "real" na sequência de aminoácidos variante.

Um exemplo real de tal alinhamento é mostrado em Fig. 2,

onde a fitase de *Obesumbacterium proteus* (UNIPROT:Q6U677) está alinhada com aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2. Deste alinhamento é inferido que, i.a., aminoácidos 119N, 120L, e 121E de SEQ ID NO:2 correspondem a 119D, 120I e 120K de UNIPROT:Q6U677, respectivamente.

5 VÁRIAS MODALIDADES

Um polipeptídeo de acordo com o segundo aspecto da invenção tem uma sequência de aminoácido que a) tem pelo menos 78% de identidade com aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e/ou aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6; e b) compreende pelo menos um dos seguintes aminoácidos na posição indicada: 1S, 10I, 38S, 66E, 71K, 81A, 109Q, 111G, 119N, 120L, 121E, 141R, 142L, 152M, 155E, 193Q, 214V, 239K, 245D, 248E, 255A,T, 268A,T, 277T, 283D,E, 285K, 287D, 288A,V, 293G, 296S, 303L, 314A, 337I, 345A, 350I, 364A, 371K, 372E, 396P, 399K, 406E, e/ou 413P.

15 Cada um dos aminoácidos nas posições indicadas sob b) acima fazem uma diferença na fitase de tipo selvagem de *Buttiauxella* NCIMB 41248 e suas variantes com os seguintes números de acesso de GENESEQP: AEH25051, AEH25056, AEH25057, AEH25058, AEH25059, AEH25060, AEH25061, AEH25062, AEH25063, AEH25064, AEH25065, AEH25066, 20 AEH25067, AEH25068, AEH25069, AEH25070, AEH25071, AEH25072, AEH25073, AEH25074, AEH25075, e AEH25076.

25 Em suas modalidades particulares, a sequência de aminoácidos compreende a) pelo menos um de 1S, 10I, 38S, 71K, 109Q, 111G, 119N, 120L, 121E, 152M, 155E, 193Q, 255T, 268A, 277T, 283E, 285K, 287D, 288V, 296S, 364A, 350I, 372E, e/ou 413P (como representado por SEQ ID NO:4); b) pelo menos um de 66E, 81A, 109Q, 111G, 119N, 120L, 121E, 193Q, 255A, 268T, 277T, 283E, 285K, 287D, 288V, 293G, e/ou 303L (como representado por SEQ ID NO:6); e c) pelo menos um de 66E, 109Q, 111G, 119N, 120L, 121E, 141R, 142L, 155E, 193Q, 214V, 239K, 245D, 248E,

255A, 283D, 288A, 314S, 337I, 345A, 364A, 371K, 372E, 396P, 399K, e/ou 406E (como representado por SEQ ID NO:2).

Em outra modalidade particular o polipeptídeo da invenção tem sido alterado inspirado pelas fitases mutante e de tipo selvagem de 5 *Buttiauxella* reveladas em WO 2006/043178, a saber ele tem uma sequência de aminoácido que compreende pelo menos um dos seguintes aminoácidos na posição indicada: 26E, 37Y, 89T, 92E, 134I,V, 160R, 164F, 171I, 176K, 178P, 188N, 190E, 192G, 207E,T, 209S, 211 C, 235V, 248L, 256H,Y, 261E, 270K, 303F, e/ou 318D.

10 Por exemplo, a parte madura de SEQ ID NO:2 é mutada para compreender pelo menos uma das seguintes substituições: K26E, N37Y, A89T, D92E, T134I,V, H160R, S164F, T171I, T176K, A178P, S188N, D190E, A192G, K207E,T, A209S, D211C, A235V, E248L, Q256H,Y, A261E, N270K, D283N, A288E, 1303F, e/ou N318D. Outras substituições 15 preferidas na parte madura de SEQ ID NO:2 são inspiradas por SEQ ID NOs:4 e 6: NHS, V91, T38S, E66Q, Q71K, T81A, R141Q, L142V, T152M, E155D, V214I, K239N, D245E, E248S, A255T, R268A,T, A277T, D283E, N285K, T287D, A288V, D293G, P296S, 1303L, S314A, 1337V, A345S, V350I, A364S, K371N, E372Q, P396S, K399T, E406V, e/ou Q413P.

20 Como outro exemplo, a parte madura de SEQ ID NO:4 é mutada para compreender pelo menos uma das seguintes substituições: K26E, N37Y, A89T, D92E, T134I,V, H160R, S164F, T171I, T176K, A178P, S188N, D190E, A192G, K207E,T, A209S, D211 C, A235V, S248L, Q256H,Y, A261E, N270K, E283N, V288E, 1303F, e/ou N318D. Outras substituições preferidas na parte madura de SEQ ID NO:2 são inspiradas por 25 SEQ ID NOs:2 e 6: S1N, 19V, S38T, Q66E, K71Q, T81A, Q141R, V142L, M152T, E155D, 1214V, N239K, E245D, S248E, T255A, A268R,T, T277A, E283D, K285N, D287T, V288A, D293G, S296P, 1303L, A314S, V337I, S345A, 1350V, A364S, N371K, E372Q, S396P, T399K, V406E, e/ou P413Q.

Como ainda um outro exemplo, a parte madura de SEQ ID NO:6 é mutada para compreender pelo menos uma das seguintes substituições: K26E, N37Y, A89T, D92E, T1341,V, H160R, S164F, T1711, T176K, A178P, S188N, D190E, A192G, K207E,T, A209S, D211 C, A235V, 5 S248L, Q256H,Y, A261 E, N270K, E283N, V288E, L303F, e/ou N318D. Outras substituições preferidas na parte madura de SEQ ID NO:2 são inspiradas por SEQ ID NOS:2 e 4: N1S, V91, T38S, E66Q, Q71 K, A81 T, Q141 R, V142L, T152M, D155E, 1214V, N239K, E245D, S248E, A255T, T268A,R, T277A, E283D, K285N, D287T, V288A, G293D, P296S, L3031, 10 A3145, V3371, 5345A, V3501, 5364A, N371 K, Q372E, 5396P, T399K, V406E, e/ou Q413P.

Como explicado acima, vários aspectos da presente invenção referem-se aos polipeptídeos "tendo" uma sequência de aminoácido que tem um grau especificado de identidade com aminoácidos 1413 de SEQ ID NO:2, 15 aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e/ou aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6, que têm atividade de fitase (daqui em diante "polipeptídeos homólogos"); ou com polipeptídeos "tendo" uma sequência de aminoácido que difere em um número máximo de aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6.

20 Um polipeptídeo da presente invenção preferivelmente comprehende qualquer um de aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, ou aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6; ou uma sua variante alélica; ou um seu fragmento que tem atividade de fitase.

25 Em outra modalidade preferida, um polipeptídeo da presente invenção consiste da sequência de aminoácidos de aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6; ou uma sua variante alélica; ou um seu fragmento que tem atividade de fitase.

Qualquer uma das sequências de nucleotídeos de SEQ ID NO:1, 3 e 5, ou uma sua subsequência, bem como a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2, 4, e 6, ou um seu fragmento, pode ser usada para planejar uma sonda de ácido nucleico para identificar e clonar DNA codificador de polipeptídeos tendo atividade de fitase de cepas de espécies ou gêneros diferentes de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. Em particular, tais sondas podem ser usadas para hibridização com o DNA genômico ou cDNA do gênero ou da espécie de interesse, seguindo procedimentos de Southern blotting padrão, com o objetivo de identificar e isolar o gene correspondente no mesmo. Ambas as sondas de DNA e RNA podem ser usadas. As sondas são tipicamente marcadas para detectar o gene correspondente (por exemplo, com ^{32}P , ^{3}H , ^{35}S , biotina, ou avidina).

Uma biblioteca de DNA genômico preparada de tais outros organismos pode, portanto, ser triada para DNA que hibridiza com as sondas descritas acima e que codifica um polipeptídeo tendo atividade de fitase. DNA genômico ou outro DNA de tais outros organismos pode ser separado por eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida, ou outras técnicas de separação. DNA das bibliotecas ou o DNA separado pode ser transferido para e imobilizado sobre nitrocelulose ou outro material de barreira adequado. Com o propósito de identificar um clone ou DNA que é homólogo à SEQ ID NO:1, 3 ou 5 ou uma sua subsequência, o material de suporte é usado em um Southern blot.

Em uma modalidade preferida, a sonda de ácido nucleico compreende nucleotídeos 454-462 de SEQ ID NO:1, nucleotídeos 384-392 de SEQ ID NO:3, ou nucleotídeos 454-462 de SEQ ID NO:5 (todos correspondendo ao motivo 119N, 120L, e 121E). Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é uma sequência de polinucleotídeos que codifica os polipeptídeos de qualquer uma das SEQ ID NOs:2, 4, ou 6, ou uma sua subsequência. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é SEQ

ID NO:1, 3 ou 5.

A presente invenção também se refere às variantes compreendendo uma substituição, deleção, e/ou inserção conservativa de um ou mais aminoácidos nas sequências de aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, 5 aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, ou aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6, ou os seus polipeptídeos maduros. Preferivelmente, mudanças de aminoácido são de uma natureza menor, isto é substituições ou inserções de aminoácido conservativas que não afetam significativamente o dobramento e/ou a atividade da proteína; deleções pequenas, tipicamente de um a cerca de 10 30 aminoácidos; extensões amino- e carboxil-terminais pequenas, tal como um resíduo de metionina terminal; um peptídeo ligador pequeno de até cerca de 20-25 resíduos; ou uma extensão pequena que facilita purificação pela mudança da carga efetiva ou outra função, tal como trato de poli-histidina, um epitopo antigênico ou um domínio de ligação. Um fragmento é um exemplo 15 preferido de uma variante compreendendo uma deleção, como descrito acima, e um fragmento preferivelmente retém atividade de fitase.

Exemplos de substituições conservativas estão dentro do grupo de aminoácidos básicos s (arginina, lisina e histidina), aminoácidos (ácido glutâmico e ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina e asparagina), 20 aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina e valina), aminoácidos aromáticos (fenil-alanina, triptofano e tirosina), e aminoácidos pequenos (glicina, alanina, serina, treonina e metionina). Substituições de aminoácido que geralmente não alteram a atividade específica são conhecidas na técnica e são descritas, por exemplo, por H. Neurath e R.L. Hill, 1979, em, "The Proteins", Academic Press, Nova Iorque. As trocas muito mais comumente ocorrentes são Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, 25 Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, e Asp/Gly.

Em adição aos 20 aminoácidos padrão, aminoácidos não-

padrão (tais como 4-hidróxi-prolina, 6-N-metil-lisina, ácido 2-amino-isobutírico, isovalina, e alfa-metil-serina) podem substituir resíduos de aminoácido de um polipeptídeo de tipo selvagem. Um número limitado de aminoácidos não-conservativos, aminoácidos que não são codificados pelo código genético, e aminoácidos não-naturais pode substituir os resíduos de aminoácido. "Aminoácidos não-naturais" têm sido modificados após síntese de proteína, e/ou têm uma estrutura química em sua(s) cadeia(s) lateral(ais) diferente daquela dos aminoácidos padrão. Aminoácidos não-naturais podem ser quimicamente sintetizados, e preferivelmente, estão comercialmente disponíveis, e incluem ácido pipecólico, ácido tiazolidina-carboxílico, desidroprolina, 3- e 4-metil-prolina, e 3,3-dimetil-prolina.

Aminoácidos essenciais no polipeptídeo parenteral podem ser identificados de acordo com procedimentos conhecidos na técnica, tais como mutagênese sítio-direcionada e mutagênese de varredura de alanina (Cunningham e Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). Na última técnica, mutações de alanina única são introduzidas em cada resíduo na molécula, e as moléculas mutantes resultantes são testadas para atividade biológica (i.e., atividade de fitase) para identificar resíduos de aminoácido que são críticos para a atividade da molécula. Veja também, Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. O sítio ativo da enzima ou outra interação biológica também pode ser determinado(a) por análise física de estrutura, conforme determinada por tais técnicas como ressonância nuclear magnética, cristalografia, difração eletrônica, ou marcação por fotoafinidade, conjuntamente com mutação de aminoácidos de sítio de contato putativo. Veja, por exemplo, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Lett.* 309:59-64. As identidades de aminoácidos essenciais também pode ser inferida da análise de identidades com polipeptídeos que estão relacionados com um polipeptídeo de acordo com a invenção.

Substituições de aminoácido único ou de aminoácidos múltiplos podem ser feitas e testadas usando métodos conhecidos de mutagênese, recombinação, e/ou rearranjo, seguidos por um procedimento de triagem relevante, tais como aqueles revelados por Reidhaar-Olson e Sauer, 5 1988, *Science* 241: 5357; Bowie e Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; ou WO 95/22625. Outros métodos que podem ser usados incluem error-prone PCR, exibição de fago (e.g., Lowman et al., 1991, *Biochem.* 30:10832-10837; Patente U.S. de No. 5.223.409; WO 92/06204), e mutagênese região-direcionada (Derbyshire et al., 1986, *Gene* 10 46:145; Ner et al., 1988, *DNA* 7:127).

Métodos de mutagênese/rearranjo podem ser combinados com métodos de triagem automáticos, de produtividade alta para detectar atividade de polipeptídeos mutagenizados, clonados expressados por células hospedeiras. Moléculas de DNA mutagenizadas que codificam polipeptídeos 15 ativos podem ser recuperadas das células hospedeiras e rapidamente sequenciadas usando métodos padrão na técnica. Estes métodos permitem a determinação rápida da importância de resíduos de aminoácido individuais em um polipeptídeo de interesse, e podem ser aplicados aos polipeptídeos de estrutura desconhecida.

20 Um polipeptídeo da presente invenção pode ser obtido de microorganismos de qualquer gênero. Para os propósitos da presente invenção, o termo "obtido de" como aqui usado em conexão com uma dada fonte deve significar que o polipeptídeo codificado por uma sequência de nucleotídeos é produzido pela fonte ou por uma cepa na qual a sequência de 25 nucleotídeos da fonte tem sido inserida. Em um aspecto preferido, o polipeptídeo obtido de uma dada fonte é secretado extracelularmente.

Um polipeptídeo da presente invenção pode ser um polipeptídeo bacteriano. Em modalidades particulares, o polipeptídeo é obtêniável de *Proteobacteria*; *Gammaproteobacteria*; *Enterobacteriales*; família

de Enterobacteriaceae; preferivelmente do gênero de *Buttiauxella*, e.g. selecionada dentre as espécies de *Buttiauxella agrestis*, *Buttiauxella brennerae*, *Buttiauxella ferragutiae*, *Buttiauxella gaviniae*, *Buttiauxella izardii*, *Buttiauxella noackiae*, *Buttiauxella warmboldiae*, *Buttiauxella* sp. B22, 5 *Buttiauxella* sp. BTN01, *Buttiauxella* sp. LBV 449, *Buttiauxella* sp. P5, *Buttiauxella* sp. PNBS, *Buttiauxella* sp. S212, *Buttiauxella* sp. S215, *Buttiauxella* sp. S218. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>.

Em um aspecto mais preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo de *Buttiauxella gaviniae* ou *Buttiauxella agrestis*, muito mais preferivelmente um polipeptídeo de *Buttiauxella gaviniae* DSM 18930, um polipeptídeo de *Buttiauxella agrestis* DSM 18931, ou um polipeptídeo de *Buttiauxella agrestis* DSM 18932.

Será entendido que para as espécies anteriormente mencionadas, a invenção inclui ambos os estados perfeito e imperfeito, e 15 outros equivalentes taxonômicos, e.g., anamorfos, independente do nome da espécie pela qual são conhecidos. Aquelas pessoas experientes na técnica prontamente reconhecerão a identidade de equivalentes apropriados.

Cepas destas espécies são prontamente acessíveis ao público em numerosas coleções de culturas, tais como a American Type Culture 20 Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), e Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

Ademais, tais polipeptídeos podem ser identificados e obtidos 25 de outras fontes incluindo microorganismos isolados da natureza (e.g., solo, compostos, água, etc.) usando as sondas acima mencionadas. Técnicas para isolar microorganismos de habitats naturais são bem conhecidas na técnica. O polinucleotídeo pode então ser obtido por triagem similar de uma biblioteca de DNA genômico ou cDNA de outro microorganismo. Uma vez tendo sido

detectado com a(s) sonda(s) uma sequência de polinucleotídeo codificadora de um polipeptídeo, o polinucleotídeo pode ser isolado ou clonado pela utilização de técnicas que são bem conhecidas por aquelas pessoas experientes na técnica (veja, e.g., Sambrook et al., 1989, supra).

5 Polipeptídeos da presente invenção também incluem polipeptídeos fusionados ou polipeptídeos de fusão cliváveis nos quais outro polipeptídeo está fusionado na terminação-N ou terminação-C do polipeptídeo ou seu fragmento. Um polipeptídeo fusionado é produzido pela fusão de uma sequência de nucleotídeos (ou uma sua porção) codificadora de um polipeptídeo em outra sequência de nucleotídeos (ou uma sua porção) da presente invenção. Técnicas para produzir os polipeptídeos de fusão são conhecidas na técnica, e incluem ligação das sequências codificadoras de polipeptídeos de modo quantidade eficaz fiquem em matriz e que a expressão do polipeptídeo fusionado fique sob controle do(s) mesmo(s) promotor(es) e terminador.

10

15

PROPRIEDADES EMENDADAS

Em uma modalidade particular de qualquer aspecto da invenção a fitase tem propriedades emendadas, preferivelmente melhorada. Exemplos de propriedades emendadas, preferivelmente melhoradas são PI, 20 estabilidade em temperatura e/ou pH, perfil de atividade em pH, perfil de atividade em temperatura, perfil de substrato, e desempenho em ração animal in vitro ou in vivo.

25 Os termos "emendado" e "melhorado" implicam uma comparação com outra fitase. Exemplos de tais outras fitases de referência ou comparativas são a fitase de tipo selvagem de *Buttiauxella* NCIMB 41248 e suas variantes com os seguintes números de acesso de GENSEQP: AEH25051, AEH25056, AEH25057, AEH25058, AEH25059, AEH25060, AEH25061, AEH25062, AEH25063, AEH25064, AEH25065, AEH25066, AEH25067, AEH25068, AEH25069, AEH25070, AEH25071, AEH25072,

AEH25073, AEH25074, AEH25075, e AEH25076.

As fitases da invenção que compreendem pelo menos um dos seguintes aminoácidos na posição indicada: 119N, 120L, e/ou 121E têm uma atividade específica melhorada como mostrado na parte experimental. Em 5 modalidades particulares, a fitase da invenção compreende i) 119N; ii) 121E; iii) 120L; iv) 119N e 121E; v) 119N e 120L; vi) 121E e 120L; ou vii) 119N, 120L, e 121E. Em ainda outras modalidades particulares as fitases de i)-vii) têm uma atividade específica melhorada. Atividade específica é determinada como descrito abaixo.

10 É esperado que as fitases da invenção que compreendem pelo menos um dos seguintes aminoácidos na posição indicada: 109Q, e/ou 111G tenham uma estabilidade melhorada, em particularmente uma termoestabilidade melhorada. Em modalidades particulares, a fitase da invenção compreende i) 111G; ii) 109Q; ou iii) 111G e 109Q. Em ainda 15 outras modalidades particulares as fitases de i)-iii) têm uma estabilidade melhorada, preferivelmente uma termoestabilidade melhorada. Termoestabilidade é determinada como descrito abaixo.

Também é esperado que as fitases da invenção que compreendem 193Q tenham uma estabilidade melhorada, uma 20 termoestabilidade melhorada. Termoestabilidade é determinada como descrito abaixo.

25 Aminoácidos específicos adicionais em posições especificadas, bem como substituições de aminoácido específicas adicionais também são aqui reveladas, que caracterizam e distinguem fitases adicionais da invenção que podem ter propriedades melhoradas tais como pI, estabilidade em temperatura, estabilidade em pH, perfil de atividade em pH, perfil de atividade em temperatura, perfil de substrato, e/ou desempenho melhorado em ração animal in vitro ou in vivo.

ATIVIDADE ESPECÍFICA

Em uma modalidade particular, a fitase da invenção tem uma atividade específica melhorada relativa a uma fitase de referência. Mais em particular, a atividade específica de uma fitase da invenção é pelo menos 5 105%, relativa à atividade específica de uma fitase de referência determinada pelo mesmo procedimento. Em ainda outras modalidades particulares, a atividade relativa específica é pelo menos 110, 115, 120, 125, 130, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 350 ou ainda 400%, ainda relativa à atividade específica da fitase de referência conforme 10 determinada pelo mesmo procedimento.

Exemplos de fitases de referência são listados acima. Fitases de referência preferidas para esta modalidade são GENESEQP:AEH25072 (a variante revelada em Tabela 3 de WO 2006/043178), e GENESEQP:AEH25051 (a fitase de tipo selvagem de *Buttiauxella* P1-29 15 revelada em Exemplo 10 de WO 2006/043178).

Na alternativa, o termo atividade específica alta refere-se a uma atividade específica de pelo menos 240 FYT/mg de Proteína Enzima (EP). Em modalidades particulares, a atividade específica é pelo menos 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, ou pelo menos 650 FYT/mg EP.

20 Atividade específica é medida em amostras elevadamente purificadas (um gel de SDS-poliacrilamida deve mostrar a presença de apenas um componente). Preferivelmente, a amostra da enzima é pelo menos 95% pura, conforme determinado por SDS-PAGE. A concentração de proteína enzima pode ser determinada por análise de aminoácido, e a atividade de fitase nas unidades de FYT, determinada como descrito em Exemplo 3, i.e. sobre o substrato fitato de sódio em pH 5,5 e 37°C. Atividade específica é uma característica da fitase específica em questão, e é calculada como a atividade de fitase medida em unidades FYT por mg de proteína enzima variante fitase. Veja Exemplo 4 para mais detalhes.

PONTO ISOELÉTRICO (PI)

Em modalidades particulares, o pI para a fitase da invenção está dentro da faixa de i) 7,0-8,0; ii) 7,2-7,8; ou iii) 7,4-7,6. O pI é determinado como descrito em Exemplo 5.

5 PERFIL DE PH

Em uma modalidade particular, a fitase da invenção tem um perfil de pH emendado em comparação com uma fitase de referência. Exemplos de fitases de referência são listados acima.

10 Em modalidades particulares, a fitase da invenção tem uma atividade relativa em pH 2,0 que é pelo menos 30% da atividade em pH 4,5 (pH ótimo), preferivelmente pelo menos 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, ou pelo menos 41%.

15 Em modalidades particulares adicionais, a fitase da invenção tem uma atividade relativa em pH 6,0 que é pelo menos 10% da atividade em pH 4,5 (pH ótimo), preferivelmente pelo menos 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41 %, 42%, ou pelo menos 43%.

O perfil de pH (atividade de fitase como uma função de pH) é determinada em amostras elevadamente purificadas (um gel de SDS-poliacrilamida deve mostrar a presença de apenas um componente). 20 Preferivelmente, a amostra da enzima é pelo menos 95% pura, conforme determinado por SDS-PAGE. A atividade de fitase é determinada na faixa de pH de 2,0 a 7,5 usando um coquetel tampão (glicina 50 mM, ácido acético 50 mM e Bis-Tris (Bis-(2-hidróxi-etyl)-imino-tris(hidróxi-metil)-metano) 50mM, e sobre o substrato fitato de sódio em pH5,5 e 37°C. Um ensaio preferido é o 25 ensaio de Exemplo 3, exceto que o tampão é substituído pelo tampão indicado acima. Mais detalhes são encontrados em Exemplo 6.

ESTABILIDADE EM PH

Em uma modalidade particular, a fitase da invenção tem uma estabilidade emendada em pH em comparação com uma fitase de referência.

Exemplos de fitases de referência são listados acima.

Em modalidades particulares, a fitase da invenção tem uma atividade residual de fitase após incubação por 1 1/2 horas a 40°C e em pH selecionado de 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, e 8,0 de pelo menos 50%, preferivelmente pelo menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 82%, 84%, 86%, 90%, 92%, ou pelo menos 94%, relativa à atividade de fitase a 0 hora (antes do início da incubação). Em modalidades preferidas, o pH de incubação é i) 2,0, ii) 3,0, iii) 4,0, iv) 5,0, v) 6,0, vi) 7,0, e vii) 8,0. Em modalidades ainda mais preferidas, o pH de incubação é 2,0, e a atividade residual é pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, ou pelo menos 82%. A fitase é incubada em glicina 0,1M, ácido acético 0,1M, Bis-Tris 0,1M, ajustado para o pH desejado. A atividade de fitase é determinada sobre o substrato de fitato de sódio em pH 5,5 e 37°C. O ensaio de atividade de Exemplo 3 onde o tampão é substituído pelo tampão indicado acima é um ensaio preferido. Mais detalhes são encontrados em Exemplo 7.

Em ainda outras modalidades particulares, a fitase da invenção tem uma atividade residual de fitase após incubação por 24 horas a 40°C e em pH selecionado de 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, e 8,0 de pelo menos 50%, preferivelmente pelo menos 51%, 52%, 54%, 56%, 58%, 60%, 62%, 64%, 66%, 68%, 70%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 82%, 84%, 86%, ou pelo menos 88%, relativa à atividade de fitase a 0 hora (antes do início da incubação). Em modalidades preferidas, o pH de incubação é i) 2,0, ii) 3,0, iii) 4,0, iv) 5,0, v) 6,0, vi) 7,0, e vii) 8,0. Em modalidades ainda mais preferidas, o pH de incubação é 2,0, e a atividade residual é pelo menos 50%, 51%, 52%, 54%, ou pelo menos 56%. A fitase é incubada em glicina 0,1M, ácido acético 0,1M, Bis-Tris 0,1M, ajustado para o pH desejado. A atividade de fitase é determinada sobre o substrato de fitato de sódio em pH 5,5 e 37°C. O ensaio de atividade de Exemplo 3 onde o tampão é substituído pelo tampão indicado acima é um ensaio preferido. Mais detalhes são

encontrados em Exemplo 7.

PERFIL DE TEMPERATURA

Em uma modalidade particular, a fitase da invenção tem uma estabilidade emendada em pH em comparação com uma fitase de referência.

5 Exemplos de fitases de referência são listados acima.

Em modalidades particulares, a fitase da invenção tem uma atividade relativa a 30°C que é pelo menos 20% da atividade a 60°C (temperatura ótima), preferivelmente pelo menos 22%, 24%, 26%, 28%, 30%, 32%, 34%, 36%, 38%, ou pelo menos 40%.

10 Em modalidades particulares adicionais, a fitase da invenção tem uma atividade relativa a 70°C que é pelo menos 10% da atividade em 60°C (temperatura ótima), preferivelmente pelo menos 12%, 14%, 16%, 18%, 20%, 22%, ou pelo menos 23%.

15 O perfil de temperatura (atividade de fitase como uma função da temperatura) é determinado em amostras elevadamente puras (um gel de SDS-poliacrilamida deve mostrar a presença de apenas um componente). Preferivelmente, a amostra da enzima é pelo menos 95% pura, conforme determinado por SDS-PAGE. A atividade de fitase é determinada na faixa de temperatura de 20-90°C em pH 4,0, alternativamente em pH 5,5. Em ambos os 20 casos um tampão acetato de sódio 0,25M é usado. A atividade é determinada sobre o substrato de fitato de sódio. Um ensaio preferido é o ensaio de Exemplo 3, exceto naturalmente que a temperatura difere, e se desejado também o pH, cf. acima. Mais detalhes são encontrados em Exemplo 8.

TERMOESTABILIDADE

25 Em uma modalidade particular, a fitase da invenção tem uma termoestabilidade emendada, preferivelmente melhorada, em comparação com uma fitase de referência. Exemplos de fitases de referência são listados acima.

Em modalidades particulares, a fitase da invenção tem uma

atividade residual de fitase após incubação por um tempo desejado (tal como 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 1 % horas, ou 2 horas) em uma temperatura elevada (tal como 65, 70, 75, 80, 85, 90, ou 95°C) em pH 4,5 de pelo menos 50%, preferivelmente pelo menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 82%, 84%, 86%, 90%, 92%, ou pelo menos 94%, relativa à atividade de fitase a 0 hora (antes do início da incubação). Em uma modalidade preferida, o tempo de incubação é 1 hora, o pH é 4,5 e a temperatura 80°C. A fitase é incubada em acetato de sódio 0,25 M. A atividade de fitase é determinada sobre o substrato de fitato de sódio em pH5,5 e 37°C. O ensaio de atividade de Exemplo 3 é um ensaio preferido.

Alternativamente, medições por Calorimetria Diferencial de Varredura (Differential Scanning Calorimetry, DSC) podem ser usadas para determinar a temperatura de desnaturação, Td, da proteína fitase purificada. A Td é indicativa da termoestabilidade da proteína: quanto mais alta a Td, mais alta a termoestabilidade. Medições por DSC podem ser realizadas em vários valores de pH, e.g. usando o VP-DSC de Micro Cal. Varreduras são realizadas em uma velocidade de varredura constante de 1,5°C/min de 20-90°C. Valores de pH preferidos são 4,0 e 5,5, preferivelmente 4,0. Antes da realização de DSC, as fitases são dessalinizadas, e.g. usando colunas NAP-5 (Pharmacia) equilibradas em tampões apropriados (e.g. acetato de sódio 25mM de pH 4,0; acetato de sódio 0,1M, pH 5,5). Manuseio de dados é realizado usando o programa de computador MicroCal Origin (version 4.10), e a temperatura de desnaturação, Td (também chamada de temperatura de fusão, Tm) é definida como a temperatura no ápice do pico no termograma.

Em modalidades particulares, a fitase da invenção tem uma Td, que pode ser determinada como descrito acima, de pelo menos 60°C. Em ainda outras modalidades particulares, a Td é pelo menos 61, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, ou pelo menos 80°C.

DESEMPENHO EM RAÇÃO ANIMAL

Em uma modalidade particular a fitase da invenção tem um desempenho melhorado em ração animal em comparação com uma fitase de referência. Exemplos de fitases de referência são listados acima.

5 O desempenho em ração animal pode ser determinado usando um modelo in vitro simulando as condições gastrointestinais em um animal monogástrico, e.g. como segue:

10 Amostras de ração são compostas de 30% de farinha de feijão-soja e 70% de farinha de milho com CaCl_2 adicionado para uma concentração de 5 g cálcio por kg de ração são preparadas e pré-incubadas a 40°C e pH 3,0 por 30 minutos seguidos pela adição de pepsina (3000 U/g de ração) e 15 dosagens adequadas das fitases (dosagens idênticas são usadas para todas as fitases a serem testadas para permitir comparação), por exemplo entre 0,25 e 0,75 unidades de fitase FYT/g de ração. Um branco sem atividade de fitase também é incluído como referência. As amostras são então incubadas a 40°C e pH 3,0 por 60 minutos seguidos por pH 4,0 por 30 minutos.

20 As reações são interrompidas e ácido fítico e inositol-fosfatos são extraídos pela adição de HCl para uma concentração final de 0,5 M e incubação a 40°C por 2 horas, seguido por um ciclo de congelamento - descongelamento e incubação de 1 hora a 40°C.

25 Ácido fítico e inositol-fosfatos são separados por cromatografia iônica de desempenho alto como descrito por Chen et al. em Journal of Chromatography A (2003) vol. 1018, pp. 41-52 e quantificados como descrito por Skoglund et al. em J. Agric. Food Chem. (1997), vol. 45, pp. 431-436.

Fósforo liberado é então calculado como a diferença em fósforo ligado em inositol-fosfato (IP-P) entre amostras tratadas com fitase e não tratadas. O desempenho relativo de uma fitase específica é calculado como a percentagem do fósforo liberado em relação à fitase de referência

desejada.

Em modalidades particulares o desempenho relativo in vitro da fitase da invenção é pelo menos 105%, preferivelmente pelo menos 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, ou pelo menos 200%.

5 **POLINUCLEOTÍDEOS, CONSTRUTOS DE ÁCIDO NUCLEICO, E**
VETORES DE EXPRESSÃO

A presente invenção também se refere aos polinucleotídeos compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo da presente invenção. Os polinucleotídeos são preferivelmente substancialmente puros, ou isolados, que se refere a uma preparação de polinucleotídeo livre de outros nucleotídeos estranhos ou indesejados e em uma forma adequada para uso dentro de sistemas de produção de proteína geneticamente engenheirados. Assim, um polinucleotídeo substancialmente puro contém no máximo 10%, preferivelmente no máximo 8%, mais preferivelmente no máximo 6%, mais preferivelmente no máximo 5%, mais preferivelmente no máximo 4%, mais preferivelmente no máximo 3%, ainda mais preferivelmente no máximo 2%, muito mais preferivelmente no máximo 1%, e ainda muito mais preferivelmente no máximo 0,5% em peso de outro material de polinucleotídeo com o qual está nativamente associado. Um polinucleotídeo substancialmente puro pode, contudo, incluir regiões 5' e 3' naturalmente ocorrentes, tais como promotores e terminadores. É preferido que o polinucleotídeo substancialmente puro seja pelo menos 90% puro, preferivelmente pelo menos 92% puro, mais preferivelmente pelo menos 94% puro, mais preferivelmente pelo menos 95% puro, mais preferivelmente pelo menos 96% puro, mais preferivelmente pelo menos 97% puro, ainda mais preferivelmente pelo menos 98% puro, muito mais preferivelmente pelo menos 99%, e ainda muito mais preferivelmente pelo menos 99,5% puro em peso. Os polinucleotídeos da presente invenção estão preferivelmente em uma forma substancialmente pura. Em particular, é preferido que os

polinucleotídeos aqui revelados estejam na "forma essencialmente pura", i.e., que a preparação de polinucleotídeo esteja essencialmente livre de outro material de polinucleotídeo com o qual está nativamente associado. Aqui, o termo "polinucleotídeo sub puro" é sinônimo dos termos "polinucleotídeo isolado" e "polinucleotídeo na forma isolada". Os polinucleotídeos podem ser de origem genômica, cDNA, RNA, semi-sintética, sintética, ou qualquer sua combinação.

A presente invenção também se refere aos construtos de ácido nucleico compreendendo um polinucleotídeo isolado da presente invenção operacionalmente ligado em uma ou mais sequências de controle que direcionam a expressão da sequência codificadora em uma célula hospedeira adequada sob condições compatíveis com as sequências de controle.

O termo "construto de ácido nucleico" como aqui usado refere-se a uma molécula de ácido nucleico, quer de fita única quer de fita dupla, que é isolada de um gene naturalmente ocorrente ou que é modificada para conter segmentos de ácidos nucleicos em uma maneira que de outro modo não existiria na natureza. O termo construto de ácido nucleico é sinônimo do termo "cassete de expressão" quando o construto de ácido nucleico contém as sequências de controle exigidas para a expressão de um sequência codificadora da presente invenção.

O termo "sequências de controle" é aqui definido para incluir todos componentes, que são necessários ou vantajosos para a expressão de um polinucleotídeo codificador de um polipeptídeo da presente invenção. Cada sequência de controle pode ser nativa ou estranha à sequência de nucleotídeos codificadora do polipeptídeo. Tais sequências de controle incluem, mas não são limitadas a, uma sequência líder, sequência de poliadenilação, sequência de pró-peptídeo, promotor, sequência de peptídeo de sinal, e terminador de transcrição. Em um mínimo, as sequências de controle incluem um promotor, e sinais de terminação de transcrição e de tradução. As sequências de controle

podem ser fornecidas com ligadores para o propósito de introdução de sítios de restrição específicos facilitando a ligação das sequências de controle com a região de codificação da sequência de nucleotídeos codificadora de um polipeptídeo.

5 A sequência de controle pode ser uma sequência de promotor apropriada, uma sequência de nucleotídeos que é reconhecida por uma célula hospedeira para expressão de um polinucleotídeo codificador de um polipeptídeo da presente invenção.

10 Exemplos de promotores adequados para direção da transcrição dos construtos de ácido nucleico da presente invenção, especialmente em uma célula hospedeira bacteriana, são os promotores obtidos de operon lac de *E. coli*, gene de agarase (dagA) de *Streptomyces coelicolor*, gene de levansucrase (sacB) de *Bacillus subtilis*, gene de alfa-amilase (amyl) de *Bacillus licheniformis*, gene de amilase maltogênica (amyM) de *Bacillus stearothermophilus*, gene de alfa-amilase (amyQ) de *Bacillus amyloliquefaciens*, gene de penicilinase (penP) de *Bacillus licheniformis*, genes de xylA e xylB de *Bacillus subtilis*, e gene de beta-lactamase procariótica (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731), bem como o promotor 15 tac (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21-25). Outros promotores são descritos em "Useful proteins from recombinant bacteria" em Scientific American, 1980, 242: 74-94; e em 20 Sambrook et al., 1989, supra.

25 A sequência de controle também pode ser uma sequência de terminador adequada, uma sequência reconhecida por uma célula hospedeira para terminar transcrição. A sequência de terminador está operacionalmente ligada na terminação 3' da sequência de nucleotídeos codificadora do polipeptídeo. Qualquer terminador que é funcional na célula hospedeira escolhida pode ser usado na presente invenção.

A sequência de controle também pode ser uma sequência líder adequada, uma região não-traduzida de um mRNA que é importante para tradução pela célula hospedeira. A sequência líder está operacionalmente ligada na terminação 5' da sequência de nucleotídeos codificadora do polipeptídeo. Qualquer sequência líder que é funcional na célula hospedeira escolhida pode ser usada na presente invenção.

A sequência de controle também pode ser uma sequência de poliadenilação, uma sequência operacionalmente ligada na terminação 3' da sequência de nucleotídeos e que, quando transcrita, é reconhecida pela célula hospedeira como um sinal para adicionar resíduos de poliadenosina em mRNA transrito. Qualquer sequência de poliadenilação que é funcional na célula hospedeira escolhida pode ser usada na presente invenção.

A sequência de controle também pode ser uma região de codificação de peptídeo de sinal que codifica uma sequência de aminoácido ligada na terminação amino de um polipeptídeo e direciona o polipeptídeo codificado para dentro da rota secretória da célula. A extremidade 5' da sequência codificadora da sequência de nucleotídeos pode inherentemente conter uma região de codificação de peptídeo de sinal naturalmente ligada em matriz de leitura de tradução com o segmento da região de codificação que codifica o polipeptídeo secretado. Alternativamente, a extremidade 5' da sequência codificadora pode conter uma região de codificação de sinal naturalmente ligada em matriz de leitura de tradução com o segmento da região de codificação que codifica o polipeptídeo secretado. Alternativamente, a extremidade 5' da sequência codificadora pode conter uma região de codificação de peptídeo que é estranha à sequência codificadora. A região de codificação de peptídeo de sinal estranha pode ser exigida onde a sequência codificadora não contém naturalmente uma região de codificação de peptídeo de sinal. Alternativamente, a região de codificação de peptídeo de sinal estranha pode simplesmente substituir a região de

codificação de peptídeo de sinal natural com o propósito de intensificar a secreção do polipeptídeo. Contudo, qualquer região de codificação de peptídeo de sinal que direciona o polipeptídeo expressado para dentro da rota secretória de uma célula hospedeira escolhida pode ser usada na presente invenção.

Regiões de codificação de peptídeo de sinal eficazes para células hospedeiras bacterianas são as regiões de codificação de peptídeo de sinal obtidas dos genes para amilase maltogênica de *Bacillus* NCIB 11837, alfa-amilase de *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* subtilisin, beta-lactamase de *Bacillus licheniformis*, proteases neutras (nprT, nprS, nprM) de *Bacillus stearothermophilus*, e prsA de *Bacillus subtilis*. Outros peptídeos de sinal são descritos por Simonen e Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.

Em um aspecto preferido, a região de codificação de peptídeo de sinal é de nucleotídeos 1 a 81 de SEQ ID NO:7 que codificam aminoácidos 1 a 27 de SEQ ID NO:8.

A sequência de controle também pode ser uma região de codificação de pró-peptídeo que codifica uma sequência de aminoácido posicionada na terminação amino de um polipeptídeo. O polipeptídeo resultante é conhecido como uma pró-enzima ou pró-polipeptídeo (ou um zimogênio em alguns casos). Um pró-polipeptídeo é geralmente inativo e pode ser convertido a um polipeptídeo ativo maduro por clivagem catalítica ou autocatalítica do pró-peptídeo a partir do pró-polipeptídeo. A região de codificação de pró-peptídeo pode ser obtida dos genes para protease alcalina (aprE) de *Bacillus subtilis*, protease neutra (nprT) de *Bacillus subtilis*, alfa-fator de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinase aspártica de *Rhizomucor miehei*, e lacase termófila de *Myceliophthora* (WO 95/33836).

Onde ambas as regiões de codificação de pró-peptídeo e de peptídeo de sinal estão presentes na terminação amino de um polipeptídeo, a

região de pró-peptídeo está posicionada ao lado da terminação amino de um polipeptídeo e a região de peptídeo de sinal está posicionada ao lado da terminação amino da região de pró-peptídeo.

Também pode ser desejável adicionar sequências regulatórias 5 que permitem a regulação da expressão do polipeptídeo relativo ao crescimento da célula hospedeira. Exemplos de sistemas regulatórios são aqueles que causam o ligamento e o desligamento da expressão do gene em resposta a um estímulo químico ou físico, incluindo a presença de um composto regulatório. Sistemas regulatórios em sistemas procarióticos 10 incluem os sistemas operadores lac, tac, e trp. Outros exemplos de sequências regulatórias são aqueles que permitem a amplificação de gene. Nestes casos, a sequência de ácido nucleico codificadora do polipeptídeo estaria operacionalmente ligada na sequência regulatória.

A presente invenção também se refere aos vetores de expressão recombinantes compreendendo um polinucleotídeo da presente invenção, um promotor, e sinais de terminação de transcrição e de tradução. O termo "vetor de expressão" é aqui definido como uma molécula de DNA linear ou circular que compreende um polinucleotídeo codificador de um polipeptídeo da invenção, e que está operacionalmente ligada em nucleotídeos 15 adicionais que proporcionam sua expressão. As várias sequências de controle e os vários ácidos nucleicos descritos acima podem ser unidos para produzirem um vetor de expressão recombinante que pode incluir um ou mais sítios de restrição convenientes para permitir a inserção ou substituição da 20 sequência de nucleotídeos codificadora do polipeptídeo em tais sítios. Alternativamente, uma sequência de nucleotídeos da presente invenção pode 25 ser expressada pela inserção da sequência de nucleotídeos ou do construto de ácido nucleico compreendendo a sequência em um vetor apropriado para expressão. Na criação do vetor de expressão, a sequência codificadora é localizada no vetor de modo que a sequência codificadora esteja

operacionalmente ligada nas sequências de controle apropriadas para expressão.

O termo "expressão" inclui qualquer etapa envolvida na produção do polipeptídeo incluindo, mas não limitada a, transcrição, 5 modificação de pós-transcrição, tradução, modificação de pós-tradução, e secreção.

O vetor de expressão recombinante pode ser qualquer vetor (e.g., um plasmídeo ou vírus) que pode ser convenientemente submetido aos procedimentos de DNA recombinantes e pode causar a expressão da 10 sequência de nucleotídeos. A escolha do vetor tipicamente dependerá da compatibilidade do vetor com a célula hospedeira na qual o vetor é para ser introduzido. Os vetores podem ser plasmídeos lineares ou fechados circulares.

Um vetor compreendendo um polinucleotídeo da presente invenção é introduzido em uma célula hospedeira de modo que o vetor seja 15 mantido como um integrante cromossômico ou como um vetor extra-cromossômico auto-replicante como descrito no início. O termo "célula hospedeira" inclui qualquer progênie de uma célula parental que não é idêntica à célula parental devido às manipulações que ocorrem durante 20 replicação. A escolha de uma célula hospedeira dependerá em grande extensão do gene codificador do polipeptídeo e sua fonte.

O vetor pode ser um vetor autonomicamente replicante, i.e. um vetor que existe como uma entidade extra-cromossômica, cuja replicação é independente da replicação cromossômica, e.g., um plasmídeo, um elemento extracromossômico, um minicromossomo, ou um cromossomo artificial. O 25 vetor pode conter qualquer meio para garantir a auto-replicação. Alternativamente, o vetor pode ser um que, quando introduzido na célula hospedeira, é integrado no genoma e replicado junto com o(s) cromossomo(s) no qual (nos quais) ele tem sido integrado. Ademais, um vetor ou plasmídeo único ou dois ou mais vetores ou plasmídeos que juntos contêm o DNA total a

ser introduzido no genoma da célula hospedeira, ou um transposon pode(m) ser usado(s).

Os vetores da presente invenção preferivelmente contêm um ou mais marcadores selecionáveis que permitem seleção fácil de células transformadas. Um marcador selecionável é um gene cujo produto proporciona resistência viral ou a biocida, resistência a metais pesados, prototrofia a auxótrofos, e semelhantes.

Um gene condicionalmente essencial pode funcionar como um marcador seleconável não-antibiótico. Exemplos não-limitantes de marcadores selecionáveis não-antibióticos condicionalmente essenciais bacterianos são os genes dal de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, ou outros *Bacilli*, que são apenas essenciais quando a bactéria é cultivada na ausência de D-alanina. Também os genes codificadores de enzimas envolvidos na renovação (turnover) de UDP-galactose podem funcionar como marcadores condicionalmente essenciais em uma célula quando a célula é crescida na presença de galactose ou crescida em um meio que causa a presença de galactose. Exemplos não-limitantes de tais genes são aqueles de *B. subtilis* ou *B. licheniformis* codificadores de fosforilase dependente de UTP (EC 2.7.7.10), uridilil-transferase dependente de UDP-glicose (EC 2.7.7.12), ou UDP-galactose epimerase (EC 5.1.3.2). Também um gene de xilose isomerase tal como *xylA*, de *Bacilli* pode ser usado como marcadores selecionáveis em células crescidas em meio mínimo com xilose como a única fonte de carbono. Os genes necessários para utilização de gliconato, *gntK*, e *gntP* também podem ser usados como marcadores selecionáveis em células crescendo em meio mínimo com gliconato como única fonte de carbono. Outros exemplos de genes condicionalmente essenciais são conhecidos na técnica. Marcadores selecionáveis antibióticos conferem resistência a antibiótico a antibióticos tais como ampicilina, canamicina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, neomicina, higromicina ou metotrexato.

Os vetores da presente invenção preferivelmente contêm um elemento(s) que permite integração do vetor no genoma de célula hospedeira ou replicação autônoma do vetor na célula independente do genoma.

Para integração no genoma da célula hospedeira, o vetor pode depender da sequência de polinucleotídeo codificadora do polipeptídeo ou qualquer outro elemento do vetor para integração no genoma por recombinação homóloga ou heteróloga. Alternativamente, o vetor pode conter sequências de nucleotídeos adicionais para direcionar a integração por recombinação homóloga no genoma da célula hospedeira em uma localização(ões) precisa(s) no(s) cromossomo(s). Para aumentar a possibilidade de integração em uma localização precisa, os elementos integradores devem preferivelmente conter um número suficiente de ácido nucleico, tal como 100 a 10.000 pares de base, preferivelmente 400 a 10.000 pares de base, e muito mais preferivelmente 800 a 10.000 pares de base, que têm um grau alto de identidade com a sequência alvo correspondente para intensificar a probabilidade de recombinação homóloga. Os elementos integradores podem ser qualquer sequência que é homóloga com a sequência alvo no genoma da célula hospedeira. Ademais, os elementos integradores podem ser sequências de nucleotídeos codificadoras ou não-codificadoras. Por outro lado, o vetor pode ser integrado no genoma da célula hospedeira por recombinação heteróloga.

Para replicação autônoma, o vetor pode adicionalmente compreender uma origem de replicação permitindo que o vetor se replique autonomamente na célula hospedeira em questão. A origem de replicação pode ser qualquer replicador plasmídeo mediador de replicação autônoma que funciona em uma célula. O termo "origem de replicação" ou "replicador plasmídeo" é aqui definido como uma sequência de nucleotídeos quer permite que um plasmídeo ou vetor se replique in vivo.

Exemplos de origens de replicação bacterianas são as origens

de replicação de plasmídeos pBR322, pUC19, pACYC177, e pACYC184 permitindo replicação em *E. coli*, e pUB110, pE194, pTA1060, e pAMR1 permitindo replicação em *Bacillus*.

Mais do que uma cópia de um polinucleotídeo da presente invenção pode ser inserida na célula hospedeira para aumentar a produção do produto de gene. Um aumento no número de cópias do polinucleotídeo pode ser obtido pela integração de pelo menos uma cópia adicional da sequência dentro do genoma da célula hospedeira ou pela inclusão de um gene marcador selecionável amplificável com o polinucleotídeo onde células contendo cópias amplificadas do gene marcador selecionável, e deste modo cópias adicionais do polinucleotídeo, podem ser selecionadas pelo cultivo das células na presença do agente selecionável apropriado.

Os procedimentos usados para ligar os elementos descritos acima para construir os vetores de expressão recombinantes da presente invenção são bem conhecidos por uma pessoa experiente na técnica (veja, e.g., Sambrook et al., 1989, supra).

CÉLULAS HOSPEDEIRAS

A presente invenção também se refere às células hospedeiras recombinantes, compreendendo um polinucleotídeo da presente invenção, que 20 são vantajosamente usadas na produção recombinante dos polipeptídeos. O termo "célula hospedeira", como aqui usado, inclui qualquer tipo de célula que é suscetível à transformação, transfecção, transdução, e semelhantes com um construto de ácido nucleico compreendendo um polinucleotídeo da presente invenção.

25 A célula hospedeira pode ser um microorganismo unicelular, e.g., um procarioto, ou um microorganismo não-unicelular, e.g., um eucarioto.

Microorganismos unicelulares úteis são células bacterianas tais como bactérias gram-positivas incluindo, mas não limitadas a, uma célula *Bacillus*, e.g., *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus*

brevis, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, e *Bacillus thuringiensis*; ou uma célula *Streptomyces*, e.g., *Streptomyces lividans* e *Streptomyces murinus*, ou 5 bactérias gram-negativas tais como *E. coli* e *Pseudomonas* sp. Em um aspecto preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, ou *Bacillus subtilis*. Em outro aspecto preferido, a célula *Bacillus* é um *Bacillus* alcalófico.

10 A introdução de um vetor em uma célula hospedeira bacteriana pode, por exemplo, ser realizada por transformação de protoplasto (veja, e.g., Chang e Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), usando células competentes (veja, e.g., Young e Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829, ou Dubnau e Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), eletroporação (veja, e.g., Shigekawa e 15 Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751), ou conjugação (veja, e.g., Koehler e Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

A célula hospedeira também pode ser um eucarioto, tal como uma célula de mamífero, inseto, planta ou fungo.

Métodos de produção

20 A presente invenção também se refere aos métodos para produzir um polipeptídeo da presente invenção, compreendendo (a) cultivar uma célula, que em sua forma de tipo selvagem é capaz de produzir o polipeptídeo, sob condições conducentes para a produção do polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo. Preferivelmente, a célula é do gênero 25 *Buttiauxella*, e mais preferivelmente *Buttiauxella agrestis* ou *Buttiauxella gaviniae*.

A presente invenção também se refere aos métodos para produzir um polipeptídeo da presente invenção, compreendendo (a) cultivar uma célula hospedeira sob condições conducentes para a produção do

polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

Nos métodos de produção da presente invenção, as células são cultivadas em um meio nutriente adequado para produção do polipeptídeo usando métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, a célula pode ser 5 cultivada por cultura em frasco agitado, e fermentação em escala pequena ou em escala grande (incluindo fermentações no estado sólido, em batelada alimentada, em batelada, ou contínuas) em fermentadores laboratoriais ou industriais realizada em um meio adequado sob condições permitindo que o polipeptídeo seja expressado e/ou isolado. A cultura ocorre em um meio 10 nutriente adequado compreendendo fontes de carbono e de nitrogênio e sais inorgânicos, usando procedimentos conhecidos na técnica. Meios adequados estão disponíveis em fornecedores comerciais ou podem ser preparados de acordo com composições publicadas (e.g., em catálogos da American Type Culture Collection). Se o polipeptídeo é secretado para dentro do meio 15 nutriente, o polipeptídeo pode ser recuperado diretamente do meio. Se o polipeptídeo não é secretado, ele pode ser recuperado dos lisados de célula.

Os polipeptídeos podem ser detectados usando métodos conhecidos na técnica que são específicos para os polipeptídeos. Estes métodos de detecção podem incluir o uso de anticorpos específicos, formação 20 de um produto de enzima, ou desaparecimento de um substrato de enzima. Por exemplo, um ensaio de enzima pode ser usado para determinar a atividade 25 do polipeptídeo como aqui descrito.

O polipeptídeo resultante pode ser recuperado usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, o polipeptídeo pode ser recuperado do meio nutriente por procedimentos convencionais incluindo, mas não limitados a, centrifugação, filtração, extração, secagem por evaporação, evaporação, ou precipitação.

Os polipeptídeos da presente invenção podem ser purificados por uma variedade de procedimentos conhecidos na técnica incluindo, mas

não limitados a, cromatografia (e.g., troca iônica, afinidade, hidrofóbica, cromatofocalização, e exclusão de tamanho), procedimentos eletroforéticos (e.g., focalização eletroforética preparativa), solubilidade diferencial (e.g., precipitação por sulfato de amônio), SDS-PAGE, ou extração (veja, e.g., 5 "Protein Purification", J.-C. Janson e Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nova Iorque, 1989). Um esquema de purificação típico pode incluir centrifugação, filtração de germe, precipitação por sulfato de amônio (usando e.g. saturação de sulfato de amônio 80%), centrifugação, re-suspensão de pelotas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5, filtração, diálise contra 10 tampão acetato de sódio 50 mM e cromatografia de troca catiônica (S-sepharose, carregando com acetato de sódio 50 mM pH 4,5, eluindo com um gradiente salino linear (acetato de sódio 50mM pH 4,5 + NaCl 1 M)).

PLANTAS TRANSGÊNICAS

A presente invenção também se refere a uma planta transgênica, parte de planta transgênica, ou célula de planta transgênica que 15 tem sido transformada com uma sequência de nucleotídeos codificadora de um polipeptídeo tendo atividade de fitase da presente invenção de modo a expressar e produzir o polipeptídeo em quantidades recuperáveis. O polipeptídeo pode ser recuperado da planta ou parte de planta. 20 Alternativamente, a planta ou parte de planta contendo o polipeptídeo recombinante pode ser usada como tal para melhorar a qualidade de um alimento ou de uma razão, e.g., melhorar o valor nutricional, a palatabilidade e as propriedades reológicas, ou para destruir um fator anti-nutritivo.

Em uma modalidade particular, o polipeptídeo é direcionado 25 para os vacúolos de armazenagem de endosperma em sementes. Isto pode ser obtido por síntese dele como um precursor com um peptídeo de sinal adequado, veja Horvath et al. em PNAS, Feb. 15, 2000, vol. 97, no. 4, p. 1914-1919.

A planta transgênica pode ser dicotiledônea (uma dicot) ou

monocotiledônea (uma monocot) ou suas variantes engenheiradas. Exemplos de plantas monocot são gramíneas, tais como grama do prado (blue grass, *Poa*), gramínea de forragem tal como *Festuca*, *Lolium*, gramínea de clima temperado, tal como *Agrostis*, e cereais, e.g., trigo, aveia, centeio, cevada, 5 arroz, sorgo, triticale (híbrido estabilizado de trigo (*Triticum*) e centeio (*Secale*), e milho (*Zea mays*). Exemplos de plantas dicot são tabaco, legumes, tal como girassol (*Helianthus*), algodoeiro (*Gossypium*), tremoços, batateira, cana-de-açúcar, ervilha, feijão e feijão-soja, e plantas crucíferas (família 10 *Brassicaceae*), tal como couve-flor, colza, e o organismo modelo proximamente relacionado *Arabidopsis thaliana*. Plantas baixas em fitato como descritas e.g. em Patente US de No. 5.689.054 e Patente US de No. 15 6.111.168 são exemplos de plantas engenheiradas.

Exemplos de partes de planta são caule, calo, folhas, raiz, frutas, sementes, e tubérculos, bem como os tecidos individuais 20 compreendendo estas partes, e.g. epiderme, mesófilo, parênquima, tecidos vasculares, meristemas. Também compartimentos de célula de planta específicos, tais como cloroplasto, apoplasto, mitocôndria, vacúolo, peroxissomos, e citoplasma são considerados como uma parte de planta. Ademais, qualquer célula de planta, seja qual for a origem do tecido, é 25 considerada uma parte de planta. Igualmente, partes de planta tais como células e tecidos específicos isolados para facilitar a utilização da invenção também são consideradas partes de planta, e.g. embriões, endospermas, aleurona e capas de semente.

Também está incluída dentro do escopo da presente invenção a 25 progênie de tais plantas, partes de planta e células de planta.

A planta ou célula de planta transgênica expressando um polipeptídeo da presente invenção pode ser construída de acordo com métodos conhecidos na técnica. Resumidamente, a planta ou célula de planta é construída pela incorporação de um ou mais construtos de expressão

codificadores de um polipeptídeo da presente invenção dentro do genoma da planta hospedeira e propagação da planta ou célula de planta modificada resultante em uma planta ou célula de planta transgênica.

Convenientemente, o construto de expressão é um construto de ácido nucleico que compreende uma sequência de ácido nucleico codificadora de um polipeptídeo da presente invenção operacionalmente ligada em sequências regulatórias apropriadas exigidas para expressão da sequência de ácido nucleico na planta ou parte de planta escolhida. Ademais, o construto de expressão pode compreender um marcador selecionável útil para identificar células hospedeiras nas quais o construto de expressão tem sido integrado e as sequências de DNA necessárias para introdução do construto na planta em questão (a última depende do método de introdução de DNA a ser usado).

A escolha de sequências regulatórias, tais como sequências de promotor e de terminador e opcionalmente sequências de sinal e de trânsito é determinada, por exemplo, tendo por base quando, onde, e como o polipeptídeo é desejado para ser expressado. Por exemplo, a expressão do gene codificador de um polipeptídeo da presente invenção pode ser constitutiva ou induzível, ou pode ser específica de tecido, de estágio ou de desenvolvimento, e o produto de gene pode ser direcionado para um compartimento de célula, tecido ou parte de planta específico tal como sementes ou folhas. Sequências regulatórias são, por exemplo, descritas por Tague et al., 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

Para expressão constitutiva, os seguintes promotores podem ser usados: o promotor 35S-CaMV (Franck et al., 1980, *Cell* 21: 285-294), promotor de ubiquitina 1 de milho (Christensen AH, Sharrock RA e Quail 1992. "Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation"), ou o promotor de actina 1 de arroz (*Plant Mol. Biol.* 18, 675-689.; Zhang W, McElroy D. e Wu R 1991, *Analysis of*

rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants". *Plant Cell* 3, 1155-1165). Promotores específicos de órgão podem ser, por exemplo, um promotor de tecidos de armazenamento-dreno tais como sementes, tubérculos de batata, e frutas (Edwards & Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), ou de tecidos de dreno metabólico tais como meristemas (Ito et al., 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), um promotor específico de semente tal como o promotor de glutelina, prolamina, globulina, ou albumina de arroz (Wu et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 885889), um promotor de legumina B4 de *Vicia faba* e o gene de proteína de semente desconhecido de *Vicia faba* (Conrad et al., 1998, *Journal of Plant Physiology* 152: 708-711), um promotor de uma proteína de corpo oleoso de semente (Chen et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 935-941), o promotor de proteína de armazenagem napA de *Brassica napus*, ou qualquer outro promotor específico de semente conhecido na técnica, e.g., como descrito em WO 91/14772. Ademais, o promotor pode ser um promotor específico de folha tal como o promotor rbcS de arroz ou tomateiro (Kyozuka et al., 1993, *Plant Physiology* 102: 991-1000, o promotor de gene de adenina metil-transferase do vírus do cólera (Mitra e Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93), ou o promotor de gene aldP de arroz (Kagaya et al., 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668-674), ou um promotor induzível por ferimento tal como o promotor pin2 de batateira (Xu et al., 1993, *Plant Molecular Biology* 22: 573-588). Igualmente, o promotor pode ser induzível por tratamentos abióticos tais como temperatura, estiagem ou alterações em salinidade ou induzível por substâncias exogenousamente aplicadas que ativam o promotor, e.g. etanol, estrogênios, hormônios de planta e semelhantes, etileno, ácido abscísico, ácido giberélico, e/ou metais pesados.

Um elemento intensificador de promotor também pode ser usado para realizar expressão mais alta do polipeptídeo na planta. Por exemplo, o elemento intensificador de promotor pode ser um ítron que está

posicionado entre o promotor e a sequência de nucleotídeos codificadora de um polipeptídeo da presente invenção. Por exemplo, Xu et al., 1993, supra revelam o uso do primeiro ítron do gene de actina 1 de arroz para intensificar expressão.

5 Ainda mais, o uso de códon pode ser otimizado para a espécie de planta em questão para melhorar a expressão (veja Horvath et al. referido acima).

O gene marcador selecionável e outras partes do construto de expressão podem ser escolhidos daqueles disponíveis na técnica.

10 O construto de ácido nucleico é incorporado no genoma da planta de acordo com técnicas convencionais conhecidas na técnica, incluindo transformação mediada por *Agrobacterium*, transformação mediada por vírus, microinjeção, bombardeio de partículas, transformação biolística, e eletroporação (Gasser et al., 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto et al., 1989, *Nature* 338: 274).

15 Presentemente, transferência de gene mediada por *Agrobacterium tumefaciens* é o método escolhido para gerar dicots transgênicas (para uma revisão, veja Hooykas e Schilperoort, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 15-38), e também pode ser usado para transformar monocots, embora outros métodos de transformação sejam mais freqüentemente usados para estas plantas. Presentemente, o método escolhido para gerar monocots transgênicas, suplementando a abordagem de *Agrobacterium*, é o bombardeio de partículas (partículas microscópicas de ouro ou de tungstênio revestidas com o DNA transformante) de embriões desenvolventes ou caule embriônico (Christou, 1992, *Plant Journal* 2: 275-281; Shimamoto, 1994, *Current Opinion Biotechnology* 5: 158-162; Vasil et al., 1992, *Bio/Technology* 10: 667-674). Um método alternativo para transformação de monocots é baseado em transformação de protoplasto como descrito por Omirulleh et al., 1993, *Plant Molecular Biology* 21: 415-428.

Após transformação, os transformantes tendo incorporado neles o construto de expressão são selecionados e regenerados em plantas inteiras por métodos bem conhecidos na técnica. Freqüentemente o procedimento de transformação é planejado para a eliminação seletiva de genes de seleção quer durante regeneração quer nas gerações seguintes pelo uso de e.g. co-transformação com dois construtos de T-DNA separados ou excisão sítio-específica do gene de seleção por uma recombinase específica.

A presente invenção também se refere aos métodos para produzir um polipeptídeo da presente invenção compreendendo (a) cultivar uma planta ou célula de planta transgênica compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificadora de um polipeptídeo tendo atividade de fitase da presente invenção sob condições conducentes para a produção do polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

ANIMAIS TRANSGÊNICOS

A presente invenção também se refere a um animal não-humano, transgênico e aos seus produtos ou elementos, cujos exemplos são fluidos corporais tais como leite e sangue, órgãos, carne, e células de animal. Técnicas para expressar proteínas, e.g. em células de mamífero, são conhecidas na técnica, veja e.g. o manual "Protein Expression: A Practical Approach", Higgins e Hames (eds), Oxford University Press (1999), e os três outros manuais nesta série relacionados com Transcrição de Gene, Processamento de RNA, e Processamento de Pós-Tradução. Geralmente falando, para preparar um animal transgênico, células selecionadas de um animal selecionado são transformadas com uma sequência de ácido nucleico codificador de um polipeptídeo tendo atividade de fitase da presente invenção de modo a expressarem e produzirem o polipeptídeo. O polipeptídeo pode ser recuperado do animal, e.g. do leite de animais fêmeas, ou o polipeptídeo pode ser expressado para o benefício do próprio animal, e.g. para auxiliar na digestão do animal. Exemplos de animais são mencionados abaixo na seção

intitulada Ração de animal.

Para produzir um animal transgênico tendo em vista recuperar o polipeptídeo do leite do animal, um gene codificador do polipeptídeo pode ser inserido nos ovos fertilizados de um animal em questão, e.g. pelo uso de um vetor de expressão de transgene que compreende um promotor de proteína de leite adequado, e o gene codificador do polipeptídeo. O vetor de expressão de transgene é microinjetado em ovos fertilizados, e preferivelmente permanentemente integrado no cromossomo. Uma vez tendo iniciado o crescimento e a divisão do ovo, o embrião potencial é implantado em uma mãe de aluguel, e os animais trazendo o transgene são identificados. O animal resultante pode ser então multiplicado por geração convencional. O polipeptídeo pode ser purificado a partir do leito do animal, veja e.g. Meade, H.M. et al (1999): "Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals, Gene expression systems: Using nature for the art of expression". J. M. Fernandez e J. P. Hoeffler (eds.), Academic Press.

Alternativamente, com o propósito de produzir um animal não-humano transgênico que traz no genoma de suas células somáticas e/ou germinativas uma sequência de ácido nucleico incluindo um construto de transgene heterólogo incluindo um transgene codificador do polipeptídeo, o transgene pode ser operacionalmente ligado em uma primeira sequência regulatória para expressão específica em glândula salivar do polipeptídeo, como revelado em WO 00/064247.

COMPOSIÇÕES E USOS

Em ainda outros aspectos, a presente invenção refere-se às composições compreendendo um polipeptídeo da presente invenção, bem como aos métodos usando estas.

As composições de polipeptídeo podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos na técnica e podem estar na forma de uma composição líquida ou seca. Por exemplo, a composição de polipeptídeo pode

estar na forma de granulados ou microgranulados. O polipeptídeo a ser incluído na composição pode ser estabilizado de acordo com métodos conhecidos na técnica.

5 A fitase da invenção pode ser usada para degradação, em qualquer contexto industrial, de, por exemplo, fitato, ácido fítico, e/ou os mono-, di-, tri-, tetra- e/ou penta-fosfatos de mio-inositol. É bem sabido que os grupos fosfato destes compostos quelam cátions divalentes e trivalentes tais como íons de metal, i.a. os íons nutricionalmente essenciais de cálcio, ferro, zinco e magnésio bem como os minerais traços manganês, cobre e 10 molibdênio. Além disso, o ácido fítico também em uma certa extensão se estende às proteínas por interação eletrostática.

Conformemente, usos preferidos dos polipeptídeos da invenção são em preparações de ração animal (incluindo alimento de humano) ou em aditivos para tais preparativos.

15 Em uma modalidade particular, o polipeptídeo da invenção pode ser usado para melhorar o valor nutricional de uma ração animal. Exemplos não-limitantes de aperfeiçoamento do valor nutricional de ração animal (incluindo alimento de humano), são: aperfeiçoamento de digestibilidade de ração; promoção de crescimento do animal; 20 aperfeiçoamento de biodisponibilidade de proteínas; aumento do nível de fosfato digestível; aperfeiçoamento de liberação e/ou degradação de fitato; aperfeiçoamento de biodisponibilidade de minerais traço, e/ou macro-minerais; e/ou aperfeiçoamento de qualidade de casca de ovo. O valor nutricional da ração é portanto aumentado, e a velocidade de crescimento e/ou 25 ganho de peso e/ou conversão de ração (i.e. o peso de ração ingerida para ganho de peso) do animal pode ser melhorado.

Ademais, o polipeptídeo da invenção pode ser usado para reduzir o nível de fitato de esterco.

ANIMAIS, RAÇÃO ANIMAL, E ADITIVOS DE RAÇÃO ANIMAL

O termo animal inclui todos os animais, incluindo seres humanos. Exemplos de animais são não-ruminantes, e ruminantes. Animais ruminantes incluem, por exemplo, animais tais como ovelha, cabra, e gado, e.g. vaca tal como gado de corte e vacas leiteiras. Em uma modalidade particular, o animal é um animal não-ruminante. Animais não-ruminantes incluem animais monogástricos, e.g. porcos ou suínos (incluindo, mas não limitados a, leitões, porcos em crescimento, e porcas); aves domésticas tais como perus, patos e galinhas (incluindo mas não limitadas a frangos, galinhas poedeiras); peixes (incluindo mas não limitados a salmão, truta, tilápia, peixe-gato e carpa); e crustáceos (incluindo mas não limitados a camarão e pitu).

O termo ração ou composição de ração significa qualquer composto, preparação, mistura, ou composição adequada para, ou intencionada para ingestão por um animal.

No uso de acordo com a invenção o polipeptídeo pode ser alimentado a um animal antes da, após a, ou simultaneamente com a dieta. O último é preferido.

Em uma modalidade particular, o polipeptídeo, na forma na qual é adicionado na ração, ou quando estiver sendo incluído em um aditivo de ração, está substancialmente puro. Em uma modalidade particular ele está bem definido. O termo "bem definido" significa que uma preparação de fitase é pelo menos 50% pura conforme determinada por cromatografia de exclusão de tamanho (veja Exemplo 12 de WO 01/58275). Em outras modalidades particulares a preparação de fitase é pelo menos 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94, ou pelo menos 95% pura conforme determinada por este método.

Uma preparação de polipeptídeo substancialmente pura e/ou bem definida é vantajosa. Por exemplo, é muito mais fácil de dosar corretamente na ração um polipeptídeo que está essencialmente livre de outros polipeptídeos interferentes ou contaminantes. O termo dosar refere-se em particular ao objetivo de obter resultados consistentes e constantes, e a

capacidade de otimizar a dosagem baseado no efeito desejado.

Para o uso em ração animal, contudo, um polipeptídeo de fitase da invenção não precisa ser aquele puro; ele pode, e.g. incluir outros polipeptídeos, em cujo caso poderia ser chamado de uma preparação de fitase.

5 Uma preparação de fitase: (a) pode ser adicionada diretamente na ração (ou usada diretamente em um processo de tratamento de proteínas), ou (b) pode ser usada na produção de uma ou mais composições intermediárias tais como aditivos ou pré-misturas de ração que são subseqüentemente adicionadas na ração (ou usada em um processo de tratamento). O grau de pureza descrito acima refere-se à pureza da preparação 10 de polipeptídeo original, seja usada de acordo com (a) ou (b) acima.

Preparações de polipeptídeo com purezas desta ordem de magnitude são em particular obteníveis usando métodos de produção recombinantes, enquanto que não são tão facilmente obtidas e também submetidas a uma variação muito maior de batelada-para-batelada quando o polipeptídeo é produzido pelos métodos de fermentação tradicionais.

Tal preparação de polipeptídeo pode ser naturalmente misturada com outros polipeptídeos.

O polipeptídeo pode ser adicionado na ração em qualquer forma, quer ele como um polipeptídeo relativamente puro, quer misturado com outros componentes intencionados para adição na ração animal, i.e. na forma de aditivos de ração animal, tais como as denominadas pré-misturas para ração animal.

Em um outro aspecto a presente invenção refere-se às composições para uso em ração animal, tal como ração animal, e aditivos de ração animal, e.g. pré-misturas.

À parte do polipeptídeo da invenção, os aditivos de ração animal da invenção contêm pelo menos uma vitamina solúvel em gordura, e/ou pelo menos uma vitamina solúvel em água, e/ou pelo menos um mineral

traço. O aditivo de ração também pode conter pelo menos um macro-mineral.

Outros ingredientes aditivos de ração, opcionais, são agentes colorantes, e.g. carotenóides tais como beta-caroteno, astaxantina, e luteína; compostos aromatizantes; estabilizadores; peptídeos antimicrobianos; ácidos graxos poliinsaturados; espécies geradoras de oxigênio reativo; e/ou pelo menos um outro polipeptídeo selecionado dentre fitase (EC 3.1.3.8 ou 3.1.3.26); fosfatase (EC 3.1.3.1; EC 3.1.3.2; EC 3.1.3.39); xilanase (EC 3.2.1.8); galactanase (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidase (EC 3.2.1.22); protease (EC 3.4.--). fosfolipase A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipase A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipase (EC 3.1.1.5); fosfolipase C (3.1.4.3); fosfolipase D (EC 3.1.4.4); amilase tal como, por exemplo, alfa-amilase (EC 3.2.1.1); e/ou beta-glucanase (EC 3.2.1.4 ou EC 3.2.1.6).

Em uma modalidade particular estes outros polipeptídeos são bem definidos (como definidos acima para preparações de fitase).

A fitase da invenção também pode ser combinada com outras fitases, por exemplo fitases de ascomiceto tais como fitases de *Aspergillus*, por exemplo derivadas de *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus niger*, ou *Aspergillus awamori*; ou fitases de basidiomiceto, por exemplo derivadas de *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Trametes pubescens*, ou *Paxillus involutus*; ou seus derivados, fragmentos e/ou variantes que têm atividade de fitase.

Assim, em modalidades preferidas de uso em ração animal da invenção, e em modalidades preferidas de aditivo de ração animal e da ração animal da invenção, a fitase da invenção é combinada com tais fitases.

Exemplos de peptídeos antimicrobianos (AMP's) são CAP18, Leucocina A, Triterpticina, Protegrina-1, Tanatina, Defensina, Lactoferrina, Lactoferricina, e Ovispirina tal como Novispirina (Robert Lehrer, 2000), Plectasinas, e Estatinas, incluindo os compostos e polipeptídeos revelados em WO 03/044049 e WO 03/048148, bem como variantes ou fragmentos dos

citados acima que retêm atividade antimicrobiana.

Exemplos de polipeptídeos antifúngicos (AFP's) são os peptídeos de *Aspergillus giganteus*, e *Aspergillus niger*, bem como suas variantes e seus fragmentos que retêm atividade antifúngica, como revelados

5 em WO 94/01459 e WO 02/090384.

Exemplos de ácidos graxos poliinsaturados são ácidos graxos poliinsaturados C18, C20 e C22, tais como ácido araquidônico, ácido docosahexaenóico e ácido gama-linoleico.

Exemplos de espécies geradoras de oxigênio reativo são agentes químicos tais como perborato, persulfato, ou percarbonato; e

10 polipeptídeos tais como uma oxidase, uma oxigenase ou uma sintetase.

Costumeiramente vitaminas solúveis em gordura e água, bem como minerais traço formam parte de uma denominada pré-mistura intencionada para adição para adição na ração, enquanto que macro-minerais

15 são costumeiramente adicionados separadamente na ração. Qualquer um destes tipos de composição, quando enriquecidos com um polipeptídeo da invenção, é um aditivo de ração animal da invenção.

Em uma modalidade particular, o aditivo de ração animal da invenção é intencionado para ser incluído (ou receitado como tendo que ser incluído) em ração ou dietas animais em níveis de 0,01 a 10,0%; mais particularmente 0,05 a 5,0%; ou 0,2 a 1,0% (% significando g de aditivo por 100 g de ração). Isto é assim em particular para pré-misturas.

Os seguintes são listas não-exclusivas de exemplos destes componentes:

25 Exemplos de vitaminas solúveis em gordura são vitamina A, vitamina D3, vitamina E, e vitamina K, e.g. vitamina K3.

Exemplos de vitaminas solúveis em água são vitamina B12, biotina e colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico e pantotenato, e.g. D-pantotenato de Ca.

Exemplos de minerais traço são manganês, zinco, ferro, cobre, iodo, selênio, e cobalto.

Exemplos de macro-minerais são cálcio, fósforo e sódio.

As exigências nutricionais destes componentes (exemplificados com aves domésticas e leitões/porcos) são listadas em Tabela A de WO 01/58275. Exigência nutricional significa que estes componentes devem ser fornecidos na dieta nas concentrações indicadas.

Alternativamente, o aditivo de ração animal da invenção compreende pelo menos um dos componentes individuais especificados em Tabela A de WO 01/58275. Pelo menos um significa quer, um ou mais de, um, ou dois, ou três, ou quatro e assim por diante a até todos os treze, quer até todos os quinze componentes individuais. Mais especificamente, este pelo menos um componente individual está incluído no aditivo da invenção em uma tal quantidade de modo a fornecer uma concentração na razão dentro da faixa incida na coluna quatro, ou coluna cinco, ou coluna seis de Tabela A.

A presente invenção também se refere às composições de ração animal. Composições de dietas ou ração animal ou têm um teor de proteína relativamente alto. Dietas de aves domésticas e de porcos podem ser caracterizadas como indicado em Tabela B de WO 01/58275, colunas 2-3. Dietas de peixe podem ser caracterizadas como indicado na coluna 4 desta Tabela B. Ademais tais dietas de peixe costumeiramente têm um teor de gordura crua de 200-310 g/kg.

WO 01/58275 corresponde à US 09/779334 que é por meio desta aqui incorporada como referência.

Uma composição de ração animal de acordo com a invenção tem um teor de proteína crua de 50-800 g/kg, e adicionalmente compreende pelo menos um polipeptídeo como aqui reivindicado.

Ademais, ou alternativamente (ao teor de proteína crua indicado acima), a composição de ração animal da invenção tem um teor de

energia metabolizável de 10-30 MJ/kg; e/ou um teor de cálcio de 0,1-200 g/kg; e/ou um teor de fósforo disponível de 0,1-200 g/kg; e/ou um teor de metionina de 0,1-100 g/kg; e/ou um teor de metionina mais cisteína de 0,1-150 g/kg; e/ou um teor de lisina de 0,5-50 g/kg.

5 Em modalidades particulares, o teor de energia metabolizável, proteína crua, cálcio, fósforo, metionina, metionina mais cisteína, e/ou lisina está dentro de qualquer uma das faixas 2, 3, 4 ou 5 em Tabela B de WO 01/58275 (R. 2-5).

10 Proteína crua é calculada como nitrogênio (N) multiplicado por um fator 6,25, i.e. Proteína crua (g/kg) = N (g/kg) x 6,25. O teor de nitrogênio é determinado pelo método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, "Official Methods of Analysis" 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

15 Energia metabolizável pode ser calculada baseando -se em "NRC Publication Nutrient Requirements in Swine", "ninth revised edition" 1988, "subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council". National Academy Press, Washington, D.C., pp. 2-6, e a "European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs", Spelderholt Centre for Poultry Research and Extension, 7361 20 DA Beekbergen, Países-Baixos. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen by, Wageningen. ISBN 9071463-12-5.

25 O teor dietético de cálcio, aminoácidos e fósforo disponíveis em dietas animais completas é calculado baseando-se em tabelas de ração tais como "Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verterbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen", Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 9072839-13-7.

Em uma modalidade particular, a composição de ração animal da invenção contém pelo menos uma proteína. A proteína pode ser uma proteína animal, tal como proteína de carne, de farinha de osso, e/ou de

farinha de peixe; ou pode ser uma proteína vegetal. O termo proteínas vegetais como aqui usado refere-se a qualquer composto, composição, preparação ou mistura que inclui pelo menos uma proteína derivada ou originária de um vegetal, incluído proteínas modificadas e derivados de proteína. Em modalidades particulares, o teor de proteína das proteínas vegetais é pelo menos 10, 20, 30, 40, 50, ou 60% (p/p).

5 Proteínas vegetais podem ser derivadas de fontes de proteína vegetal, tais como legumes e cereais, por exemplo materiais de plantas das famílias Fabaceae (Leguminosae), Cruciferaceae, Chenopodiaceae, e Poaceae, 10 tais como farinha de feijão-soja, farinha de lupino e farinha de colza.

Em uma modalidade particular, a fonte de proteína vegetal é material de uma ou mais plantas da família Fabaceae, e.g. feijão-soja, lupino, ervilha, ou feijão.

15 Em outra modalidade particular, a fonte de proteína vegetal é material de uma ou mais plantas da família Chenopodiaceae, e.g. beterraba, beterraba-sacarina, espinafre ou quinoa.

Outros exemplos de fontes de proteína vegetal são colza, semente de girassol, semente de algodoeiro, e repolho.

20 Feijão-soja é uma fonte de proteína vegetal preferida.

Outros exemplos de fontes de proteína vegetal são cereais tais como cevada, trigo, centeio, aveia, milho (*Zea mays*), arroz, triticale, e sorgo.

25 Em ainda outras modalidades particulares, a composição de ração animal da invenção contém 0-80% de milho; e/ou 0-80% de sorgo; e/ou 0-70% de trigo; e/ou 0-70% de cevada; e/ou 0-30% de aveia; e/ou 0-40% de farinha de feijão-soja; e/ou 0-25% de farinha de peixe; e/ou 0-25% de farinha de carne e de osso; e/ou 0-20% de soro de leite.

Dietas animais podem e.g. ser manufaturadas como ração em pasta (não-pelotizada) ou ração pelotizada. Tipicamente, os ingredientes de ração moídos são misturados e quantidades suficientes de vitaminas e

minerais essenciais são adicionadas de acordo com as especificações para a espécie em questão. Polipeptídeos podem ser adicionados como formulações de polipeptídeo sólidas ou líquidas. Por exemplo, uma formulação de polipeptídeo sólida é tipicamente adicionada antes ou durante a etapa de misturação; e uma preparação de polipeptídeo líquida é tipicamente adicionada após a etapa de pelotização. O polipeptídeo também pode ser incorporado em uma pré-mistura ou em um aditivo de ração.

A concentração de polipeptídeo final na dieta está dentro da faixa de 0,01-200 mg de proteína de polipeptídeo por kg de dieta, por exemplo dentro da faixa de 5-30 mg de proteína de polipeptídeo por kg de dieta animal.

A fitase da invenção deve ser naturalmente aplicada em uma quantidade eficaz, i.e. em uma quantidade adequada para melhorar solubilização e/ou melhorar valor nutricional da ração. Presentemente é contemplado que o polipeptídeo é administrado em uma ou mais das seguintes quantidades (faixas de dosagem): 0,01-200; 0,01-100; 0,5-100; 1-50; 5-100; 10-100; 0,0550; ou 0,10-10 — todas estas faixas sendo em mg de proteína de polipeptídeo de fitase por kg de ração (ppm).

Para determinar mg de proteína de polipeptídeo de fitase por kg de ração, a fitase é purificada da composição de ração, e a atividade específica da fitase purificada é determinada usando um ensaio relevante. A atividade de fitase da composição de ração como tal também é determinada usando o mesmo ensaio, e baseando-se nestas duas determinações, a dosagem em mg de proteína de fitase por kg de ração é calculada.

Os mesmos princípios aplicam-se para a determinação de mg de proteína de polipeptídeo de fitase em aditivos de ração. Naturalmente, se está disponível uma amostra de uma fitase usada para preparar o aditivo ou a ração animal, a atividade específica é determinada desta amostra (sem necessidade de purificar a fitase do aditivo ou da composição de ração).

Métodos para produzir produtos e co-produtos de fermentação

Ainda outro aspecto da invenção presente invenção refere-se aos métodos para produzir um produto/co-produto de fermentação, tal como, e.g., etanol, cerveja, vinho, subproduto da produção de etanol à base de milho (grãos secos em destiladores (DDG)), sendo que a fermentação é realizada na presença de uma fitase da presente invenção. Exemplos de processos de fermentação incluem, por exemplo, os processos descritos em WO 01/62947. Fermentação é realizada usando um microorganismo de fermentação, tal como, levedura.

10 Em uma modalidade particular, a presente invenção proporciona métodos para produzir etanol, compreendendo fermentação (usando um microorganismo de fermentação, tal como levedura), um material contendo carboidrato (e.g., amido) na presença de uma fitase da presente invenção.

15 Em outra modalidade, a presente invenção fornece métodos para produzir etanol compreendendo hidrólise de amido, e.g., por um processo de liquefação e/ou sacarificação, um processo de amido bruto, fermentando o amido resultante na presença de uma fitase da presente invenção, e produzindo etanol.

20 A fitase pode ser adicionado no processo de fermentação em qualquer estágio adequado e em qualquer composição apropriada, incluindo sozinha ou em combinação com outras enzimas, tais como, uma ou mais alfaamilases, glicoamilases, proteases, celulases.

25 Em outra modalidade, a presente invenção fornece métodos para produzir etanol compreendendo hidrolisar biomassa, e fermentar a biomassa resultante na presença de uma fitase da presente invenção.

EXEMPLOS

Agentes químicos usados como tampões e substratos foram produtos comerciais de grau pelo menos reagente.

EXEMPLO 1: CLONAGEM E EXPRESSÃO DE FITASES DE BUTTIAUXELLA

Um alinhamento múltiplo foi feito das seguintes histidina fosfatases ácidas (HAP): appA *Escherichia coli* (SPTREMBL:Q8GN88), fitase *Citrobacter gillenii* DSM 13694 (geneseqp:aeh04533), fitase *Citrobacter amalonaticus* ATCC 25407 (geneseqp:aeh04535), fitase *Citrobacter braakii* (geneseqp:aeh04827), e ypo1648 *Yersinia pestis* CO92 (SPTREMBL:Q8ZFP6). Dois iniciadores de oligonucleotídeo degenerados foram planejados baseando-se nas sequências de consenso:

- 10 2123: 5'- CATGGTGTGCGNGCNCCNACNAA -3' (SEQ ID NO:9, iniciador direto)
 2065: 5'- CCCACCAGGNGGNGRTTTRTCNGGYTG -3' (SEQ ID NO:10, iniciador inverso),

15 sendo que Y designa T ou C, R designa A ou G, e N designa A, C, G ou T.

os iniciadores foram usados para triagem por PCR de numerosas espécies bacterianas em temperaturas de anelamento entre 40 e 50°C mas tipicamente como programa inoperante iniciando com 50°C e então reduzindo a temperatura de anelamento com 1°C para cada ciclo durante os 20 seguintes 10 ciclos antes de conduzir PCR padrão.

Um gene de fitase parcial na forma de um fragmento de PCR de aproximadamente 950 pb foi identificado em *Buttiauxella agrestis* DSM 18932.

25 O fragmento de PCR foi isolado de gel de agarose e o fragmento foi sequenciado usando os mesmos iniciadores de PCR como aqueles com os quais o fragmento foi gerado. Por tradução da sequência de nucleotídeos, foi confirmado que o fragmento de DNA fosse parte de um gene de fitase HAP.

Para obter a sequência de nucleotídeos de comprimento total

do gene, foi usado o DNA Walking SpeedUp Kit (DWSK-V102 de Seegene, Inc., 2nd Fl., Myungji Bldg., 142-21, Samsung-dong, Kangnam-gu, Seoul, 135-090, Coréia), que está projetado para capturar sítios alvo desconhecidos. Para este propósito, 4 oligonucleotídeos específicos foram projetados e usados

5 com o kit:

2138 TSP1 N: 5'- ATTGCGGAGCAAGCCCTG-3' (SEQ ID NO:11)
 2139 TSP2N: 5'- TCGCCAGTTAAGCGNGCG-3' (SEQ ID NO:12)
 2136 TSP1C: 5'- TGGAATATGCGCAAGGGATG -3' (SEQ ID NO:13)
 2137 TSP2C: 5'- TGGGGGTCAGAGCAAGAGTGGG-3' (SEQ ID NO:14)

10 A sequência de nucleotídeos de comprimento total codificadora de uma fitase de *Buttiauxella agrestis* DSM 18932 é mostrada na listagem de sequências como SEQ ID NO:5, e a sequência de aminoácidos codificada correspondendo tem SEQ ID NO:6. Os primeiros 33 aminoácidos de SEQ ID NO:6 (i.e. aminoácidos -33 a -1) são um peptídeo de sinal, como
 15 predito por Signal P V3.0 (veja www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/).

O mesmo alinhamento múltiplo descrito acima foi usado para projeto dos dois outros iniciadores de PCR de oligonucleotídeo degenerados:

5'- CGCGTGGTGATTGTGTCCMGNCAYGGNGT-3' (SEQ ID NO:15, iniciador direto)
 20 5'- CCAGGTTGGTATCATGGCCNGCDATRAA -3' (SEQ ID NO:16, iniciador inverso),

sendo que Y designa T ou C, M design A ou C, N designa A, C, G ou T, e R designa A ou G.

25 Os iniciadores foram usados para triagem por PCR de numerosas espécies bacterianas nas mesmas condições como descritas acima.

Genes de fitase parcial na forma de fragmentos de PCR de aproximadamente 900 pb foram identificados em *Buttiauxella gaviniae* DSM 18930 bem como em *Buttiauxella agrestis* DSM 18931.

Os dois fragmentos de PCR foram isolados do gel de agarose e

sequenciados usando iniciadores 1978 e 1979:

1978: 5'-CGCGTGGTGATTGTGTCC-3' (SEQ ID NO:17)

1979: 5'-CCAGGTTGGTATCATGGCC-3' (SEQ ID NO:18)

Pela tradução da sequência de nucleotídeos, foi confirmado que ambos os fragmentos de DNA foram amplificados por PCR a partir dos genes de fitase HAP.

Quatro novos iniciadores foram projetados para cada gene obtido da sequência de nucleotídeos de comprimento total do gene de acordo com as instruções dadas no DNA Walking SpeedUp Kit (DWSK-V102 de Seegene, Inc., 2^a Fl., Myungji Bldg., 142-21, Samsung-dong, Kangnam-gu, Seoul, 135-090, Coréia).

Os quatro iniciadores de PCR de oligonucleotídeo específicos projetados para o gene de fitase *Buttiauxella gaviniae* DSM 18930 foram:

2029 TSP1 N: 5'-AAGCTTCGCCAGTTAACAGCG-3' (SEQ ID NO:19)

2030 TSP2N: 5'-TTGAGTTGGTGTGGGGCAACTG-3' (SEQ ID NO:20)

2031 TSP1 C: 5'-TGGCAACAAAGTCGCTCTCG-3' (SEQ ID NO:21)

2032 TSP2C: 5'-TCCTGCTGGAATATGCGCAAGG-3' (SEQ ID NO:22)

Os quatro iniciadores de PCR de oligonucleotídeo específicos projetados para o gene de fitase *Buttiauxella agrestis* DSM 18931 foram:

2017 TSP1 N: 5'-TTCGCCCGTTAACAGCGT-3' (SEQ ID NO:23?)

2018 TSP1C: 5'-ACTGGCGTGCGATAAAATGCCG-3' (SEQ ID NO:24)

2019 TSP2N: 5'-TTTCCTGCTGGAATATGCGC-3' (SEQ ID NO:25)

2020 TSP2C: 5'-TTGATGGCGCGCACACCTTAC-3' (SEQ ID NO:26)

A sequência de nucleotídeos de comprimento total codificadora da fitase de *Buttiauxella gaviniae* DSM 18930 é mostrada na listagem de sequências como SEQ ID NO:1, e a sequência de aminoácidos correspondente tem SEQ ID NO:2. É esperado que os primeiros 33 aminoácidos de SEQ ID NO:2 (i.e. aminoácidos -33 a -1) sejam um peptídeo de sinal (predito por Signal P V3.0, veja www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/).

A sequência de nucleotídeos de comprimento total codificadora da fitase madura, bem como uma sequência de nucleotídeos de comprimento total codificadora do peptídeo de sinal de *Buttiauxella agrestis* DSM 18931 é mostrada na listagem de sequências como SEQ ID NO:3. A sequência de aminoácidos codificada correspondente tem SEQ ID NO:4. É esperado que os 9 aminoácidos de SEQ ID NO:4 (i.e. aminoácidos -9 a -1) sejam uma parte do peptídeo de sinal.

Os três genes de fitase foram expressados em *Bacillus subtilis* como segue:

A sequência codificadora de peptídeo de sinal de SEQ ID NO:7 (codificadora do peptídeo de sinal de SEQ ID NO:8 e derivada de uma protease de *Bacillus licheniformis*) foi fusionada por PCR em matriz no gene codificador da fitase madura de cada uma das três fitases em ordem seguida.

O DNA codificador da sequência codificadora resultante foi integrado por recombinação homóloga no genoma de célula hospedeira *Bacillus subtilis*. Os construtos de gene foram expressados sob o controle de um sistema de promotor triplo (como descrito em WO 99/43835), consistindo dos promotores de gene de alfa-amilase (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, gene de alfa-amilase (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, e promotor *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* incluindo gene estabilizador. O gene codificador de cloranfenicol acetiltransferase foi usado como marcador como descrito em, e.g., Diderichsen et al., "A useful cloning vector for *Bacillus subtilis*". Plasmid, 30, p. 312, 1993.

Para cada um dos três construtos, transformantes resistentes a cloranfenicol foram cultivados em meio PS-1 (10% de sacarose, 4% de farinha de feijão-soja, 1% de $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$, 0,5% de $CaCO_3$, e 0,01% de ácido plurônico), mantendo agitação a 250 RPM a 30°C. Após 2-5 dias de incubação os sobrenadantes foram removidos e a atividade de fitase foi identificada por aplicação de 20 μL do sobrenadante em orifícios de 4 mm de

diâmetro perfurados em placas de agarose-LSB 1% contendo acetato de sódio 0,1M pH 4,5 e 0,1% de ácido isonitol-hexa-fosfórico. As placas foram deixadas durante a noite a 37°C e um tampão consistindo de CaCl_2 0,25M e MES 500mM (ajustado para pH 6,5 com NaOH 4N) foi derramado sobre as placas. As placas foram deixadas na temperatura ambiente por 1 h e a atividade de inositol-fosfato fosfatase, ou fitase, foi então identificada como uma zona clara.

Vários transformantes positivos para fitase para cada um dos três construtos foram analisados por sequenciamento de DNA para garantir a sequência de DNA correta dos construtos. Um clone correto foi selecionado para cada um dos três construtos.

Exemplo 2: Fermentação e purificação de fitases de *Buttiauxella*

A cepa de *Bacillus subtilis* hospedando construto de fitase *Buttiauxella agrestis* DSM 18932 e capaz de expressar a fitase tendo SEQ ID NO:6 (parte madura) foi cultivada a 30°C e com 250rpm por 6 dias em meio SK-1M (caseinato de sódio (Miprodan 30 de Arla) 40g, Maltodextrina 01 (Glucidex 6, número de catálogo 332203 de Roquette), 200g, farinha de feijão-soja 50g, Dowfax 63N10 (um tensoativo não-iônico de Dow) 0,1ml, água de torneira para 1000 ml, tablete de CaCO_3 0,5g/100 ml).

A cepa de *Bacillus subtilis* hospedando construto de fitase *Buttiauxella agrestis* DSM 18931 e capaz de expressar a fitase tendo SEQ ID NO:4 (parte madura) foi cultivada a 30°C e com 250rpm por 5 dias no meio PS-1 que é descrito em Exemplo 1.

A cepa de *Bacillus subtilis* hospedando o construto de fitase *Buttiauxella gaviniae* DSM 18930 e capaz de expressar a fitase tendo SEQ ID NO:2 (parte madura) foi cultivada a 30°C e com 250 rpm por 5 dias no meio PS-1 que é descrito em Exemplo 1.

O sobrenadante de fermentação com a fitase de SEQ ID NO:2 foi primeiro centrifugado a 7200rpm e 5°C por 2 horas e filtrado através de

um filtro Fast PES Bottle Top com um corte de 0,22 μ m. A seguir, o sobrenadante filtrado foi pré-tratado como segue:

A solução de amostra foi lavada com água e concentrada usando uma unidade de ultrafiltração (Filtron, de Filtron Technology Corporation) equipada com uma membrana de ultrafiltração de corte de 10kDa.

Então pH foi ajustado para 5,0 com HCl 6M, o que causou uma precipitação menor. Este foi removido por centrifugação da amostra a 7200rpm por 20 minutos a 5°C. O sobrenadante, contendo a fitase, com adição de 2,5ml de acetato e sódio 1M pH 5,0 foi filtrado através do filtro PES Bottle Top com um corte de 0,22 μ m. Após isto o pH da solução medido foi 5,0 e a condutividade verificada foi 1,8mS/cm. Após pré-tratamento a fitase foi purificada por cromatografia em SP Sepharose, aox 85 mL em uma coluna XK26, usando como tampão A acetato de sódio 20mM pH 5,0, e como tampão B acetato de sódio 20 mM + NaCl 1 M pH 5,0.

As frações da coluna foram analisadas para atividade de fitase e frações com atividade foram reunidas.

A purificação da fitase de SEQ ID NO:4 foi realizada essencialmente como descrito acima, exceto que ácido acético 10% foi usado para ajustar o pH. De novo alguma precipitação foi observada e esta foi removida por centrifugação. O pH da solução medido foi 5,0, enquanto que a condutividade verificada foi aproximadamente 1,2mS/cm antes da etapa de cromatografia em coluna.

O sobrenadante de fermentação com a fitase de SEQ ID NO:6 foi primeiro centrifugado a 7200rpm e 5°C por uma hora e filtrado através de um sanduíche de quatro filtros de microfibra de vidro Whatman (2,7, 1,6, 1,2 e 0,7 micrômetros). Após isto a solução foi filtrada através de um filtro profundo Seitz-EKS usando pressão. Na solução foi adicionado sulfato de amônio sólido dando uma concentração final de 1,5M e o pH foi ajustado para

6,0 usando HCl 6M.

Uma solução contendo fitase foi aplicada em uma coluna de butil-sefarose, aproximadamente 50 mL em uma coluna XK26, usando como tampão A bis-tris 25mM + sulfato de amônio 1,5M pH 6,0, e como tampão B bis-tris 25mM pH 6,0. Contudo, a enzima não se ligou na coluna e quase toda a atividade foi verificada no fluxo através da coluna e nas frações de lavagem. O fluxo através da coluna e as frações de lavagem foram combinados e sulfato de amônio sólido foi adicionado em saturação a cerca de 80%. A solução foi deixada durante a noite a 5°C com o propósito de completar a precipitação. O precipitado foi isolado (nenhuma atividade foi encontrada no sobrenadante) e dissolvido em água Milli-Q. Esta solução foi dialisada contra água Milli-Q e o pH foi ajustado para 4,5.

Após isto a fitase foi purificada por cromatografia em S Sepharose, aproximadamente 150 mL em uma coluna XK26, usando como tampão A acetato de sódio 50mM pH 4,5, e como tampão B acetato de sódio 50mM + NaCl 1M pH 4,5.

As frações da coluna foram analisadas para atividade de fitase e frações com atividade foram reunidas. Finalmente, as frações com atividade de fitase foram concentradas usando um dispositivo de filtração Amicon ultra-15 com uma membrana de corte de 30kDa.

O peso molecular, conforme estimado de SDS-PAGE, foi aproximadamente 40 kDa para todas as três fitases e a pureza foi em todos os casos > 95%.

Exemplo 3: Ensaio de atividade de fitase

Atividade de fitase pode ser adequadamente determinada pelo seguinte ensaio:

75 microlitros de solução de enzima contendo fitase, apropriadamente diluídos em acetato de sódio 0,25M, Tween-20 0,005% (p/v), pH5,5, são dispensados para dentro de uma cavidade de placa de

microtípulo, e. g. NUNC 269620, e 75 microlitros de substrato são adicionados (preparados por dissolução de 100 mg de fitato de sódio de arroz (Número de Catálogo da Aldrich 274321) em 10ml de tampão acetato de sódio 0,25M, pH5,5). A placa é selada e incubada 15min. aditando com 5 750rpm a 37°C. Após incubação, 75 microlitros de reagente de interrupção são adicionados (o reagente de interrupção sendo preparado por misturação de 10 ml de solução de molibdato (10% (p/v) de hepta-molibdato de amônio em solução de amônia 0,25% (p/v)), 10ml de vanadato de amônio (produto comercial 0,24% de Bie&Berntsen, Número de Catálogo LAB17650), e 20ml 10 de ácido nítrico 21,7% (p/v)), e a absorbância a 405nm é medida em um espectrofotômetro de placa de microtípulo. A atividade de fitase é expressada na unidade de FYT, uma FYT sendo a quantidade de enzima que libera 1 micromol de orto-fosfato inorgânico por minuto sob as condições acima. Um valor absoluto para a atividade de fitase medida pode ser obtido por referência 15 a uma curva padrão preparada a partir de diluições apropriadas de fosfato inorgânico, ou por referência a uma curva padrão preparada a partir de diluições de uma preparação de enzima fitase com atividade conhecida (tal preparação de enzima padrão com uma atividade conhecida está disponível sob solicitação na Novozymes NS, Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd).

20 Exemplo 4: Atividade específica

A atividade específica das fitases de *Buttiauxella gaviniae* DSM 18930, *Buttiauxella agrestis* DSM 18931, e *Buttiauxella agrestis* DSM 18932 (tendo a sequência de aminoácidos das partes maduras de SEQ ID NO:2, 4 e 6, respectivamente) foi determinada em tampão acetato de sódio, 25 pH 5,5. As fitases foram elevadamente purificadas como descrito em Exemplo 2, i.e. apenas um componente foi identificado sobre um gel de SDS-poliacrilamida.

A concentração de proteína foi determinada por análise de aminoácido como segue: uma alíquota da amostra foi hidrolisada em HCl 6M,

fenol 0,1% por 16h a 110°C em um tubo de vidro evacuado. Os aminoácidos resultantes foram quantificados usando um sistema de análise de aminoácido Applied Biosystems 420A operado de acordo com as instruções do fabricante. Das quantidades dos aminoácidos a massa total - e assim também a concentração - de proteína na alíquota hidrolisada foi calculada.

A atividade de fitase foi determinada nas unidades de FYT como descrito em Exemplo 3, e a atividade específica foi calculada como a atividade de fitase medida em unidades FYT por mg de proteína enzima fitase.

As atividades específicas resultantes para as três fitases são mostradas em Tabela 2. A atividade específica foi determinada sobre fitato de sódio em pH 5,5 e 37°C.

Tabela 2

Fitase	Atividade específica (FYT/mg de proteína)
SEQ ID NO:2	700
SEQ ID NO:4	800
SEQ ID NO:6	650

A fitase de tipo selvagem (wt) de *Buttiauxella* P1-29 descrita em WO 2006/043178 tem uma atividade específica em pH 3,5 e 37°C de cerca de 300U/mg (veja Exemplo 10 desta publicação WO). De acordo com Exemplo 2 da mesma, a razão de atividades em pH 3,5 e pH 5,5 é cerca de 1,3, enquanto que de acordo com Fig. 2 (perfil de atividade em pH da fitase purificada) esta razão é mais propriamente 1,5. Em qualquer caso, quando a atividade específica é em pH3,5 cerca de 300 U/mg, a atividade específica é em pH5,5 não maior do que $300/1,3 = 231$ U/mg (pode ser mais propriamente $300/1,5 = 200$ U/mg).

WO 2006/043178, também revela uma fitase variante com uma atividade específica em pH4,0 e 37°C que é 115% da atividade específica da fitase de tipo selvagem (wt). Usando de novo Fig. 2, a atividade específica da fitase de tipo selvagem (wt) em pH 4,0 não é maior do que $80/60 \times 300$ U/mg = 400U/mg. A atividade específica em pH4,0 da variante é então $1,15 \times 400$ U/mg = 460U/mg, enquanto que em pH5,5 a atividade específica desta variante é aproximadamente $40/80 \times 460$ U/mg = 230U/mg

(de fato, 230 é precisamente 115% de 200 U/mg da fitase de tipo selvagem em pH 5,5, como calculado acima).

À parte da diferença de pH, que tem sido levada em consideração, as condições de ensaio de WO 2006/043178 são, para todos os 5 propósitos práticos, idênticas àquelas da presente invenção, exceto possivelmente pela presença em WO 2006/043178 de CaCl_2 0,8mM na mistura reacional. Contudo, temos testado a atividade das fitases de SEQ ID NOs:2, 4 e 6 no ensaio de Exemplo 3 incluindo ainda mais Ca^{2+} (a saber CaCl_2 1mM) mas não encontramos diferença.

10 Conformemente, as fitases da presente invenção têm uma atividade específica muito melhorada em pH 5,5 em comparação com as fitases reveladas em WO 2006/043178. De fato, a atividade específica das fitases da invenção está melhorada na faixa inteira de pH 3,5-5,5. Isto é evidente do Exemplo 6 abaixo, que mostra que para as fitases da invenção a 15 atividade nesta faixa é pelo menos tão alta quanto a atividade em pH 5,5.

EXEMPLO 5: PI

20 O ponto isoelétrico, pI, para as três fitases foi determinado usando geles isoeleticamente focalizadores (gel Novex pH 310 IEF de Invitrogen, número de catálogo EC6655A2) usados como descrito pelo fabricante. O pI para as fitases *Buttiauxella agrestis* DSM 18931 e DSM 18932 (SEQ ID NOs:4 e 6) é 7,4, enquanto que o pI para a fitase *Buttiauxella gaviniae* DSM 18930 (SEQ ID NO:2) é 7,6.

EXEMPLO 6: PERFIL DE pH

25 O perfil de pH (atividade de fitase como uma função de pH) das três fitases foi determinado na faixa de pH de 2,0 a 7,5 conforme determinado em Exemplo 3, exceto que um coquetel tampão (glicina 50mM, ácido acético 50mM e Bis-Tris (Bis-(2-hidróxi-etyl)-imino-tris(hidróxi-metil)-metano) 50mM) foi usado em vez de tampão acetato de sódio 0,25M pH 5,5.

Os resultados são mostrados em Tabela 3 abaixo, em relação

ao valor em pH ótimo para cada fitase (pH4,5).

Tabela 3: Atividade relativa de fitase versus pH

pH	Buttiauxella gaviniae DSM 18930 (SEQ ID NO:2)	Buttiauxella agrestis DSM 18931 (SEQ ID NO:4)	Buttiauxella noackiae DSM 18932 (SEQ ID NO:6)
2,0	37	41	40
2,5	46	49	49
3,0	66	65	66
3,5	83	86	78
4,0	96	99	99
4,5	100	100	100
5,0	92	91	83
5,5	70	70	69
6,0	38	43	39
6,5	11	14	14
7,0	-3	1	1
7,5	-5	-2	0

Em comparação com o perfil de atividade em pH da fitase de tipo selvagem (wt) de *Buttiauxella* P1-29 descrito em WO 2006/043178 (veja sua Fig. 2), as fitases da invenção parecem ter uma atividade relativa mais alta em valores de pH tanto bem mais baixos quanto bem mais altos (em pH2,0 e pH6,0 a atividade das fitases da presente invenção é duas vezes, e oito vezes mais alta, respectivamente, em comparação com a fitase de tipo selvagem *Buttiauxella* P1-29).

10 EXEMPLO 7: ESTABILIDADE EM PH

A estabilidade em pH das fitases purificadas de SEQ ID NOS:2 e 4 a 40°C foi determinada por medição da atividade residual de fitase após incubação a 40°C e em vários valores de pH por 1,5 e 24 horas. As fitases foram incubadas em glicina 0,1M, ácido acético 0,1M, Bis-Tris 0,1M, ajustadas para o pH desejado. Amostras das misturas de incubação respectivas foram tiradas após 0, 1,5 e 24 horas, o pH das amostras foi ajustado para 5,5 por diluição em acetato de sódio 0,25M, Tween20 0,005% (p/v), pH 5,5, e a atividade residual em pH5,5 foi determinada usando o método descrito em Exemplo 3. Os resultados, normalizados para a atividade encontrada a 0 hora, 15 são mostrados em Tabela 4 abaixo.

TABELA 4: ESTABILIDADE EM PH A 40°C

pH	Buttiauxella gaviniae (SEQ ID NO:2)	Buttiauxella agrestis (SEQ ID NO:4)	pH	Buttiauxella gaviniae (SEQ ID NO:2)	Buttiauxella agrestis (SEQ ID NO:4)
1,5 horas			24 horas		
2,0	77	83	2,0	51	56
3,0	74	85	3,0	66	66
4,0	81	95	4,0	77	88
5,0	80	68	5,0	78	67
6,0	82	67	6,0	76	67
7,0	79	75	7,0	76	73
8,0	80	74	8,0	77	70

Ambas fitases são muito estáveis por 1,5 horas na faixa inteira de pH 2,0-8,0, enquanto que quando incubadas por 24 horas é observada uma certa perda de atividade em valores de pH menores (pH 2,0-3,0).

5 EXEMPLO 8: PERFIL DE TEMPERATURA

Um perfil de temperatura (atividade de fitase como uma função da temperatura) das três fitases foi determinado em uma faixa de temperatura de 20-90°C essencialmente como descrito em Exemplo 3, contudo, as reações enzimáticas (100 microlitros de solução contendo enzima fitase + 100 microlitros de substrato) foram realizadas em tubos de PCR em vez de placas de microtípulo. Após um período de reação de 15 minutos na temperatura desejada os tubos foram esfriados para 20°C por 20 segundos e 150 microlitros da mistura reacional foram transferidos para uma placa de microtípulo. 75 microlitros de reagente de interrupção foram adicionados e a absorbância a 405 nm foi medida em um espectrofotômetro de placa de microtípulo.

Os perfis de temperatura para as fitases de SEQ ID NOS:2 e 4 foram determinados em pH4,0 (acetato de sódio 0,25M), enquanto que um perfil de temperatura para a fitase de SEQ ID NO:6 foi determinado em pH5,5 (acetato de sódio 0,25M).

Os resultados são mostrados em Tabela 5 abaixo, para cada fitase em relação à atividade na temperatura ótima.

TABELA 5: PERFIL DE TEMPERATURA EM PH 4,0/5,5

Temperatura (°C)	20	30	40	50	60	70	80	90
SEQ ID NO:2	21	36	43	75	100	23	9	6
SEQ ID NO:4	24	40	54	82	100	17	8	7
SEQ ID NO:6	22	32	50	74	100	14	8	3

Todas as fitases parecem ter uma temperatura ótima de cerca de 60°C, são razoavelmente ativas em uma faixa de temperatura de 30-60°C, e também mostram uma atividade decente a 20°C bem como a 70°C. Na faixa de 80-90°C a atividade é insignificante.

DEPÓSITO DE MATERIAL BIOLÓGICO

O seguinte material biológico tem sido depositado sob os termos do Tratado de Budapeste em DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Inhoffenstrasse 7 B, D-38124

Braunschweig, Alemanha, e recebido os seguintes números de acesso:

Depósito	Número de Acesso	Data de Depósito
Buttiauxella gaviniae	DSM 18930	15-JAN-2007
Buttiauxella agrestis	DSM 18931	15-JAN-2007
Buttiauxella agrestis	DSM 18932	15-JAN-2007

As cepas têm sido depositadas sob condições que garantem que o acesso à cultura estará disponível durante a pendência deste pedido de patente a uma pessoa determinado pelo Commissioner of Patents and Trademarks a ser qualificada ao mesmo sob 37 C.F.R. §1,14 e 35 U.S.C. §122. Os depósitos representam culturas substancialmente puras das cepas depositadas. Os depósitos estão disponíveis de acordo com o que é exigido pelas leis de patente estrangeiras em países nos quais as contra-partes do presente pedido ou sua progênie estão depositadas. Contudo, deve ser entendido que a disponibilidade de um depósito não constitui uma licença para praticar a presente invenção em derrogação dos direitos de patente concedidos pela ação governamental.

As cepas acima foram isoladas de amostras coletadas em Dinamarca em 2005.

A invenção aqui descrita e reivindicação não é para ser limitada em escopo pelos aspectos específicos aqui revelados, porque estes

aspectos são intencionados como ilustrações de vários aspectos da invenção.

Quaisquer aspectos equivalentes são intencionados para estarem dentro do escopo desta invenção. De fato, várias modificações da invenção em adição àquelas aqui mostradas e descritas se tornarão evidentes para aquelas pessoas experientes na técnica a partir da descrição anteriormente citada. Tais modificações também são intencionadas para caírem dentro do escopo das reivindicações anexadas. No caso de conflito, a presente revelação incluindo definições controlará.

Várias referências são aqui citadas, cujas revelações são incorporadas como referências em suas totalidades.

TABELA DE MICROORGANISMO

Impressão (Original em Formulário Eletrônico)

(Esta folha não é parte do e não conta como uma folha do pedido internacional)

0-1	Formulário PCT/RO/134 (SAFE) Indicações relativas ao(s) microorganismo(s) ou outro material biológico depositado(s) (Regra 13bis do PCT)	
0-1-1	Preparado usando	DEPÓSITO PCT ONLINE Version 3.5.000.193 MT/FOP 20020701/0.20.5.9
0-2	Nº do pedido internacional	
0-3	Referência do arquivo do Requerente ou do Agente	10991.204 - WO
1	As indicações feitas abaixo referem-se ao(s) microorganismo(s) ou outro material biológico referidos no relatório na:	
1-1	Página	49
1-2	Linha	8
1-3	Identificação do depósito	
1-3-1	Nome da instituição depositária	DSMZ DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Endereço da instituição depositária	Mascheroder Weg 1b, D- 38124 Braunschweig, Alemanha
1-3-3	Data de depósito	15 de janeiro de 2007 (15.01.2007)
1-3-4	Número de acesso	DSMZ DSMZ 18930
1-5	Estados designados para que indicações sejam feitas	Todas as designações
2	As indicações feitas abaixo referem-se ao(s) microorganismo(s) ou outro material biológico referidos no relatório na:	
2-1	Página	49
2-2	Linha	9
2-3	Identificação do depósito	
2-3-1	Nome da instituição depositária	DSMZ DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
2-3-2	Endereço da instituição depositária	Mascheroder Weg 1b, D- 38124 Braunschweig, Alemanha
2-3-3	Data de depósito	15 de janeiro de 2007 (15.01.2007)
2-3-4	Número de acesso	DSMZ DSMZ 18931
2-5	Este formulário foi recebido pelo escritório internacional em:	Todas as designações

Impressão (Original em Formulário Eletrônico)

(Esta folha não é parte do e não conta como uma folha do pedido internacional)

3	As indicações feitas abaixo referem-se ao(s) microorganismo(s) ou outro material biológico referidos no relatório na:	
3-1	Página	49
3-2	Linha	10
3-3	<u>Identificação do depósito</u>	
3-3-1	Nome da instituição depositária	DSMZ DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
3-3-2	Endereço da instituição depositária	Mascheroder Weg 1b, D- 38124 Braunschweig, Alemanha
3-3-3	Data de depósito	15 de janeiro de 2007 (15.01.2007)
3-3-4	Número de acesso	DSMZ DSMZ 18932
3-5	Estados designados para que indicações sejam feitas	Todas as designações

SOMENTE PARA USO DO ESCRITÓRIO RECEBEDOR

0-4	Este formulário foi recebido com o pedido Internacional (Sim ou não)	
0-4-1	Funcionário Autorizado	

SOMENTE PARA USO DO ESCRITÓRIO INTERNACIONAL

0-5	Este formulário foi recebido pelo Escriptório Internacional em:	
0-5-1	Funcionário Autorizado	

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> Novozymes A/S

<120> "POLIPEPTÍDEOS TENDO ATIVIDADE DE FITASE E POLINUCLEOTÍDEOS CODIFICANDO OS MESMOS"

<130> 10991.204-WO

<160> 26

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1341

<212> DNA

<213> *Buttiauxella gaviniae* DSM18930

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1338)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(99)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (100)..(1338)

<400> 1

atg acg atc tct gcg ttt aac cac aaa aaa ctg acg ctt cac cct ggt
Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Hé Lys Lys Leu Thr Leu Hé Pro Gly

-30

-25

-20

48

ctg ttc gta gca ctg agc gcc ata ttt tca tta ggc tct acg gca tat
Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
-15 -10 -5

96

gcc aat gac act ccc gct tca ggc tac cag gtt gaa aaa gtg gtt atc
Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
-1 1 5 10 15

44

ctc agc cgc cac ggt gtg cga gcc ccc acc aaa atg aca cag act atg
Leu Ser Arg Hé Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
20 25 30

192

cgc gac gta aca ccc aat acc tgg cca gaa tgg cca gta aaa ctg ggt
Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
35 40 45

240

tat atc acg cca cgc ggt gag cat ctg att agc ctg atg ggc ggg ttt
Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu Hé Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
50 55 60

288

tat cgc gag aag ttt caa caa cag ggc att tta tcg cag ggc agt tgc
Tyr Arg Glu Lys Phe Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys

336

65	70	75	
ccc aca cca aac tca att tat gtc tgg gca gac gtt gat cag cgc acg Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr	80	85	90 95
ctt aaa act ggc gaa gct ttc ctg gca ggg ctt gct ccg caa tgt ggt Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly	100	105	110
tta act att cac cac caa cag aat ctt gaa aaa gcc gat ccg ctg ttc Leu Thr Ile Hé Hé Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe	115	120	125
cat ccg gtg aaa gcg ggc acc tgt tca atg gat aaa act ccg ctc caa Hé Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Arg Leu Gln	130	135	140
cag gcc gtt gaa aaa gaa gct caa acg ccc att gag aat ctg aac cag Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Glu Asn Leu Asn Gln	145	150	155
cac tat att ccc tct ctg gct ttg atg aac acg acc ctc aac ttt tcg Hé Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser	160	165	170 175
acg tct gcc tgg tgt cag aaa cac agc gcg gat aaa agc tgt gat tta Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys Hé Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu	180	185	190
gcg caa tcc atg ccg agc aag ctg tcg ata aaa gat aat ggc aac aaa Ala Gln Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys	195	200	205
gtc gct ctc gat ggg gct gtt ggt ctt tca tcc act ctt gct gaa att Val Ala Leu Asp Gly Ala Val Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile	210	215	220
ttc ctg ctg gaa tat gcg caa ggg atg ccg caa gcg gcc tgg ggg aag Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Lys	225	230	235
att cat tca gag caa gat tgg gcg gag ttg ctg aaa ctg cat aac gcc Ile Hé Ser Glu Gln Asp Trp Ala Glu Leu Leu Lys Leu Hé Asn Ala	240	245	250 255
cag ttt gat ttg atg gcg cgc aca cct tat atc gcc aga cat aac gga Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg Hé Asn Gly	260	265	270
acg cct tta ttg cag gcc atc agc aac gcg ctg gac cca aac gcc acc Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asp Pro Asn Ala Thr	275	280	285
gca agc aag ctg cct gat atc tcg ccg gac aat aag atc ctg ttt att Ala Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile	290	295	300

gcc gga cac gat acc aat atc gcc aac atc tca ggc atg ctc aac atg Ala Gly Hé Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ser Gly Met Leu Asn Met	305	310	315	1056
cgc tgg acg cta ccc gga caa cca gat aac act cct cca ggc ggc gct Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala	320	325	330	335
ttg atc ttt gaa cgc ctg gct gat aaa gct ggg aaa caa tat gtt agt Leu Ile Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ala Gly Lys Gln Tyr Val Ser	340	345	350	1152
gtg agt atg gtg tat cag aca ctc gag cag ttg cgc gct caa aca ccg Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ala Gln Thr Pro	355	360	365	1200
ctt agc ctt aag gaa ccc gca gga agt gtg cag cta aaa att cct ggc Leu Ser Leu Lys Glu Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly	370	375	380	1248
tgt aat gac cag acg gct gaa gga tat tgc ccg ctg cca aca ttt aaa Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Pro Thr Phe Lys	385	390	395	1296
cgc gtg gtt agc caa agt gaa gaa ccg ggc tgc cag cta cag taa Arg Val Val Ser Gln Ser Glu Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln	400	405	410	1341
<210> 2				
<211> 446				
<212> PRT				
<213> <i>Buttiauxella gaviniae</i> DSM18930				
<400> 2				
Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Hé Lys Lys Leu Thr Leu Hé Pro Gly	-30	-25	-20	
Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr	-15	-10	-5	
Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile	-1	5	10	15
Leu Ser Arg Hé Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met	20	25	30	
Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly	35	40	45	
Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu Hé Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe	50	55	60	
Tyr Arg Glu Lys Phe Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys	65	70	75	
Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr	80	85	90	95

Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly
 100 105 110

Leu Thr Ile Hé Hé Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 115 120 125

Hé Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Arg Leu Gln
 130 135 140

Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Glu Asn Leu Asn Gln
 145 150 155

Hé Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 160 165 170 175

Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys Hé Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 180 185 190

Ala Gln Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys
 195 200 205

Val Ala Leu Asp Gly Ala Val Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 210 215 220

Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Lys
 225 230 235

Ile Hé Ser Glu Gln Asp Trp Ala Glu Leu Leu Lys Leu Hé Asn Ala
 240 245 250 255

Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg Hé Asn Gly
 260 265 270

Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asp Pro Asn Ala Thr
 275 280 285

Ala Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 290 295 300

Ala Gly Hé Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ser Gly Met Leu Asn Met
 305 310 315

Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 320 325 330 335

Leu Ile Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ala Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 340 345 350

Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ala Gln Thr Pro
 355 360 365

Leu Ser Leu Lys Glu Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 370 375 380

Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Pro Thr Phe Lys
 385 390 395

Arg Val Val Ser Gln Ser Glu Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 400 405 410

<210> 3

<211> 1271

<212> DNA

<213> *Buttiauxella agrestis* DSM18931

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(1268)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (3)..(29)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (30)..(1268)

<400> 3

ca ttt tca tta ggt tta acg gca tat gcc agc gac act ccc gct tca
 Phe Ser Leu Gly Leu Thr Ala Tyr Ala Ser Asp Thr Pro Ala Ser
 -5 -1 1 5

47

ggc tac cag att gaa aaa gtg gta ata ctc agc cgc cac ggt gtg cga
 Gly Tyr Gln Ile Glu Lys Val Val Ile Leu Ser Arg Hé Gly Val Arg
 10 15 20

95

gca ccc acc aaa atg aca cag acc atg cgc gac gta aca ccc aat tcc
 Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met Arg Asp Val Thr Pro Asn Ser
 25 30 35

143

tgg ccc gaa tgg ccg gta aaa ttg ggt tat atc acg cca cgc ggt gag
 Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu
 40 45 50

191

cat ctg att agc ctg atg ggc ggg ttt tat cgc cag aag ttt caa caa
 Hé Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln
 55 60 65 70

239

aag ggc att tta tcg cag ggc agt tgc ccc aca cca aac tca att tat
 Lys Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr
 75 80 85

287

gtc tgg gca gac gtt gat cag cgc acg ctt aaa acg ggc gaa gct ttc
 Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe
 90 95 100

335

ctg gca ggg ctt gct ccg caa tgt ggt tta act att cac cac cag cag
 Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly Leu Thr Ile Hé Hé Gln Gln
 105 110 115

383

aat ctt gaa aaa gcc gat ccg ctg ttc cat ccg gtg aaa gcg ggc acc Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe Hé Pro Val Lys Ala Gly Thr 120 125 130	431
tgt tca atg gat aaa act caa gtc cag cag gcc gtt gaa aaa gaa gct Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala 135 140 145 150	479
caa atg ccc att gag aat ctg aac cag cac tat att ccc tct ctg gcc Gln Met Pro Ile Glu Asn Leu Asn Gln Hé Tyr Ile Pro Ser Leu Ala 155 160 165	527
ttg atg aac acg act ctc aac ttt tcg acg tct gcc tgg tgc cag aaa Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys 170 175 180	575
cac agc gcg gat aaa agc tgt gat tta gcg caa tcc atg ccg agc aag Hé Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu Ala Gln Ser Met Pro Ser Lys 185 190 195	623
ctg tcg ata aaa gat aat ggc aac aaa gtc gct ctt gat ggg gcc att Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile 200 205 210	671
ggc ctt tcg tct acg ctt gct gaa att ttc ctg ctg gaa tat gcg caa Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln 215 220 225 230	719
ggg atg ccg caa gcg gcg tgg ggg aat att cat tca gag caa gag tgg Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn Ile Hé Ser Glu Gln Glu Trp 235 240 245	767
gcf tcg cta ttg aaa ctg cat aac acc cag ttt gat ttg atg gcf cgc Ala Ser Leu Leu Lys Leu Hé Asn Thr Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg 250 255 260	815
aca cct tac atc gcc gca cat aac gga acg ccg tta ttg cag acc atc Thr Pro Tyr Ile Ala Ala Hé Asn Gly Thr Pro Leu Leu Gln Thr Ile 265 270 275	863
agc aac gcg ctg gag ccg aaa gcc gac gta agc aaa ctg cct gat atc Ser Asn Ala Leu Glu Pro Lys Ala Asp Val Ser Lys Leu Pro Asp Ile 280 285 290	911
tca tct gac aat aag atc ctg ttt att gcc gga cac gat acc aat att Ser Ser Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile Ala Gly Hé Asp Thr Asn Ile 295 300 305 310	959
gcc aat atc gca ggc atg ctc aac atg cgc tgg acg cta cca ggg caa Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln 315 320 325	1007
ccc gat aac acc cca ccg ggc ggc gct tta gtc ttt gag cgt ttg gcc Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala 330 335 340	1055

gat aag tca ggg aaa caa tat att agc gtg agc atg gtg tat cag act 1103
 Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Ile Ser Val Ser Met Val Tyr Gln Thr
 345 350 355

ctt gag cag ttg cgc gct caa aca cca ctt agc ctt aat gaa cca gcg 1151
 Leu Glu Gln Leu Arg Ala Gln Thr Pro Leu Ser Leu Asn Glu Pro Ala
 360 365 370

ggt agc gta cag cta aaa att cct ggc tgt aac gac cag acg gct gaa 1199
 Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu
 375 380 385 390

gga tac tgc cca ctg tcg acg ttc aca cgc gtg gtt agc caa agc gtg 1247
 Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr Arg Val Val Ser Gln Ser Val
 395 400 405

gaa cca ggc tgc cag cta ccg taa 1271
 Glu Pro Gly Cys Gln Leu Pro
 410

<210> 4

<211> 422

<212> PRT

<213> *Buttiauxella agrestis* DSM18931

<400> 4
 Phe Ser Leu Gly Leu Thr Ala Tyr Ala Ser Asp Thr Pro Ala Ser Gly
 -5 -1 1 5

Tyr Gln Ile Glu Lys Val Val Ile Leu Ser Arg Hé Gly Val Arg Ala
 10 15 20

Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met Arg Asp Val Thr Pro Asn Ser Trp
 25 30 35

Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu Hé
 40 45 50 55

Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Lys
 60 65 70

Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val
 75 80 85

Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu
 90 95 100

Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly Leu Thr Ile Hé Hé Gln Gln Asn
 105 110 115

Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe Hé Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys
 120 125 130 135

Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln
 140 145 150

Met Pro Ile Glu Asn Leu Asn Gln Hé Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu
 155 160 165

Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys Hé
 170 175 180

Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu Ala Gln Ser Met Pro Ser Lys Leu
 185 190 195

Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly
 200 205 210 215

Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly
 220 225 230

Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn Ile Hé Ser Glu Gln Glu Trp Ala
 235 240 245

Ser Leu Leu Lys Leu Hé Asn Thr Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr
 250 255 260

Pro Tyr Ile Ala Ala Hé Asn Gly Thr Pro Leu Leu Gln Thr Ile Ser
 265 270 275

Asn Ala Leu Glu Pro Lys Ala Asp Val Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser
 280 285 290 295

Ser Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile Ala Gly Hé Asp Thr Asn Ile Ala
 300 305 310

Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro
 315 320 325

Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp
 330 335 340

Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Ile Ser Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu
 345 350 355

Glu Gln Leu Arg Ala Gln Thr Pro Leu Ser Leu Asn Glu Pro Ala Gly
 360 365 370 375

Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly
 380 385 390

Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu
 395 400 405

Pro Gly Cys Gln Leu Pro
 410

<210> 5
 <211> 1341
 <212> DNA
 <213> *Buttiauxella agrestis* DSM18932

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1338)

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(99)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (100)..(1338)

<400> 5
 atg acg ttc tct gcg ttt aac cgc aaa aaa ctg acg ctt cac cct ggt
 Met Thr Phe Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu Hé Pro Gly
 -30 -25 -20

48

ctg ttc gta gca ctg agc gcc ata ttt tca tta ggc tct acg gcc tat
 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 -15 -10 -5

96

gcc aac gac act ccc gct tca ggc tac cag gtt gaa aaa gtg gta atc
 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 -1 1 5 10 15

144

ctc agc cgc cac ggg gtg cga gca ccc acc aaa atg aca cag acc atg
 Leu Ser Arg Hé Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 20 25 30

192

cgc gac gta aca ccc aat acc tgg ccc gaa tgg cca gta aaa ttg ggt
 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 35 40 45

240

tat atc acg cca cgc ggt gag cat ctg att agc ctg atg ggc ggg ttt
 Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu Hé Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 50 55 60

288

tat cgc gag aag ttt caa caa cag ggc att tta tcg cag ggc agt tgc
 Tyr Arg Glu Lys Phe Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 65 70 75

336

ccc gca cca aac tca att tat gtc tgg gca gac gtt gat cag cgc acg
 Pro Ala Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 80 85 90 95

384

ctt aaa act ggc gaa gct ttc ctg gca ggg ctt gct ccg caa tgt ggt
 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly
 100 105 110

432

tta act att cac cac cag cag aat ctt gaa aaa gcc gat ccg ctg ttc
 Leu Thr Ile Hé Hé Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 115 120 125

480

cat ccg gtg aaa gcg ggc acg tgt tca atg gat aaa act cag gtc caa	528
Hé Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln	
130 135 140	
cag gcc gtt gaa aaa gaa gct caa acc ccc att gat aat ctg aat cag	576
Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln	
145 150 155	
cac tat att ccc tct ctg gcc ttg atg aac acg acc ctc aac ttt tcg	624
Hé Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser	
160 165 170 175	
acg tct gcc tgg tgt cag aaa cac agc gcg gat aaa agc tgt gat tta	672
Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys Hé Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu	
180 185 190	
gcg caa tcc atg ccg agc aag ctg tcg ata aaa gat aat ggc aac aaa	720
Ala Gln Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys	
195 200 205	
gtc gct ctc gac ggg gcc att ggc ctt tcg tct acg ctt gct gaa att	768
Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile	
210 215 220	
ttc ctg ctg gaa tat gcg caa ggg atg ccg caa gcg gcg tgg ggg aat	816
Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn	
225 230 235	
att cat tca gag caa gag tgg gcg tcg cta ctg aaa ctg cat aac gcc	864
Ile Hé Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu Hé Asn Ala	
240 245 250 255	
cag ttt gat ttg atg gcg cgc aca cct tac atc gcc aca cat aac ggc	912
Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Thr Hé Asn Gly	
260 265 270	
acg cct tta ttg cag acc atc agc aac gcg ctg gag ccg aaa gcc gac	960
Thr Pro Leu Leu Gln Thr Ile Ser Asn Ala Leu Glu Pro Lys Ala Asp	
275 280 285	
gta agc aaa ctg cct ggt atc tca cct gac aat aag atc ctg ttt ctt	1008
Val Ser Lys Leu Pro Gly Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Leu	
290 295 300	
gcc ggg cac gat acc aat att gcc aat atc gca ggc atg ctc aac atg	1056
Ala Gly Hé Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met	
305 310 315	
cgc tgg acg cta cca ggg caa ccc gat aac acc cct ccg ggc ggc gct	1104
Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala	
320 325 330 335	
tta gtc ttt gag cgt ttg gcc gat aag tca ggg aaa caa tat gtt agc	1152
Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser	
340 345 350	

gtg agc atg gtg tat cag act ctc gag cag ttg cga tcc caa aca cca 1200
 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 355 360 365

ctt agc ctt aat caa cct gcg gga agc gtt cag cta aaa att cct ggc 1248
 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 370 375 380

tgt aac gac cag acg gct gaa gga tac tgc cca ctg tcg aca ttc aca 296
 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 385 390 395

cgc gtg gtt agc caa agc gtg gaa ccc ggc tgc cag cta cag taa 1341
 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 400 405 410

<210> 6
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> *Buttiauxella agrestis* DSM18932

<400> 6
 Met Thr Phe Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu Hé Pro Gly
 -30 -25 -20

Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 -15 -10 -5

Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 -1 5 10 15

Leu Ser Arg Hé Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 20 25 30

Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 35 40 45

Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu Hé Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 50 55 60

Tyr Arg Glu Lys Phe Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 65 70 75

Pro Ala Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 80 85 90 95

Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly
 100 105 110

Leu Thr Ile Hé Hé Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 115 120 125

Hé Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln
 130 135 140

Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln
 145 150 155

Hé Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 160 165 170 175

Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys Hé Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 180 185 190

Ala Gln Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys
 195 200 205

Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 210 215 220

Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn
 225 230 235

Ile Hé Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu Hé Asn Ala
 240 245 250 255

Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Thr Hé Asn Gly
 260 265 270

Thr Pro Leu Leu Gln Thr Ile Ser Asn Ala Leu Glu Pro Lys Ala Asp
 275 280 285

Val Ser Lys Leu Pro Gly Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Leu
 290 295 300

Ala Gly Hé Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met
 305 310 315

Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 320 325 330 335

Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 340 345 350

Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 355 360 365

Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 370 375 380

Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 385 390 395

Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 400 405 410

<210> 7
 <211> 81
 <212> DNA

<213> Bacillus lichenifoumé

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(81)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(81)

<400> 7

atg aag aaa ccg ttg ggg aaa att gtc gca agc acc gca cta ctc att
Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
1 5 10 15

48

tct gtt gct ttt agt tca tcg atc gca tcg gct
Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala
20 25

81

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> Bacillus lichenifoumé

<400> 8

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
1 5 10 15

Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala
20 25

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 2123

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n é a, c, g, ou t

<400> 9
 catgggtgtgc gngcncnac naa

23

<210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador 2065

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Y significa T ou C; R significa A ou G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n é a, c, g, ou t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n é a, c, g, ou t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n é a, c, g, ou t

<400> 10
 cccaccaggn ggngtrttt cnggytg

27

<210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador 2138

<400> 11
 attgcggagc aagccctg

18

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
<223> Iniciador 2139

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 12
tcgccagttt taagcgngcg

20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador 2136
<400> 13tggaatatgc gcaaggatg

20

<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador 2137

<400> 14
tgggggtcag agcaagatg gg

22

<210> 15
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador 315

<220>
<221> misc_feature
<223> Y significa T ou C; M significa A ou C

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 15

cgctggta ttgtgtccmg ncayggngt

29

<210> 16
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador 316

<220>
 <221> misc_feature
 <223> R significa A ou G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n é a, c, g, ou t

<400> 16
 ccaggttgt atcatggccn gcdatrraa

28

<210> 17
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador 1978

<400> 17
 cgctggta ttgtgtcc

18

<210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador 1979

<400> 18
 ccaggttgt atcatggcc

19

<210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador 2029

<400> 19
 aagcttcgcc agtttaagc g

21

<210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador 2030

<400> 20
 ttgagtttgg tgtggggcaa ctg

23

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador 2031

<400> 21
 tggcaacaaa gtcgctctcg

20

<210> 22
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador 2032

<400> 22
 tcctgctgga atatgcgcaa gg

22

<210> 23
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador 2017

<400> 23
 ttcgcccgtt ttaagcgtg

19

<210> 24
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador 2018

<400> 24
 actgcctgc gataaaatgc cc

22

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador 2019

<400> 25
tttcctgctg gaatatgcgc

20

<210> 26
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador 2020

<400> 26
ttgatggcgc gcacacacctta c

21

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo tendo atividade de fitase e tendo uma sequência de aminoácido, caracterizado pelo fato de que:

5 a) tem pelo menos 70% de identidade com aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e/ou aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6 quando alinhado com a respectiva sequência de aminoácidos usando o programa de Needle com a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade aberta de lacuna de 10,0, e uma penalidade de extensão de lacuna de 0,5; e

10 b) comprehende pelo menos um dos seguintes aminoácidos na posição indicada: 119N, 120L, e/ou 121E, quando alinhado como descrito em a) com aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2 e usando uma numeração de resíduo de aminoácido correspondendo aos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2.

15 2. Polipeptídeo tendo atividade de fitase e tendo uma sequência de aminoácido, caracterizado pelo fato de que:

20 a) tem pelo menos 70% de identidade com aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e/ou aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6 quando alinhado com a respectiva sequência de aminoácidos usando o programa de Needle com a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade aberta de lacuna de 10,0, e uma penalidade de extensão de lacuna de 0,5; e

25 b) comprehende pelo menos um dos seguintes aminoácidos na posição indicada: 109Q, 111G, 119N, 120L, e/ou 121E, quando alinhado como descrito em a) com aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2 e usando uma numeração de resíduo de aminoácido correspondendo aos aminoácidos 1413 de SEQ ID NO:2.

3. Polipeptídeo tendo atividade de fitase e tendo uma sequência de aminoácido, caracterizado pelo fato de que:

5 a) tem pelo menos 78% de identidade com aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e/ou aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6 quando alinhado com a respectiva sequência de aminoácidos usando o programa de Needle com a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade aberta de lacuna de 10,0, e uma penalidade de extensão de lacuna de 0,5; e

10 10 b) comprehende pelo menos um dos seguintes aminoácidos na posição indicada: 109Q, 111G, 119N, 120L, 121E, e/ou 193Q, quando alinhado como descrito em a) com aminoácidos 1413 de SEQ ID NO:2 e usando uma numeração de resíduo de aminoácido correspondendo aos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2.

4. Polipeptídeo tendo atividade de fitase e tendo uma sequência de aminoácido, caracterizado pelo fato de que:

15 a) tem pelo menos 78% de identidade com aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, e/ou aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6 quando alinhado com a respectiva sequência de aminoácidos usando o programa de Needle com a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade aberta de lacuna de 10,0, e uma penalidade de extensão de lacuna de 0,5; e

20 b) comprehende pelo menos um dos seguintes aminoácidos na posição indicada: 1S, 10I, 38S, 66E, 71K, 81A, 109Q, 111G, 119N, 120L, 121E, 141R, 142L, 152M, 155E, 193Q, 214V, 239K, 245D, 248E, 255A,T, 268A,T, 277T, 283D,E, 285K, 287D, 288A,V, 293G, 296S, 303L, 314A, 337I, 345A, 350I, 364A, 371K, 372E, 396P, 399K, 406E, e/ou 413P, ou pelo menos um dos seguintes aminoácidos na posição indicada: 26E, 37Y, 89T, 92E, 134I,V, 160R, 164F, 171I, 176K, 178P, 188N, 190E, 192G, 207E,T, 209S, 211 C, 235V, 248L, 256H,Y, 261E, 270K, 303F, e/ou 318D quando alinhado como descrito em a) com aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2 e usando uma numeração de resíduo de aminoácido correspondendo aos

aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2.

5. Fitase, caracterizada pelo fato de que tem uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 80% de identidade pelo menos 85% de identidade, pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, pelo menos 96% de identidade, pelo menos 97% de identidade, pelo menos 98% de identidade, ou pelo menos 99% de identidade com aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, ou aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6.

10. 6. Polipeptídeo tendo atividade de fitase, caracterizado pelo fato de ser selecionado do grupo consistindo de:

(i) um polipeptídeo compreendendo uma parte madura de SEQ ID NO:2;

(ii) uma variante de (i) compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições: K26E, N37Y, A89T, D92E, T134I,V, H160R, 15 S164F, T171I, T176K, A178P, S188N, D190E, A192G, K207E,T, A209S, D211C, A235V, E248L, Q256H,Y, A261E, N270K, D283N, A288E, 1303F, e/ou N318D; e

(iii) uma variante de (i) ou (ii) compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições: N1S, V91, T38S, E66Q, Q71K, T81A, 20 R141Q, L142V, T152M, E155D, V214I, K239N, D245E, E248S, A255T, R268A,T, A277T, D283E, N285K, T287D, A288V, D293G, P296S, 1303L, S314A, 1337V, A345S, V350I, A364S, K371 N, E372Q, P396S, K399T, E406V, e/ou Q413P; sendo que para determinar posições de resíduo de aminoácido em i) e ii) a sequência de aminoácidos do polipeptídeo é alinhada 25 com os aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2 usando o programa de Needle com a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade aberta de lacuna de 10,0, e uma penalidade de extensão de lacuna de 0,5, e usando uma numeração de resíduo de aminoácido correspondendo aos aminoácidos 1413 de SEQ ID NO:2.

7. Polipeptídeo tendo atividade de fitase, caracterizado pelo fato de ser selecionado do grupo consistindo de:

(i) um polipeptídeo compreendendo uma parte madura de SEQ ID NO:4;

5 (ii) uma variante de (i) compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições: K26E, N37Y, A89T, D92E, T1341,V, H160R, S164F, T1711, T176K, A178P, S188N, D190E, A192G, K207E,T, A209S, D211C, A235V, S248L, Q256H,Y, A261E, N270K, E283N, V288E, 1303F, e/ou N318D; e

10 (iii) uma variante de (i) ou (ii) compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições: 51N, 19V, S38T, Q66E, K71Q, T81A, Q141R, V142L, M152T, E155D, 1214V, N239K, E245D, S248E, T255A, A268R,T, T277A, E283D, K285N, D287T, V288A, D293G, S296P, 1303L, A314S, V337I, S345A, 1350V, A364S, N371 K, E372Q, S396P, T399K, 15 V406E, e/ou P413Q;

20 sendo que para determinar as posições de resíduo de aminoácido em i) e ii) a sequência de aminoácidos do polipeptídeo é alinhada com os aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4 usando o programa de Needle com a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade aberta de lacuna de 10,0, e uma penalidade de extensão de lacuna de 0,5, e usando uma numeração de resíduo de aminoácido correspondendo aos aminoácidos 1413 de SEQ ID NO:4.

8. Polipeptídeo tendo atividade de fitase, caracterizado pelo fato de ser selecionado do grupo consistindo de:

25 (i) um polipeptídeo compreendendo uma parte madura de SEQ ID NO:6;

(ii) uma variante de (i) compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições: K26E, N37Y, A89T, D92E, T1341,V, H160R, S164F, T1711, T176K, A178P, S188N, D190E, A192G, K207E,T, A2095,

D211C, A235V, S248L, Q256H,Y, A261E, N270K, E283N, V288E, L303F, e/ou N318D; e

5 (iii) uma variante de (i) ou (ii) compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições: N1S, V91, T385, E66Q, Q71K, A81T, Q141R, V142L, T152M, D155E, 1214V, N239K, E245D, S248E, A255T, T268A,R, T277A, E283D, K285N, D287T, V288A, G293D, P296S, L303I, A314S, V337I, S345A, V350I, S364A, N371K, Q372E, S396P, T399K, V406E, e/ou Q413P; sendo que para determinar as posições de resíduo de aminoácido em i) e ii) a sequência de aminoácidos do polipeptídeo é alinhada 10 com os aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6 usando o programa de Needle com a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade aberta de lacuna de 10,0, e uma penalidade de extensão de lacuna de 0,5, e usando uma numeração de resíduo de aminoácido correspondendo aos aminoácidos 1413 de SEQ ID NO:6.

15 9. Variante de um polipeptídeo, caracterizada pelo fato de compreender uma parte madura de qualquer uma das seguintes sequências de GENESEQP: AEH25057, AEH25059, AEH25058, AEH25067, AEH25071, AEH25072, AEH25074, AEH25075, AEH25076, AEH25073, AEH25070, AEH25069, AEH25066, AEH25060, AEH25068, AEH25063, AEH25065, 20 AEH25062, AEH25061, AEH25056, AEH25051, ou AEH25064; sendo que a variante tem atividade de fitase e compreende pelo menos uma das seguintes substituições: N1S, V10I, T38S, Q66E, Q71K, T81A, E109Q, H111G, D119N, 1120L, K121E, Q141R, V142L, T152M, D155E, L193Q, 1214V, N239K, E245D, S248E, V255A,T, R268A,T, A277T, N283D,E, N285K, 25 T287D, E288A,V, D293G, P296S, I,F303L, A314S, V337I, S345A, V350I, S364A, N371K, Q372E, S396P, T399K, V406E, e/ou Q413P; sendo que para determinar as posições de resíduo de aminoácido a sequência de aminoácidos da variante é alinhada com os aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2 usando o programa de Needle com a matriz de substituição BLOSUM62, uma

penalidade aberta de lacuna de 10,0, e uma penalidade de extensão de lacuna de 0,5, e usando uma numeração de resíduo de aminoácido correspondendo aos aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2.

10. Polipeptídeo tendo atividade de fitase, caracterizado pelo fato de ser selecionado do grupo consistindo de:

5 (a) um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 93,6% de identidade com a sequência de aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2; pelo menos 93,9% de identidade com a sequência de aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:4, ou pelo menos 95,8% de identidade com a sequência de aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:6

10 (b) uma variante compreendendo uma substituição, deleção, e/ou inserção conservativa de um ou mais aminoácidos of aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, sendo que para calcular a identidade em a) a sequência de aminoácidos do polipeptídeo é alinhada com os aminoácidos 1-413 de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6, usando o programa de Needle com a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade aberta de lacuna de 10,0, e uma penalidade de extensão de lacuna de 0,5.

15 11. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de compreender uma sequência de nucleotídeos que codifica o polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

20 12. Construto de ácido nucleico, caracterizado pelo fato de compreender o polinucleotídeo como definido na reivindicação 11 operacionalmente ligado em uma ou mais sequências de controle que direcionam a produção do polipeptídeo em um hospedeiro de expressão.

25 13. Célula hospedeira recombinante, caracterizada pelo fato de compreender o construto de ácido nucleico como definido na reivindicação 12.

14. Método para produzir o polipeptídeo como definido em

qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) cultivar uma célula, que em sua forma de tipo selvagem é capaz de produzir o polipeptídeo, sob condições conducentes para a produção do polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo, ou (b) cultivar uma célula hospedeira compreendendo um construto de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificadora do polipeptídeo sob condições conducentes para a produção do polipeptídeo; e (c) recuperar o polipeptídeo.

10 15. Uso da fitase ou de uma composição compreendendo a fitase como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de ser em ração animal; na preparação da ração animal; para melhorar o valor nutricional de ração animal; para reduzir os níveis de fitato em esterco animal; para o tratamento de proteínas vegetais; ou para liberar fósforo de um substrato de fitase.

15 16. Uso da fitase como definido nas reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de ser na preparação de etanol usando um processo de fermentação.

Fig. 1

Numeração

AEH25057
 AEH25059
 AEH25058
 AEH25067
 AEH25071
 AEH25072
 AEH25074
 AEH25076
 AEH25075
 AEH25073
 AEH25070
 AEH25069
 AEH25066
 AEH25060
 AEH25068
 AEH25063
 AEH25065
 AEH25062
 AEH25061
 AEH25056
 AEH25051
 AEH25064
 SEQ4
 SEQ6
 SEQ2

	1	10	20
MTISAFNRKKLTLPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM			
-----FSLGLTAYASDTPASGYQIEKVVILSRHGVRAPTKM			
MTFSAFNRKKLTLPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM			
MTISAFNHKKLTLPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM			

*****:*****:*****:*****:*

Fig. 1 - cont

Numeração	30	40	50	60	70	80
AEH25057	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25059	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25058	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25067	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25071	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25072	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25074	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25076	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25075	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25073	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25070	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25069	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25066	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25060	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25068	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25063	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25065	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25062	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25061	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25056	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25051	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
AEH25064	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
SEQ4	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
SEQ6	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
SEQ2	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ	TQ
	*****	*****	*****	*****	*****	*****

Fig. 1 - cont

Numeração	90	100	110	120	130	140
AEH25057	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGVC SMDKT QVQQAVE					
AEH25059	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGIC SMDKT QVQQAVE					
AEH25058	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGTC SMDKT QVQQAVE					
AEH25067	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGIC SMDKT QVQQAVE					
AEH25071	WTDVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGIC SMDKT QVQQAVE					
AEH25072	WTDVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGIC SMDKT QVQQAVE					
AEH25074	WADVEQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGIC SMDKT QVQQAVE					
AEH25076	WADVEQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGIC SMDKT QVQQAVE					
AEH25075	WTDVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGIC SMDKT QVQQAVE					
AEH25073	WTDVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGTC SMDKT QVQQAVE					
AEH25070	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGIC SMDKT QVQQAVE					
AEH25069	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGIC SMDKT QVQQAVE					
AEH25066	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGTC SMDKT QVQQAVE					
AEH25060	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGTC SMDKT QVQQAVE					
AEH25068	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGTC SMDKT QVQQAVE					
AEH25063	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGTC SMDKT QVQQAVE					
AEH25065	WADVEQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGTC SMDKT QVQQAVE					
AEH25062	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGTC SMDKT QVQQAVE					
AEH25061	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGTC SMDKT QVQQAVE					
AEH25056	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGTC SMDKT QVQQAVE					
AEH25051	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGTC SMDKT QVQQAVE					
AEH25064	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQD IKKADPLFHPVKAGTC SMDKT QVQQAVE					
SEQ4	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQ NLEKADPLFHPVKAGTC SMDKT QVQQAVE					
SEQ6	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQ NLEKADPLFHPVKAGTC SMDKT QVQQAVE					
SEQ2	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHQQ NLEKADPLFHPVKAGTC SMDKT RQQAVE					

Fig. 1- cont

Numeração	150	160	170	180	190	200
AEH25057	KEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNK					
AEH25059	KEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNK					
AEH25058	KEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNT					
AEH25067	KEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNT					
AEH25071	KEAQTPIDNLNQHYIPSLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNE					
AEH25072	KEAQTPIDNLNQHYIPSLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNE					
AEH25074	KEAQTPIDNLNQRYIPSLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNE					
AEH25076	KEAQTPIDNLNQRYIPSLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNE					
AEH25075	KEAQTPIDNLNQRYIPSLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNE					
AEH25073	KEAQTPIDNLNQRYIPSLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKNCDLALSMPSKLSIKDNGNE					
AEH25070	KEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNE					
AEH25069	KEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNT					
AEH25066	KEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGK					
AEH25060	KEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNE					
AEH25068	KEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCELGLSMPSKLSIKDNGNE					
AEH25063	KEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNTTILNFSKSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGK					
AEH25065	KEAQTPIDNLNQRYIPFLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGK					
AEH25062	KEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGK					
AEH25061	KEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGK					
AEH25056	KEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGK					
AEH25051	KEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGK					
AEH25064	KEAQTPIDNLNQHYIPSLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGK					
SEQ4	KEAQMPIENLNQHYIPSLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLAQSMPSKLSIKDNGNK					
SEQ6	KEAQTPIDNLNQHYIPSLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLAQSMPSKLSIKDNGNK					
SEQ2	KEAQTPIENLNQHYIPSLALMNTTILNFSTSAWCQKHSADKSCDLAQSMPSKLSIKDNGNK					
***** * :***** :***** *****. * .*****.*****. * :*. *****.*****						

Fig. 1 - cont

Numeração	210	220	230	240	250	260
AEH25057	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHNQFDL	MARTPYIA			
AEH25059	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHNQFDL	MARTPYIA			
AEH25058	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHNQFDL	MARTPYIA			
AEH25067	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHNQFDL	MARTPYIA			
AEH25071	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHNQFDL	MERTPYIA			
AEH25072	VSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEW	ALLKLHN	VYFDL	MERTPYIA		
AEH25074	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOVAWGNIHSEQEWA	LLKLHN	VHF	DLMERTPYIA		
AEH25076	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOVAWGNIHSEQEWA	LLKLHN	VHF	DLMERTPYIA		
AEH25075	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOVAWGNIHSEQEWA	LLKLHN	VHF	DLMERTPYIA		
AEH25073	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHNQFDL	MERTPYIA			
AEH25070	VSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHNQFDL	MERTPYIA			
AEH25069	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHNQFDL	MERTPYIA			
AEH25066	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHNQFDL	MERTPYIA			
AEH25060	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHNQFDL	MARTPYIA			
AEH25068	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHNQFDL	MARTPYIA			
AEH25063	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHNQFDL	MARTPYIA			
AEH25065	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHNQFDL	MARTPYIA			
AEH25062	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHN	VYFDL	MARTPYIA		
AEH25061	VALCAGIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHNQFDL	MARTPYIA			
AEH25056	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHNQFDL	MARTPYIA			
AEH25051	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHNQFDL	MARTPYIA			
AEH25064	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHN	TQFDL	MARTPYIA		
SEQ4	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHN	AQFDL	MARTPYIA		
SEQ6	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHN	AQFDL	MARTPYIA		
SEQ2	VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPOAAWGNIHSEQEWA	LLKLHN	AQFDL	MARTPYIA		

Fig. 1- cont

Numeração	270	280	290	300	310	320
AEH25057	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25059	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25058	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25067	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25071	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25072	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25074	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25076	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25075	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFFAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25073	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25070	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25069	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25066	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25060	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25068	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLDMRWTLPGQP					
AEH25063	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25065	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25062	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25061	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25056	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25051	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
AEH25064	RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKL PD ISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
SEQ4	AHNGTPLLQTISNALEPKADVSKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
SEQ6	THNGTPLLQTISNALEPKADVSKLPGISPDNKILFLAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
SEQ2	RHNGTPLLQAI SNALDPNATASK KL PDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP					
	* : * * * * : * * * * : * * * . * . * * * * : * * * * * * * * : * * : * * * * * * *					

Fig. 1- cont

Numeração	330	340	350	360	370	380
AEH25057	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25059	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25058	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25067	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25071	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25072	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25074	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25076	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25075	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25073	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25070	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25069	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25066	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25060	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25068	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25063	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25065	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25062	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25061	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25056	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25051	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
AEH25064	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
SEQ4	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYISVSMVYQTLEQLRA	Q	T	PLS	N	E
SEQ6	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLS	<u>L</u>	NQ	PAGSVQL	KIPGCNDQ	
SEQ2	DNTPPGGALVFERLADKAGKQYVSVSMVYQTLEQLRA	Q	T	PLS	L	K
	*****	*****	*****	*****	*****	*****

Fig. 1- cont

Numeração	390	400	410
AEH25057	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25059	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25058	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25067	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25071	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25072	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25074	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25076	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25075	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25073	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25070	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25069	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25066	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25060	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25068	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25063	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25065	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25062	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25061	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25056	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25051	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25064	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
SEQ4	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLP		
SEQ6	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
SEQ2	TAEGYCPLPTFKRVVSQSSEEPGCQLQ		
	*****	*****	*****

Fig. 2

Programa: Needle

Matriz: BLOSUM62

Penalidade de iniciação de lacuna: 10,0

Penalidade de extensão de lacuna 0,5

Número de resíduos idênticos: 315

Comprimento da seqüência mais curta 413

% de identidade: 315/413 = 76,3%

SEQ2_madura 1

UNIPROTQ6U677	1	MTISLFTHSPTRLKCMPLAFIAASMLTTASYASSETEPSGYQLEKVVVILS	NDTPASGYQVEKVVVILS	17
SEQ2_mature	18	RHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYREK	::.. :	50
		. : :		67
UNIPROTQ6U677	51	RHGVRAPTKMTQTMRDVTPNAWPEWPVKLGYITPRGEHLVSLMGGFYRQK	100	
SEQ2_mature	68	FQQQGILSQGSCPTPNNSIYVWADVDQRTLKTGEAFLAGLAPOCGLTIHHQ	117	
		. : . . . : . :		
UNIPROTQ6U677	101	FQQLGILSKGRCPTANDVYVWADVDQRTRKTGEAFLAGLAPECHLSIHHQ	150	
SEQ2_mature	118	QNLEKADPLFHPVKAGTCMSDKTRLQQAVEKEAQTPIENLNQHYIPSLAL	167	
		: . . : : : : . : . :		
UNIPROTQ6U677	151	QDIKQADPLFHPVKAGVCTMEKTQVQQAVEQQAGMPIDQLNQHYRPALAL	200	
SEQ2_mature	168	MNTTLNFSTSACQKHSADKSCDLAQSMPSKLSIKDNGNKKVALDGAVGLS	217	
		. . . : : :		
UNIPROTQ6U677	201	MSSVLNFPKSTYCQQHSADQTCDLAQAMPSKLSIKDNGNKKVALDGAVGLS	250	
SEQ2_mature	218	STLAEIFLLEYAQGMPQAAWGKIHSEQDWELLKLHNAQFDLMMARTPYIA	267	
		. . . :		
UNIPROTQ6U677	251	STLAEIFLLEYAQGMPDAAWGKIHSEQDWNLALLHNAQFDLMSRTPYIA	300	
SEQ2_mature	268	RHNGTPLLQAIQNADLPNATASKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANISGML	317	
		. . : : : . . :		
UNIPROTQ6U677	301	KHNGTPLLQTIVSAINSQPSSRELPELSADNKILFFAGHDTNIANIAGMF	350	
SEQ2_mature	318	NMRWTLPGQPDNTPPGGALIFERLADKAGKQYVSMSMVYQTLQLRAQTP	367	
	 : . . : . .		
UNIPROTQ6U677	351	GMSWALPGQPDPNTPPGGALVFERWSDKTGKKYVSVQMMYQTLAQLRNQTP	400	
SEQ2_mature	368	LSLKEPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLPTFKRVVSQSEEPGCQLQ	413	
	 : . . : . .		
UNIPROTQ6U677	401	LTLDKPGAGSVALKIPGCDDQTAEGYCPLDFTRLAKQNELVECQ	444	

RESUMO

“POLIPEPTÍDEO, FITASE, VARIANTE DE UM POLIPEPTÍDEO, POLINUCLEOTÍDEO, CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLEICO, CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE, MÉTODO PARA PRODUZIR O POLIPEPTÍDEO, E, USO DA FITASE OU DE UMA COMPOSIÇÃO”

A presente invenção refere-se aos polipeptídeos tendo atividade de fitase. Estes polipeptídeos têm uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade com qualquer uma de três fitases derivadas da bactéria *Buttiauxella*, e que compreende pelo menos um dos seguintes aminoácidos na posição indicada: 119N, 120L, e/ou 121E. Estas fitases têm uma atividade específica. Também são reveladas substituições de aminoácido específicas adicionais que caracterizam e distinguem fitases adicionais da invenção tendo propriedades melhoradas tais como estabilidade em pH e/ou temperatura, perfil de atividade em pH, perfil de atividade em temperatura, perfil de substrato, desempenho melhorado em ração animal in vitro ou in vivo. A invenção também se refere aos polinucleotídeos isolados codificadores dos polipeptídeos, aos construtos de ácido nucleico, vetorese, e às células hospedeiras compreendendo os polinucleotídeos bem como aos métodos para produzir e usar os polipeptídeos.