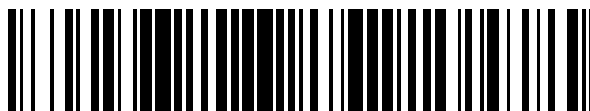


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 078**

51 Int. Cl.:  
**C12N 9/16** (2006.01)  
**C12N 15/55** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**A23K 1/165** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10170535 .8**  
96 Fecha de presentación: **17.10.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2236601**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.2010**

54 Título: **Fitasas**

30 Prioridad:  
**18.10.2004 GB 0423139**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.11.2012**

73 Titular/es:  
**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS**  
**(100.0%)**  
**Langebrogade 1 Postboks 17**  
**1001 Copenhagen K., DK**

72 Inventor/es:  
**MIASNIKOV, ANDREI;**  
**KUMAR, VIJAY;**  
**KENSCH, OLIVER;**  
**PELLENGAHR, KLAUS;**  
**LEUTHNER, BIRGITTA;**  
**KETTLING, ULRICH y**  
**KOLTERMANN, ANDRE**

74 Agente/Representante:  
**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 391 078 T3

## DESCRIPCIÓN

Fitasas.

La presente descripción se refiere a las fitasas, secuencias nucleotídicas para las mismas, métodos de producción de fitasas y su uso.

### 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de las enzimas para aditivos de productos alimenticios. Más específicamente, la presente invención se refiere a las fitasas que se pueden utilizar para mejorar la digestión del fosfato de los alimentos y de los piensos para consumo animal.

### ANTECEDENTES TÉCNICOS Y TÉCNICA PREVIA

10 El fitato es la principal forma de almacenamiento del fósforo en los cereales y en las legumbres. Sin embargo, los animales monogástricos, tales como el cerdo, las aves de corral y los peces, no son capaces de metabolizar ni absorber el fitato (o ácido fítico) y, por consiguiente, se excreta, lo que conduce a la contaminación fosfórica en las áreas de producción intensiva de ganado. Además, el ácido fítico también actúa como un antinutriente en los animales monogástricos al quelar los metales tales como calcio, cobre y cinc.

15 Para proporcionar fosfatos suficientes para el crecimiento y la salud de estos animales, se les añade el fosfato inorgánico en la dieta. Tal adición puede ser costosa e incrementa adicionalmente los problemas de contaminación.

Mediante la acción de la fitasa, el fitato se hidroliza por lo general para dar fosfatos de inositol inferiores y fosfato inorgánico. Las fitasas son útiles como aditivos en los piensos para consumo animal porque mejoran la disponibilidad del fósforo orgánico para el animal y disminuyen la contaminación fosfórica del medio ambiente  
20 (Wodzinski, R. J., Ullah A. H., *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 263-302 (1996)).

En la bibliografía se han descrito una serie de fitasas de origen fúngico (Wyss M. et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (2), 367-373 (1999); Berka R. M. et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (11), 4423-4427 (1998); Lassen S. et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (10), 4701-4707 (2001)) y bacteriano (Greiner R. et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 303 (1), 107-113 (1993); Kerovuo et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (6), 2079-2085 (1998); Kim H. W. et al. *Biotechnol. Lett.* 25, 1231-1234 (2003); Greiner R. et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 341 (2), 201-206 (1997); Yoon S. J. et al., *Enzyme and microbial technol.* 18, 449-454 (1996); Zinin N. V. et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 283-290 (2004)).

Por ejemplo, las enzimas fitasa mutantes de *E. coli* y las variantes naturales de las mismas se conocen a partir de la patente internacional WO 2004/015084, y las fitasas producidas por *Citrobacter braakii* se conocen a partir de la patente internacional WO2004/085638. Se han dado a conocer otras fitasas bacterianas mediante métodos de muestreo y escrutinio (Zinn N. V. et al., *Biotechnologia*, Glavnoe Upravlenie Mikrobiologiceskoj Promy Lennosti Pri, 2, 3-10 (2003)).

No obstante, hasta la fecha, ninguna de estas fitasas presenta las propiedades necesarias para el uso eficaz como suplemento de los piensos para consumo animal. En particular, las fitasas fúngicas tienden a ser proteolíticamente inestables (Igbasan F. A. et al., *Arch. Anim. Nutr.* 53, 353-373 (2000)) y, por lo tanto, son vulnerables a la degradación, mientras que la mayor parte de las fitasas bacterianas tienen una estrecha especificidad de sustrato por el fitato a solas y degradan mal los fosfatos de inositol de grados intermedios de fosforilación (Greiner R. et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 303 (1), 107-113 (1993); Kerovuo J. et al., *Biochem. J.* 352, 623-628 (2000)).

Por consiguiente, se necesitan fitasas mejoradas.

### COMPENDIO DE LA INVENCION

40 En un aspecto amplio, la presente invención se refiere a los métodos para preparar fitasas procedentes de una bacteria y las formas modificadas de la misma. En particular, la invención se refiere a los métodos para preparar fitasas procedentes de la bacteria *Buttiauxella sp.* y formas modificadas/variantes de la misma seleccionadas y/o modificadas genéticamente para que tenga mejores características que la enzima de tipo silvestre (enzima madre).

La presente invención es ventajosa porque da a conocer métodos para preparar nuevas fitasas que tienen propiedades que las hacen particularmente útiles y eficaces como enzimas para piensos. En particular, la invención se refiere a los métodos para preparar polipéptidos de fitasa nuevos purificados y/o aislados como se describe en la presente memoria, o un fragmento funcional, o variantes o formas modificadas de los mismos, o una forma modificada de los mismos. También se describen en la presente memoria las secuencias de ácido nucleico que codifican dichas fitasas.

50 Para ser eficaz como aditivo enzimático para alimentos o para pienso para consumo animal, la fitasa tiene que combinar una serie de propiedades diferentes. Para poder degradar el ácido fítico en el medio ácido del estómago de un animal, tiene que permanecer activa a pH bajo, preferentemente a lo largo de un amplio margen de valores de pH. Además, tiene que tener una elevada actividad específica y preferentemente una termoestabilidad elevada para

permitir que la proteína resista las temperaturas altas utilizadas de forma habitual en la preparación de productos alimenticios para consumo animal tales como los piensos granulados.

También es importante que la enzima tenga una amplia especificidad de sustrato que le permita hidrolizar no sólo el fitato, sino también los productos intermedios de la degradación del fitato, tales como pentafosfatos, tetrafosfatos y trifosfatos de inositol. Los estudios sobre la degradación del fitato en los cerdos demuestran que estos oligofosfatos de inositol permanecen en su mayor parte insolubles en el intestino delgado y en el grueso y, por consiguiente, inaccesibles a las fosfatasas alcalinas producidas por el animal y la microflora intestinal (Schlemmer U. et al. *Arch. Anim. Nutr.* 55, 255-280 (2001)). Se han identificado variaciones de los perfiles de especificidad de sustrato en diferentes enzimas. Por ejemplo, los trifosfatos de inositol generados por la fitasa de *B. subtilis* son esencialmente resistentes a la hidrólisis posterior por esta enzima [Kerovuo J. et al., *Biochem. J.* 352, 623-628 (2000)].

También se describe en la presente memoria un plásmido o un sistema de vector, o un transformante o un organismo transgénico que comprende una nueva fitasa como se describe en la presente memoria o una forma modificada de la misma.

También se describen en la presente memoria organismos transgénicos modificados para que expresen una nueva fitasa como la descrita en la presente memoria o una forma modificada de la misma y, por consiguiente, sean capaces de producir una fitasa. La presente invención da a conocer medios y métodos para producir fitasas mediante biotecnología y su uso como complemento para los piensos.

Los aspectos de la presente invención se presentan en las reivindicaciones y en el comentario que viene a continuación.

Para facilidad de referencia, estos y otros aspectos de la presente invención se explican ahora en los encabezamientos de apartados apropiados. No obstante, las enseñanzas en cada apartado no se limitan necesariamente a cada apartado en particular. Tal y como se utiliza con referencia a la presente invención, la terminología «producir», «que produce», «producido», «producibile», «producción» es sinónima de la terminología correspondiente «preparar», «que prepara», «preparado», «preparación», «generado», «generación» y «preparable».

Tal y como se usa con referencia a la presente invención, la terminología «expresión», «expresa», «expresado» y «expresable» es sinónima de la terminología correspondiente «transcripción», «transcribe», «transcrito» y «transcribible».

Tal y como se usa con referencia a la presente invención, la terminología «transformación» y «transfección» se refieren a un método que introduce secuencias de ácido nucleico en hospedadores o células hospedadoras, tejidos u órganos.

Otros aspectos que se refieren a las secuencias nucleotídicas que se pueden utilizar en los métodos de la presente invención incluyen: una construcción que comprende las secuencias de la presente invención; un vector que comprende las secuencias para uso en la presente invención; un plásmido que comprende las secuencias para uso en la presente invención; una célula transformada que comprende las secuencias para uso en la presente invención; un tejido transformado que comprende las secuencias para uso en la presente invención; un órgano transformado que comprende las secuencias para uso en la presente invención; un hospedador transformado que comprende las secuencias para uso en la presente invención; un organismo transformado que comprende las secuencias para uso en la presente invención. La presente invención también abarca los métodos para expresar la secuencia nucleotídica para uso en la presente invención que utilizan la misma, tal como la expresión en una célula hospedadora; que incluye métodos para transferir la misma. La presente invención además abarca métodos para aislar la secuencia nucleotídica, tal como el aislamiento a partir de una célula hospedadora.

Otros aspectos que se refieren a las secuencias de aminoácidos para uso en los métodos de la presente invención incluyen: una construcción que codifica las secuencias de aminoácidos para uso en la presente invención; un vector que codifica las secuencias de aminoácidos para uso en la presente invención; un plásmido que codifica las secuencias de aminoácidos para uso en la presente invención; una célula transformada que expresa las secuencias de aminoácidos para uso en la presente invención; un tejido transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para uso en la presente invención; un órgano transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para uso en la presente invención; un hospedador transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para uso en la presente invención; un organismo transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para uso en la presente invención. La presente invención también abarca los métodos de purificación de la secuencia de aminoácidos para uso en la presente invención que utilizan la misma, tal como la expresión en una célula hospedadora; que incluye los métodos para transferir la misma y, luego, purificar dicha secuencia.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra el análisis por SDS-PAGE de la fitasa recombinante de *Buttiauxella* P1-29 purificada mediante cromatografía de DEAE-Sepharose. La figura muestra el trazo del escaneo de una imagen fotográfica digital del carril que contiene una muestra de la fitasa de *Buttiauxella*.

La figura 2 muestra el perfil del pH de la fitasa de *Buttiauxella* P1-29.

La figura 3 muestra la especificidad de sustrato de la fitasa recombinante purificada de *Buttiauxella* P1-29 con fracciones de fosfato de inositol de diferentes grados de fosforilación y sustratos de modelo. Abreviaturas: IP6: ácido fítico, IP5, IP4 e IP3: mezclas de penta-, tetra- y trifosfatos de inositol isoméricos, respectivamente. Fru P2: fructosa-1,6-difosfato, Fru P1: fructosa-6-fosfato.

La SEQ ID n.º 1 recoge la secuencia obtenida para la identificación de la cepa bacteriana.

La SEQ ID n.º 2 recoge la secuencia polinucleotídica que comprende el gen de la fitasa de *Buttiauxella* P1-29.

La SEQ ID n.º 3 recoge la secuencia de aminoácidos del gen de la fitasa de *Buttiauxella* P1-29.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 La presente invención da a conocer métodos para preparar una enzima que comprende la secuencia de aminoácidos que corresponde a la fitasa de *Buttiauxella* sp. o una forma modificada, un homólogo, o una variante. La terminología «fitasa» significa una proteína o un polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de ésteres de ácido fosfórico, entre ellos fitato, y de liberar fosfato inorgánico. Algunas fitasas son capaces de hidrolizar, además del fitato, al menos parte de los fosfatos de inositol de grados intermedios de fosforilación.

15 La terminología «que corresponde a la fitasa de *Buttiauxella* sp.» significa que la enzima no tiene que obtenerse de una fuente de *Buttiauxella* sp. En su lugar, la enzima preferentemente tiene que tener las mismas características funcionales o secuencia que la fitasa de *Buttiauxella* sp. Por ejemplo, la fitasa de *Buttiauxella* sp. puede ser una variante procedente de una *Buttiauxella* sp., pero que no está presente de forma natural en las especies de *Buttiauxella*.

20 La *Buttiauxella* spp. incluye *Buttiauxella* *agrestis*, *Buttiauxella* *brennerae*, *Buttiauxella* *ferragutiae*, *Buttiauxella* *gaviniae*, *Buttiauxella* *izardii*, *Buttiauxella* *noackiae*, *Buttiauxella* *warboldiae*. Las cepas de las especies de *Buttiauxella* están disponibles en el DSMZ, que es el Centro de Recursos Nacionales de Alemania para material biológico. Las fitasas se identifican preferentemente en *Buttiauxella* spp. mediante los métodos descritos en la presente memoria, por ejemplo, hibridación a la SEQ ID n.º 2. Las cepas de *Buttiauxella* spp. preferentes para aislar polipéptidos y/o polinucleótidos de la invención se recogen en los ejemplos.

La terminología «fitasa de tipo silvestre» o «tipo silvestre» de acuerdo con la invención describe una enzima fitasa con una secuencia de aminoácidos que se encuentra en la naturaleza.

30 La terminología «variante de la enzima fitasa», «variante de fitasa» o «variante» de acuerdo con la invención describe una enzima fitasa con una secuencia de aminoácidos procedente de la secuencia de aminoácidos de una fitasa madre, pero que difiere por una o más sustituciones de aminoácidos, inserciones y/o deleciones, que en conjunto se denominan «mutaciones». Se contempla que una variante de la enzima fitasa también puede ser una enzima fitasa madre para rondas posteriores de los métodos de preparación de variantes de fitasa, tal como la evolución molecular.

35 La terminología «polipéptido(s) homólogo(s)» de acuerdo con la presente invención, descritos también como «homólogos» en la presente memoria, describe polipéptidos, preferentemente enzimas fitasa (a saber, «fitasas homólogas» o «enzimas homólogas») con una identidad de secuencia de más del 75% en comparación con una primera secuencia de aminoácidos de polipéptidos/fitasas/enzimas, que tiene preferentemente al menos una homología de secuencia del 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

40 La terminología «equivalente funcional de la misma» significa que la enzima tiene aproximadamente las mismas características funcionales que las de la fitasa de *Buttiauxella* sp. La terminología «forma modificada» o «variante» significa que la enzima se ha modificado a partir de su forma original, pero que conserva las mismas características funcionales enzimáticas que las de la fitasa de *Buttiauxella* sp. En particular, la terminología «variante» o «forma modificada» abarca enzimas fitasa con una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la fitasa de tipo silvestre/madre y que tiene una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos, que en conjunto se denominan mutaciones. Las formas modificadas o variantes pueden mostrar alteraciones de las características enzimáticas en comparación con la enzima madre. Preferentemente, las formas modificadas o variantes tienen una o varias de las siguientes mejoras fenotípicas: mayor termoestabilidad y/o; mayor estabilidad proteolítica (por ejemplo, a la pepsina) y/o; mayor actividad específica y/o; una especificidad del sustrato más amplia y/o; actividad a lo largo de un margen de pH más amplio. La terminología fragmento «funcional» o «eficaz» significa un fragmento o porción de la fitasa de *Buttiauxella* sp. que conserva aproximadamente la misma función enzimática o efecto.

Preferentemente, la enzima fitasa preparada mediante los métodos de la presente invención tiene la misma secuencia o una secuencia que es idéntica (homóloga) al menos al 80% a la de la fitasa de *Buttiauxella* sp.

Convenientemente, la enzima comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID n.º 3 o una

secuencia que tiene una identidad (homología) de al menos el 80% con ésta. En una realización preferente, la invención da a conocer un método de preparación de un polipéptido purificado y/o aislado que tiene la secuencia de aminoácidos que se presenta en la SEQ ID n.º 3 o una secuencia que tiene una identidad (homología) de al menos el 80% con ésta. Cuando se hace referencia a la SEQ ID n.º 3 y los polipéptidos que comprenden la SEQ ID n.º 3, se contempla que esto también se refiera a los polipéptidos que se procesan co- o postraduccionalmente durante la expresión, por ejemplo mediante la escisión del péptido señal. La escisión postraducciona también se puede producir en el extremo carboxilo. Por consiguiente, en una realización preferente, el fragmento eficaz del mismo (también denominado fragmento funcional del mismo) es el polipéptido maduro producido por el hospedador nativo o un hospedador idóneo para la de expresión apropiada.

10 En otra realización, la fitasa se caracteriza por que se deriva de la cepa de *Buttiauxella* P1-29 depositada con el número de acceso NCIMB 41248.

En una realización preferente, la invención se refiere a un método de preparación de una fitasa de acuerdo con una realización cualquiera del primer aspecto de la invención que comprende una o varias mutaciones en las posiciones siguientes (numeradas de acuerdo con la numeración en la SEQ ID n.º 3):

15 59, 70, 122, 125, 167, 193, 197, 204, 209, 211, 221, 223, 225, 240, 242, 244, 268, 281, 289, 294, 303, 336, 351.

Estas posiciones se caracterizan por que la mutagénesis de la enzima en estas posiciones conduce a una mejora de las características enzimáticas deseadas.

Las siguientes sustituciones pueden ser variantes preferentes:

K 59 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

20 T 70 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y

A 122 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

D 125 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

T 167 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y

H 193 A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

25 F 197 A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

T 204 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y

T 209 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y

A 211 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

G 221 A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

30 I 223 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

S 225 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y

K 240 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

A 242 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

D 244 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

35 A 268 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

L 281 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

Q 289 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y

A 294 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

N 303 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

40 I 336 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

N 351 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

Con «mutaciones conservativas» se hace referencia a mutaciones de restos de aminoácidos que son conservativas

en términos de las características aminoacídicas en comparación con el resto aminoacídico indicado. Las características aminoacídicas incluyen el tamaño del resto, la hidrofobia, la polaridad, la carga, el valor de pK y otras características aminoacídicas conocidas en la técnica. Las mutaciones conservativas preferentes se recogen más adelante como sustituciones conservativas.

- 5 En una realización particularmente preferente, las mutaciones se encuentran en una o más de las posiciones siguientes: K59; T167; K240; T167; K240; D244; Q289; T209 y F197.

Las mutaciones preferentes en estas posiciones específicas están descritas más arriba, y las mutaciones más preferentes incluyen: K59E; T167V; K240T; T167I; K240E; D244C; Q289Y; T209K y F197S.

- 10 En otra realización preferente, se da a conocer un método de preparación de fitasa que comprende una combinación de mutaciones seleccionadas entre el grupo que consiste en:

D125E/H193R;

A294E/N303K;

T167I/K240T;

D223E/K240E/N351D;

- 15 T167I/K240I7A294E/N303K;

T167I/K240E/A242S/A294E/N303K;

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

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

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

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

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

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

- 25 En consecuencia, una fitasa preferente preparada mediante los métodos de acuerdo con la presente invención es una variante que comprende la secuencia de aminoácidos recogida como SEQ ID n.º 3 o un fragmento eficaz de la misma (o un homólogo de la misma, caracterizándose preferentemente la fitasa por proceder de la cepa P1-29 de *Buttiauxella* sp. depositada con el número de acceso NCIMB 41248, o un homólogo de la misma), excepto por tener una o más de las mutaciones de aminoácidos enumeradas más arriba o una de las combinaciones de mutaciones enumeradas más arriba.

- 30 En estas realizaciones, la nomenclatura indica una fitasa que comprende la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID n.º 3 con las mutaciones indicadas mediante referencia a las posiciones de los aminoácidos en la SEQ ID n.º 3. La nomenclatura se describe con más detalle más adelante.

- 35 Convenientemente estas variantes muestran una mejora de sus características con respecto a una cualquiera de las siguientes: termoestabilidad, intervalo del pH, estabilidad frente a la pepsina, actividad específica, especificidad de sustrato y especificidad de sustrato más amplia. En la presente memoria se describen los métodos adecuados para determinar estas características.

- 40 En particular, las mejoras de las características de la fitasa se centran en la estabilidad de la enzima en las condiciones de procesamiento de los alimentos y el pienso, en la estabilidad de la enzima durante el tránsito por el estómago, y en la actividad y estabilidad de la enzima en el estómago humano o animal y/o los intestinos, lo que hace que las variantes mejoradas sean particularmente idóneas para el uso como complementos para piensos. Por lo tanto, tales mejoras comprenden, entre otros parámetros, el incremento de la estabilidad a temperaturas altas, preferentemente a temperaturas por encima de los 65 °C, el incremento en la estabilidad frente a la digestión proteolítica, preferentemente a las proteasas del tubo digestivo, tal como la pepsina, el incremento de la actividad catalítica a pH bajo, preferentemente una actividad catalítica por debajo de pH 5,5, y la eficiencia general de la liberación de los grupos fosfato desde el fitato, y además, preferentemente, desde los fosfatos de inositol.

- 45 Nomenclatura

En la presente descripción y reivindicaciones se utilizan los códigos convencionales de una letra y de tres letras para los restos de aminoácidos. Para facilitar la referencia, las mutaciones en las variantes de la enzima se describen mediante el uso de la nomenclatura siguiente: resto de aminoácido en la enzima madre; posición; resto(s) de aminoácido(s) sustituyente(s). De acuerdo con esta nomenclatura, la sustitución de, por ejemplo, un resto de alanina

por un resto de glicina en la posición 20 se indica como Ala20Gly o A20G. La delección de la alanina en la misma posición se muestra como Ala20\* o A20\*. La inserción de un resto aminoacídico adicional (p. ej., una glicina) se indica como Ala20AlaGly o A20AG. La delección de un tramo consecutivo de restos aminoacídicos (p. ej., entre la alanina en la posición 20 y la glicina en la posición 21) se indica como  $\Delta$ (Ala20-Gly21) o  $\Delta$ (A20-G21). Cuando una secuencia de la enzima madre contiene una delección en comparación con la secuencia de la enzima utilizada para numerar una inserción en tal posición (p. ej., eliminación de una alanina en la posición 20) se indica como \*20Ala o \*20A. Las mutaciones múltiples se separan mediante un signo más o una barra oblicua. Por ejemplo, dos mutaciones en las posiciones 20 y 21 que sustituyen la alanina y el ácido glutámico por glicina y serina, respectivamente, se indican como A20G+E21S o A20G/E21S. Cuando un resto de aminoácido en una posición determinada se sustituye por dos o más restos de aminoácidos alternativos, estos restos se separan con una coma o con una barra oblicua. Por ejemplo, la sustitución de la alanina en la posición 30 por glicina o por ácido glutámico se indica como A20G,E o A20G/E, o A20G, A20E. Cuando una posición adecuada para modificación se identifica en la presente memoria sin que se sugiera ninguna modificación específica, se debe entender que cualquier resto aminoacídico puede sustituir al resto aminoacídico presente en la posición. Así pues, por ejemplo, cuando se menciona una modificación de una alanina en la posición 20 sin especificar cuál es, se debe entender que la alanina puede eliminarse o sustituirse por cualquier otro resto de aminoácido (a saber, una cualquiera entre R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V).

Convenientemente, la fitasa preparada mediante los métodos de la presente invención se caracteriza por que dicha fitasa tiene una actividad específica de al menos 300 U/mg, en donde dicha actividad específica se determina mediante la incubación de dicha fitasa en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a pH 3,5 como se detalla en el ejemplo 1. La fitasa preparada mediante los métodos de la presente invención también se puede caracterizar convenientemente por que dicha fitasa tiene una actividad máxima en torno a pH de 4 a 4,5, en donde dicha actividad se determina mediante la incubación de dicha fitasa en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM. La fitasa preparada por los métodos de la presente invención también se puede caracterizar convenientemente por que dicha fitasa tiene el 40% o más de una actividad máxima observada a pH 2,5 y 5,5, en donde el tampón de hidrocloreuro de glicina se utiliza para determinar la actividad a pH 2,5.

Convenientemente, en una realización, la fitasa o preparada mediante los métodos de la presente invención se caracteriza por que dicha fitasa tiene una actividad específica de 330 U/mg o mayor, en donde dicha actividad específica se determina mediante la incubación de dicha fitasa en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a pH 3,5. En otra realización, la fitasa preparada por los métodos de la presente invención o el equivalente funcional de la misma también se puede caracterizar convenientemente por que dicha fitasa tiene dos máximos de actividad en torno a pH 3 y a pH de 4 a 4,5, en donde dicha actividad se determina mediante la incubación de dicha fitasa en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM.

En otro aspecto, en la presente memoria se describe una molécula de ácido nucleico purificada y/o aislada o la secuencia nucleotídica que codifica la enzima que comprende la secuencia de aminoácidos que corresponde a la fitasa de *Buttiauxella sp.*, o un homólogo de la misma. Convenientemente dicha molécula de ácido nucleico purificada y/o aislada codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID n.º 3 o una secuencia que tiene una identidad (homología) de al menos el 80% con ésta o un fragmento eficaz de la misma. En una realización, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID n.º 3 y que incluye mutaciones en las posiciones preferentes recogidas en la presente memoria o cualquiera de las mutaciones específicas o combinaciones de mutaciones recogidas en la presente memoria. En otra realización, la invención da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada y/o purificada que comprende una secuencia nucleotídica que es la misma que, o es complementaria a, o contiene cualesquier sustitución de codones adecuada por cualquiera de los de la SEQ ID n.º 2 o comprende una secuencia que tiene una homología de secuencia de al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la SEQ ID n.º 2.

Aún en otro aspecto, en la presente memoria se describe una secuencia nucleotídica y el uso de una secuencia de nucleótidos mostrada como:

- 50 (a) la secuencia nucleotídica presentada como SEQ ID n.º 2,
- (b) una secuencia nucleotídica que es una variante, un homólogo, un derivado o un fragmento de la secuencia nucleotídica presentada como SEQ ID n.º 2;
- (c) una secuencia nucleotídica que es el complemento de la secuencia nucleotídica presentada en la SEQ ID n.º 2;
- (d) una secuencia nucleotídica que es el complemento de una variante, de un homólogo, de un derivado o de un fragmento de la secuencia nucleotídica presentada como SEQ ID n.º 2;
- 55 (e) una secuencia nucleotídica que es capaz de hibridarse a la secuencia nucleotídica presentada en la SEQ ID n.º 2;
- (f) una secuencia nucleotídica que es capaz de hibridarse a una variante, a un homólogo, a un derivado o a un

fragmento de la secuencia nucleotídica presentada como SEQ ID n.º 2;

(g) una secuencia nucleotídica que es el complemento de una secuencia nucleotídica que es capaz de hibridarse a la secuencia nucleotídica presentada en la SEQ ID n.º 2;

5 (h) una secuencia nucleotídica que es el complemento de una secuencia nucleotídica que es capaz de hibridarse a una variante, a un homólogo, a un derivado o a un fragmento de la secuencia nucleotídica presentada como SEQ ID n.º 2;

(i) una secuencia nucleotídica que es capaz de hibridarse al complemento de la secuencia nucleotídica presentada en la SEQ ID n.º 2;

10 (j) una secuencia nucleotídica que es capaz de hibridarse al complemento de una variante, de un homólogo, de un derivado o de un fragmento de la secuencia nucleotídica presentada como SEQ ID n.º 2.

Un nucleótido se considera que se hibrida a uno de los nucleótidos anteriores (e), (f), (g), (h), (i) o (j) si es capaz de hibridarse en condiciones de rigor medio, más preferentemente rigor alto, incluso más preferentemente en condiciones de rigor muy alto.

15 Para preparar una hibridación se pueden utilizar los protocolos de transferencia estándares de biología molecular (p. ej., transferencia Southern para hibridaciones de ADN). La cantidad del ADN diana depende de la abundancia relativa de la secuencia de destino. Si se va a utilizar una secuencia de destino pura, se prefieren entre 1 y 5 pg de ADN por kilobase de polinucleótido. Típicamente, el límite de detección es de unos 0,5 pg de ADN para una sonda radioactiva con una actividad específica de  $10^9$  dpm/mg, que es equivalente a un gen de 500 pb de longitud en una sola copia en 3,3 mg de ADN genómico de un genoma complejo (p. ej., humano). En la práctica se utilizarán  
20 aproximadamente 10 mg de ADN genómico, por ejemplo para escrutar organismos, tales como microorganismos, que contienen una fitasa que codifica un polinucleótido de la invención. Si el ADN diana es bacteriano o, por ejemplo, un plásmido, se tendrá que diluir el ADN en consecuencia para evitar la sobreexposición. El ADN diana se transfiere, p. ej., mediante transferencia puntiforme, o mediante la transferencia desde un gel de electroforesis. Las condiciones preferentes se describen en «Membrane transfer and detection methods», Amersham International plc,  
25 GB.- PI/162/85/1). Preferentemente se utiliza la membrana de nilón cargada positivamente Hybond N+ (Amersham Life Science). La sonda se prepara preferentemente de acuerdo con el kit de marcación Ready to Go DNA™ de Pharmacia para preparar una sonda de  $> 1 \times 10^8$  dpm/μg. La sonda se utiliza en tampón de hibridación a una concentración de  $1 \times 10^6$  dpm/ml de tampón de hibridación. Las transferencias se prehibridan preferentemente en tampón de hibridación (SSC a 6X, solución de Denhardt a 5X, y SDS al 0,5%, y ADN de esperma de salmón  
30 desnaturalizado a 100 mg/ml) durante una hora a 65 °C, y después se hibrida con agitación durante 12 horas a 65 °C en el tampón de hibridación que contiene la sonda marcada desnaturalizada. La(s) inmunotransferencia(s) se lava(n) luego con un volumen adecuado (típicamente 50 ml) de tampón de lavado, en SSC a 2X, SDS al 0,1%, durante 30 minutos a 65 °C, seguido de un segundo lavado en un volumen adecuado de tampón de lavado (típicamente 50 ml) en el mismo tampón de lavado (SSC a 2X, SDS al 0,1%) para un lavado de rigor medio, o SSC a  
35 0,1X, SDS al 0,1% durante 10 minutos a 65 °C (rigor alto), pudiéndose repetir el segundo lavado a 70 °C para un lavado de rigor muy alto.

La secuencia nucleotídica utilizada en los métodos de la presente invención puede comprender secuencias que codifican la SEQ ID n.º 3.

40 En particular, en la presente memoria se describe un plásmido o sistema de vector que comprende una fitasa tal y como se describe en la presente memoria o un homólogo o derivado de la misma. Preferentemente, el plásmido o sistema de vector comprende una secuencia de ácido nucleico como la presentada en la SEQ ID n.º 2 o una secuencia que es homóloga al menos al 80% con ésta o un fragmento eficaz de la misma. Convenientemente, el plásmido o sistema de vector es un vector de expresión para la expresión de alguna de las enzimas codificadas por una secuencia de ácido nucleico tal y como se presenta en una cualquiera de la SEQ ID n.º 2 o de una secuencia  
45 que es homóloga (idéntica) al menos al 80% a ésta en un microorganismo. En la presente memoria se describen vectores de expresión adecuados. Además, la invención da a conocer un plásmido o sistema de vector para la expresión de cualquiera de las enzimas modificadas o variantes o fragmentos funcionales descritos en la presente memoria. Los vectores de expresión convenientes se describen en la presente memoria.

#### Variantes de fitasa

50 La presente invención da a conocer métodos para preparar una variante de la enzima fitasa en donde la mejora de las características de una fitasa madre se puede realizar mediante la modificación de uno o más restos aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la fitasa madre.

Las enzimas fitasa utilizadas como enzimas madre de acuerdo con la presente invención incluyen fitasas de tipo silvestre de bacterias, en particular, fitasas que preferentemente se pueden obtener o derivar de *Buttiauxella sp.* que  
55 tienen la secuencia de aminoácidos que se ofrece en la SEQ ID n.º 3 o un fragmento eficaz de la misma, o una secuencia de aminoácidos con una identidad con la SEQ ID n.º 3 de más del 80%, preferentemente de más del 90%, más preferentemente de más del 95%, 96%, 97%, 98%, preferentemente de más del 99% (a saber, polipéptido



homólogo).

Las variantes mejoradas de la enzima fitasa preparadas por los métodos de la invención tienen preferentemente una identidad con la SEQ ID n.º 3 o con un fragmento eficaz de la misma de más del 80%, más preferentemente de más del 90%, más preferentemente de más del 95%, 96%, 97%, 98%, preferentemente de más del 99%. Sin embargo, se contempla también que las variantes puedan ser heterólogas (a saber, no homólogas) a la SEQ ID n.º 3. Por ejemplo, las variantes producidas por técnicas de recombinación tales como la recombinación exomeciada, o el barajado de familias, pueden dar lugar a variantes, aunque se hayan preparado con la fitasa madre de acuerdo con la presente invención, que pueden tener una homología de menos del 75%.

Los alineamientos de secuencia así como la determinación de las identidades de secuencia se pueden realizar convenientemente por medio de programas informáticos conocidos en la técnica, tales como GAP proporcionado en el paquete de programas GCG (Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) *Journal of Molecular Biology*, 48, págs. 443-453). GAP se puede utilizar con los siguientes ajustes para la comparación de secuencias de polipéptidos: penalización de la creación de huecos de 3,0 y penalización de extensión del hueco de 0,1. Los alineamientos de secuencia se utilizan, por ejemplo, para determinar las posiciones correspondientes en los polipéptidos homólogos.

Las enzimas fitasa se caracterizaron tras su expresión heteróloga en uno o más de los siguientes hospedadores de expresión: *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*. Se pueden utilizar otros hospedadores de expresión.

Las mejoras de las características de la fitasa de acuerdo con la presente invención se dirigen al uso en el procesamiento de alimentos y pienso para consumo animal, así como para el uso como un aditivo para productos alimenticios y de pienso animal. En particular, las mejoras se dirigen a la estabilidad en las condiciones de procesamiento de alimentos y de piensos para animales, a la estabilidad durante el tránsito por el estómago y a la actividad y estabilidad en el estómago y/o los intestinos de un animal o de un humano. Tales mejoras comprenden, entre otros parámetros, el incremento de la estabilidad a temperaturas elevadas, preferentemente a cualquier temperatura por encima de 65 °C, el incremento de la estabilidad frente a la digestión proteolítica, preferentemente a las proteasas del tubo digestivo, el incremento de la actividad catalítica a pH bajo, preferentemente una actividad catalítica por debajo de pH 5,5, y la eficacia general de escisión de los grupos fosfato del fitato.

El incremento de la estabilidad a altas temperaturas se cuantifica mediante la temperatura de inactivación de la enzima. La temperatura de inactivación se define como la temperatura a la que la actividad residual de una enzima fitasa después de la incubación durante un tiempo determinado y el posterior enfriamiento a temperatura ambiente es el 50% de la actividad residual de la misma enzima fitasa incubada durante el mismo tiempo en las mismas condiciones a temperatura ambiente. Las diferencias de termoestabilidad son las diferencias en °C entre las temperaturas de inactivación de las dos enzimas.

Las posiciones y/o regiones a mutar para obtener características mejoradas se encontraron mediante el análisis de la secuencia y de la estructura de las fitasas de tipo silvestre, así como mediante mutagénesis de las enzimas madre, en particular mediante la introducción de mutaciones en la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre que se ofrece en la SEQ ID n.º 3, y el escrutinio para identificar las variantes de la enzima con características mejoradas. Por ese motivo se ha identificado que determinadas regiones y posiciones dentro de las enzimas madre son significativas porque mejoraran las características de las enzimas fitasa.

Por consiguiente, la invención se refiere a los métodos para preparar variantes de fitasa con mejores características que, cuando se comparan con la fitasa madre, comprenden mutaciones en una o más de las posiciones siguientes (numeradas de acuerdo con la numeración en la SEQ ID n.º 3):

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

y/o en las correspondientes posiciones en una fitasa homóloga a la fitasa que se muestra en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3. Estas posiciones se caracterizan por que la mutagénesis de estas posiciones condujo a una mejora de las características de las enzimas.

K59E; T167V; K240T; T167I; K240E; D244C; Q289Y; T209K y F197S o mutaciones conservativas en cada posición.

Las combinaciones preferentes y específicas de las mutaciones incluyen:

D125E/H193R;

A294E/N303K;

T167I/K240T;

D223E/K240E/N351D;

T167I/K240T/A294E/N303K;

T167I/K240E/A242S/A294E/N303K;

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

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

A122T/DI25E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K;

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

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

N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K.

#### Métodos para preparar variantes de fitasa

10 En una realización amplia, la invención da a conocer métodos para preparar una o más variantes de la enzima fitasa.

En una realización más preferente, la presente invención se refiere a un método de los siguientes párrafos numerados.

1. Un método de preparación de una variante de la enzima fitasa, comprendiendo dicho método las siguientes etapas secuenciales:

15 a) seleccionar al menos una enzima fitasa madre, en donde la al menos una enzima fitasa madre es un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en:

- un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID n.º 3 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80% con ésta;

20 • un polipéptido que se puede obtener de la cepa P1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada con el número de acceso NCIMB 41248;

- un polipéptido que se puede obtener mediante la expresión de la SEQ ID n.º 2 o una secuencia nucleotídica que se puede obtener de la cepa P1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada con el número de acceso NCIMB 41248 o una secuencia nucleotídica que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con ésta; y

25 • un polipéptido que se puede obtener de la cepa P1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada con el número de acceso NCIMB 41248 y en donde el péptido se obtiene mediante la expresión de la SEQ ID n.º 2 o de una secuencia nucleotídica que se puede obtener de la cepa P1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada con el número de acceso NCIMB 41248 o de una secuencia nucleotídica que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con ésta,

30 en donde dicho polipéptido tiene actividad fitasa, en donde dicho polipéptido tiene una actividad específica de al menos 300 U/mg, en donde dicha actividad específica se determina mediante la incubación de dicho polipéptido en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a pH 3,5, a una temperatura de 37 °C;

35 b) generar al menos una variante de fitasa mediante la introducción de al menos una alteración de dicha enzima fitasa madre que es una inserción, una delección o una sustitución o una combinación de las mismas, de un resto de aminoácido en dicha enzima fitasa madre para obtener al menos una variante de la enzima fitasa;

c) escrutar dicha al menos una variante de la enzima fitasa para identificar una variante mejorada de la enzima fitasa, que en comparación con la enzima fitasa madre tiene una o varias propiedades mejoradas seleccionadas entre:

i. mayor termoestabilidad; y/o

40 ii. mayor actividad específica; y/o

iii. mayor estabilidad proteolítica;

d) preparar dicha variante mejorada de la enzima fitasa.

2. Un método de acuerdo con el párrafo 1, en el que dicho polipéptido está aislado y/o purificado.

45 3. Un método de acuerdo con los párrafos 1 o 2, caracterizado por que dicho polipéptido tiene una actividad máxima alrededor de pH 3 a 6, en donde dicha actividad se determina mediante la incubación de dicho polipéptido en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a una temperatura de

37 °C.

4. Un método de acuerdo con los párrafos 1 o 2, caracterizado por que dicho polipéptido tiene un máximo de actividad a un pH aproximado de 4 a 5, en donde dicha actividad se determina mediante la incubación de dicho polipéptido en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a una temperatura de 37 °C.
5. Un método de acuerdo con los párrafos 1 o 2, caracterizado por que dicho polipéptido tiene un máximo de actividad a aproximadamente pH 4,5, en donde dicha actividad se determina mediante la incubación de dicho polipéptido en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a una temperatura de 37 °C.
- 10 6. Un método como el descrito en uno cualquiera de los párrafos 1 a 5, que comprende mutaciones en al menos una de las siguientes posiciones, numeradas de acuerdo con la numeración en la SEQ ID n.º 3: K 59, T 70, A 122, D 125, T 167, H 193, F 197, T 204, T 209, A 211, S 221, I 223, S 225, K 240, A 242, D 244, A 268, S 281, Q 289, A 294, N 303, I 336 o N 351.
- 15 7. Un método como el descrito en uno cualquiera de los párrafos 1 a 6, en donde dicho polipéptido comprende una o varias de las siguientes mutaciones:
- K 59 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
- T 70 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y; o
- A 122 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
- D 125 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
- 20 T 167 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y; o
- H 193 A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
- F 197 A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
- T 204 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y; o
- T 209 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y; o
- 25 A 211 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
- S 221 A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
- I 223 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
- S 225, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y; o
- K 240 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
- 30 A 242 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
- D 244 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
- A 268 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M; N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
- S 281 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
- Q 289 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y; o
- 35 A 294 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
- N 303 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
- I 336 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
- N 351 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y.
8. Un método como el descrito en uno cualquiera de los párrafos 1 a 7, que comprende al menos una mutación seleccionada entre el grupo que consiste en: K59E; T167V; K240T; T167I; K240E; D244C; Q289Y; T209K o F197S.
- 40 9. Un método como el descrito en uno cualquiera de los párrafos 1 a 8, que comprende una combinación de mutaciones seleccionadas entre el grupo que consiste en:

D125E/H193R; o

A294E/N303K; o

T167I/K240T; o

D223E/K240E/N351D; o

5 T167I/K240T/A294E/N303K; o

T167I/K240E/A242S/A294E/N303K; o

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

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

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

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

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

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

10. Un método como el descrito en uno cualquiera de los párrafos 1 a 9, en el que dicho polipéptido comprende la combinación de las mutaciones:

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

11. Un método como el descrito en uno cualquiera de los párrafos 6 a 10, en el que dicho polipéptido es una variante de la enzima fitasa que tiene mayor termoestabilidad y/o mayor actividad específica y/o mayor estabilidad proteolítica que la enzima fitasa codificada por la SEQ ID n.º 2.

20 12. Un método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 11, en el que durante la etapa b) se genera una población de variantes de la enzima fitasa y en la etapa c) se criba al menos una proporción de dicha población de variantes de la enzima fitasa.

25 13. Un método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 12, en el que la etapa a) comprende someter a mutagénesis una secuencia nucleotídica que codifica una enzima fitasa madre, y la etapa b) comprende expresar la secuencia nucleotídica mutada obtenida en la etapa (a) en una célula hospedadora, y la etapa c) comprende el escrutinio de las células hospedadoras, o extracto(s) de las mismas, para identificar una variante mejorada de la enzima fitasa con dicha al menos una propiedad mejorada.

14. Un método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 13, que, después de la etapa c), y opcionalmente la etapa d), comprende adicionalmente al menos una ronda posterior de repetición de las etapas a) a c), y opcionalmente la etapa d).

30 15. Un método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 14, en el que la etapa c) comprende el escrutinio de las células hospedadoras que expresan una variante mejorada de la enzima fitasa que, en comparación con dicha enzima fitasa madre, tiene una diferencia de termoestabilidad de al menos 2,5 °C, en donde la diferencia de la termoestabilidad se calcula mediante la sustracción de la temperatura de inactivación de la enzima fitasa madre de la temperatura de inactivación de la enzima fitasa mejorada, en el que la temperatura de inactivación es la temperatura a la que la actividad residual es del 50% después de la incubación durante 10 min y el posterior enfriamiento a temperatura ambiente, en comparación con la actividad residual después de la incubación durante el mismo tiempo en las mismas condiciones a temperatura ambiente.

40 16. Un método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 15, en el que la etapa c) comprende el escrutinio de las células hospedadoras que expresan una variante mejorada de la enzima fitasa que, en comparación con dicha enzima fitasa madre, tiene una estabilidad frente a la pepsina de al menos el 30% de la actividad residual, en donde la actividad residual se calcula comparando la actividad medida a pH 3,5, 37 °C, después de la incubación durante 2 horas a pH 2,0 con pepsina a 0,25 mg/ml, CaCl<sub>2</sub> a 1 mM y SAB a 5 mg/ml a 37 °C, con la actividad después de la incubación durante 2 horas a pH 5,0, CaCl<sub>2</sub> a 1 mM y SAB a 5 mg/ml a 37 °C sin pepsina.

45 17. Un método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 16, en el que la etapa c) comprende el escrutinio de las células hospedadoras para identificar las que expresan una variante mejorada de la enzima fitasa que, en comparación con dicha enzima fitasa madre, tiene una proporción de actividad específica de al menos el 110%.

En una realización preferente, el método de preparación de una variante de la enzima fitasa comprende las siguientes etapas secuenciales:

- 5 a) Seleccionar al menos una enzima fitasa madre, en donde la al menos una enzima fitasa madre se selecciona entre i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que corresponde a la fitasa de *Buttiauxella sp.*, o una forma modificada, un polipéptido homólogo, una variante, un equivalente funcional o un fragmento eficaz, de la misma, como está descrito en la presente memoria o ii) al menos una variante de la enzima fitasa como la descrita en la presente memoria;
- b) generar al menos una variante de fitasa mediante la introducción de al menos una alteración de dicha enzima fitasa madre que es una inserción, una delección o una sustitución o una combinación de las mismas, de un resto de aminoácido en dicha enzima fitasa madre para obtener al menos una variante de la enzima fitasa;
- 10 c) escrutar dicha al menos una variante de la enzima fitasa para identificar una variante mejorada de la enzima fitasa, que en comparación con la enzima fitasa madre, tiene una o más propiedades mejoradas seleccionadas entre:
- i) mayor termoestabilidad y/o
  - ii) actividad específica y/o
  - iii) estabilidad proteolítica
- 15 d) Preparar dicha variante mejorada de la enzima fitasa, preferentemente para producir una variante de la enzima fitasa aislada y/o purificada.
- En una realización preferente, durante la etapa b) se genera una población de variantes de la enzima fitasa y en la etapa c) se criba al menos una proporción de dicha población de las variantes de la enzima fitasa.
- 20 En una realización preferente, la etapa a) comprende someter a mutagénesis una secuencia nucleotídica de acuerdo con las reivindicaciones 11 a 13 que codifica una enzima fitasa madre y b) comprende expresar en una célula hospedadora la secuencia nucleotídica mutada obtenida en la etapa (a), y la etapa c) comprende el escrutinio de las células hospedadoras, o extracto(s) de las mismas, para identificar una variante mejorada de la enzima fitasa con dicha al menos una propiedad mejorada.
- 25 En otra realización, después de la etapa c), y opcionalmente la etapa d), comprende adicionalmente al menos una ronda posterior de repetición de las etapas a) a c) y opcionalmente la d), en donde, preferentemente, en dicha ronda o rondas posteriores, la al menos una enzima fitasa madre de la etapa a) se selecciona entre dicha al menos una variante de la enzima fitasa y/o una variante mejorada de fitasa preparadas de acuerdo con el método.
- 30 En otra realización, preferentemente, la etapa c) comprende el escrutinio de las células hospedadoras para identificar las que expresan una variante mejorada de la enzima fitasa que en comparación con i) dicha enzima fitasa madre y/o ii) un polipéptido que comprende la SEQ ID n.º 3 o fragmento funcional del mismo, tiene una diferencia de termoestabilidad de al menos 2,5.
- 35 En otra realización, la etapa c) comprende el escrutinio de las células hospedadoras para identificar las que expresan una variante mejorada de la enzima fitasa que, en comparación con i) dicha enzima fitasa madre y/o ii) un polipéptido que comprende la SEQ ID n.º 3 del fragmento funcional de la misma, tiene una estabilidad frente a la pepsina de al menos 30.
- En otra realización, la etapa c) comprende el escrutinio de las células hospedadoras para identificar las que expresan una variante mejorada de la enzima fitasa que, en comparación con i) dicha enzima fitasa madre y/o ii) un polipéptido que comprende la SEQ ID n.º 3, tiene una proporción de actividad específica de al menos 110 en comparación con la fitasa codificada por la SEQ ID n.º 3.
- 40 La invención también da a conocer un método de preparación de una variante de la enzima fitasa, comprendiendo dicho método:
- a) seleccionar una enzima fitasa madre, en donde la enzima fitasa madre se selecciona entre
- i. una enzima fitasa madre con una homología de al menos el 80% con la SEQ ID n.º 3
  - ii. una enzima fitasa madre procedente de *Buttiauxella spp.*
- 45 iii. al menos una variante de la enzima fitasa
- b) realizar al menos una alteración que es una inserción, una delección o una sustitución de un resto de aminoácido en la enzima fitasa madre para obtener una variante de la enzima fitasa,
- c) escrutar para identificar una variante de la enzima fitasa que, en comparación con la enzima fitasa madre, tiene mejores características, como se describe en la presente memoria, preferentemente seleccionada entre una o más de:
- 50

- i. mayor termoestabilidad y/o
- ii. actividad específica y/o
- iii. estabilidad proteolítica y/o

d) Preparar la variante de la enzima fitasa.

5 Opcionalmente, se pueden repetir al menos las etapas a) a c) en uno o más rondas posteriores (iterativas). Por consiguiente, se contempla que la enzima fitasa madre es una variante de la enzima fitasa preparada mediante ciclos previos del método a) a c) anterior.

En otra realización, la invención da a conocer un método de preparación de una variante de fitasa, que comprende las etapas siguientes:

10 (a) proporcionar una enzima fitasa madre, seleccionada entre

- (i) una enzima fitasa con una homología de al menos el 80% con la SEQ ID n.º 3
- (ii) una enzima fitasa procedente de *Buttiauxella spp.*,
- (iii) al menos una variante de la enzima fitasa

15 (b) generar una población de variantes de fitasa mediante la alteración de la fitasa madre. Preferentemente, dicha alteración o alteraciones se obtienen mediante una inserción, delección o sustitución de al menos un resto de aminoácido en la fitasa madre, o cualquier combinación de las mismas.

(c) escrutar la población para identificar una variante de fitasa que, en comparación con la enzima fitasa madre, tiene unas características mejoradas, como se describe en la presente memoria, preferentemente seleccionada entre una o más de:

- 20
- (i) mayor termoestabilidad y/o
  - (ii) mayor actividad específica y/o
  - (iii) mayor estabilidad proteolítica

(d) seleccionar una o más variantes de fitasa en la población de fitasas.

25 (e) opcionalmente, repetir las etapas (a) a (c) de forma cíclica y, preferentemente, en donde las variantes de fitasa que se seleccionaron en un ciclo se utilizan como fitasas iniciadoras en el siguiente ciclo.

En otra realización, la invención da a conocer un método de preparación de una variante de la enzima fitasa, comprendiendo dicho método:

a) Someter a mutagénesis la secuencia nucleotídica que codifica una enzima fitasa madre, en donde la enzima fitasa madre se selecciona entre

- 30
- i. una enzima fitasa madre con al menos el 80% de homología con la SEQ ID n.º 3
  - ii. una enzima fitasa madre procedente de *Buttiauxella spp.*
  - iii. al menos una variante de la enzima fitasa

b) Expresar la secuencia nucleotídica mutada obtenida en la etapa (a) en una célula hospedadora, y

35 c) Escrutar las células hospedadoras para identificar las que expresan una variante de la enzima fitasa que, en comparación con la enzima fitasa madre, tiene mejores características, como se describe en la presente memoria, preferentemente seleccionadas entre una o más de:

- i) mayor termoestabilidad y/o
- ii) mayor actividad específica y/o
- iii) mayor estabilidad proteolítica y/o

40 d) Preparar la variante de la enzima fitasa expresada por la célula hospedadora.

Opcionalmente, las etapas a) a c), incluida opcionalmente la etapa d), se pueden repetir en una o más rondas posteriores (iterativas).

En otra realización, la invención da a conocer un método de preparación de una variante de fitasa, que comprende las etapas siguientes:

5 (a) someter a mutagénesis una secuencia nucleotídica que codifica una enzima fitasa madre para generar una población de variantes por alteración de los nucleótidos, en donde preferentemente dichas una o más alteraciones se obtienen mediante una inserción, delección o sustitución de al menos un resto de aminoácido en la fitasa madre, o cualquier combinación de las mismas, y en donde la enzima fitasa madre se selecciona entre

- (i) una enzima fitasa con una homología de al menos el 80% a la SEQ ID n.º 3
- (ii) una enzima fitasa procedente de *Buttiauxella spp.*,
- (iii) al menos una variante de la enzima fitasa

10 (b) expresar la población de variantes nucleotídicas obtenidas en la etapa (a) en una población de las correspondientes células hospedadoras y

(c) escrutar la población para identificar una variante de fitasa que, en comparación con la enzima fitasa madre, tiene unas mejores características, como se describe en la presente memoria, preferentemente seleccionada entre una o más de:

- 15 (i) mayor termoestabilidad y/o
- (ii) mayor actividad específica y/o
- (iii) mayor estabilidad proteolítica,

(d) seleccionar una o más variantes de fitasa de la población de fitasas.

20 (e) opcionalmente, repetir las etapas (a) a (c) de manera cíclica, y en donde, preferentemente, las variantes de fitasa seleccionadas en un ciclo se utilizan como fitasas iniciadoras del ciclo siguiente.

En los métodos anteriores para preparar una variante de la enzima fitasa, cuando sea apropiado, dicha secuencia nucleotídica es preferentemente una secuencia de ADN.

25 La secuencia de nucleótidos es preferentemente cualquier molécula de ácido nucleico o secuencia nucleotídica aislada y/o purificada que codifica la enzima que comprende la secuencia de aminoácidos que corresponde a la fitasa de *Buttiauxella sp.*, o un homólogo de la misma como se describe en la presente memoria.

La fitasa madre se selecciona preferentemente entre la SEQ ID n.º 3 o un fragmento funcional de la misma o un homólogo de la fitasa de *Buttiauxella sp.* como se describe en la SEQ ID n.º 3 como se describe en la presente memoria.

30 En las realizaciones anteriores de la invención, que se refieren a los métodos de preparación de variantes de la enzima fitasa, la enzima/nucleótido fitasa madre que codifica una enzima/nucleótido fitasa madre es preferentemente una fitasa de tipo silvestre.

35 No obstante, en otra, la madre puede ser una variante preparada mediante rondas previas de mutagénesis. A saber, en una realización, los métodos para preparar variantes de la enzima fitasa son iterativos, en donde las etapas a) a c) (que opcionalmente incluyen la etapa d)) se repiten al menos más de una vez. En tales realizaciones, los métodos de mutagénesis utilizados en la primera ronda de mutagénesis son preferentemente PCR propensa a errores, más preferentemente PCR en el umbral de errores. Las rondas posteriores también pueden ser de PCR propensa a errores, más preferentemente de PCR en el umbral de errores, pero puede ser alternativamente mutagénesis basada en la recombinación, en donde, durante una segunda o posterior ronda de mutagénesis se recombinan los grupos de al menos dos variantes mejoradas independientes que se identifican en una primera ronda de mutagénesis, para dar al menos una variante recombinante (p. ej., con el uso de los métodos de barajado de familias o de reacción en cadena de la recombinasa).

40 Será evidente para el experto en la técnica que también se pueden utilizar métodos de mutagénesis alternativos, entre ellos, diseño racional, mutagénesis de barrido del sitio o mutagénesis inducida por radiación/químicamente.

45 En las realizaciones anteriores de la invención, que se refieren a los métodos de preparación de variantes de la enzima fitasa, se escrutan las variantes de la enzima fitasa para identificar preferentemente una mayor termoestabilidad.

50 En las realizaciones anteriores, que se refieren a los métodos de preparación de variantes de la enzima fitasa, las variantes de la enzima fitasa se escrutan preferentemente por al menos un único parámetro, preferentemente seleccionado entre mayor termoestabilidad, mayor estabilidad proteolítica o mayor actividad específica, más preferente una mayor termoestabilidad.

Preferentemente, el escrutinio de dicho primer parámetro se realiza en al menos una primera ronda de mutagénesis que comprende al menos las etapas a) a c), en donde c) comprende al menos el escrutinio de dicho primer parámetro. Esta primera ronda de mutagénesis puede ir seguida entonces de más rondas (iterativas) de mutagénesis y selección que comprenden las etapas a) a c) (incluida opcionalmente la etapa d)), en donde la  
5 selección en dichas rondas adicionales se pueden seleccionar entre los mismos parámetros de selección que se utilizaron en la etapa c) de dicha primera ronda, o alternativamente un parámetro diferente.

Durante las rondas iterativas de los métodos anteriores para preparar una variante de la enzima fitasa, preferentemente dicho primer parámetro se selecciona entre mayor termoestabilidad, mayor estabilidad proteolítica o mayor actividad específica, lo más preferentemente mayor termoestabilidad. Preferentemente, cuando se ha  
10 realizado una primera ronda de mutagénesis para seleccionar variantes con una mayor termoestabilidad, durante una posterior o posteriores rondas (iterativas) de mutagénesis que comprenden las etapas a) a c), dicho parámetro se selecciona entre mayor termoestabilidad, mayor estabilidad proteolítica o mayor actividad específica, lo más preferentemente mayor estabilidad proteolítica o mayor actividad específica.

En las realizaciones anteriores de la invención, que se refieren a los métodos para preparar variantes de la enzima fitasa, se escruta la variante de la enzima fitasa preferentemente en busca de mayor termoestabilidad y mayor  
15 estabilidad proteolítica y mayor actividad específica en al menos una ronda de mutagénesis (etapas a) a c)), preferentemente más de una ronda, a saber, rondas iterativas de selección.

La enzima fitasa madre procede preferentemente de *Buttiauxella* P1-29.

En los métodos de preparación de una variante de la enzima fitasa, comprendiendo dicho método someter a mutagénesis la secuencia de ADN que codifica una enzima de la fitasa madre, la secuencia de ADN que codifica  
20 una enzima fitasa madre se somete preferentemente a mutagénesis aleatoria, más preferentemente a PCR propensa a errores, incluso más preferentemente a PCR en el umbral de errores.

Los métodos preferentes de mutagénesis de la secuencia de ADN que codifica una enzima fitasa madre son la PCR propensa a errores, más preferentemente la PCR en el umbral del error, pudiéndose utilizar otros métodos de mutagénesis en lugar de la PCR propensa a errores/en el umbral del error o junto con la PCR propensa a errores/en  
25 el umbral del error. Véase el ejemplo 12 que da a conocer referencias para los métodos adecuados de PCR propensa a errores y PCR en el umbral del error. Otro método adecuado para la PCR mutagénica lo describen Cadwell y Joyce (*PCR Methods Appl.* 3 (1994), 136-140).

La terminología «expresión en una célula hospedadora» cuando se utiliza en el contexto de las realizaciones que se refieren a «un método de preparación de una variante de la enzima fitasa» se define preferentemente como la  
30 producción de la variante de la enzima fitasa en un organismo, órgano o célula vivos, tal y como se define en la presente memoria. Los hospedadores preferentes son *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*. Las enzimas fitasa detalladas en la presente memoria se caracterizaron tras su expresión heteróloga en uno o más de los siguientes hospedadores de expresión: *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces*  
35 *cerevisiae*.

Sin embargo, se considera que para el propósito de selección de las variantes de la enzima fitasa que se describen en la presente memoria, tales métodos pueden emplear métodos *in vitro* de expresión de variantes de la enzima fitasa, preferentemente para el uso en la etapa (c) de dichos métodos, que utilizan la maquinaria de transcripción y traducción aislada de una o más células aisladas de uno o más organismos vivos o virus. Tal producción *in vitro* de  
40 variantes de fitasa sobre la invención también se puede utilizar para seleccionar las variantes de fitasa preferentes. La expresión *in vitro* se puede realizar convenientemente mediante técnicas estándares. Para referencia, por favor, véase la «Guía de expresión *in vitro*» disponible de Promega Inc (Part n.º BR053).

#### Definiciones de fenotipos de variantes

Las variantes con mayor termoestabilidad (diferencia de termoestabilidad) se determinan preferentemente con los  
45 métodos descritos en el ejemplo 12.

La variante de la enzima fitasa preparada por el método de preparación de variantes de la enzima fitasa tiene preferentemente una diferencia de termoestabilidad (D.T.) de al menos 1,5, más preferentemente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, lo más preferentemente al menos 20.

Las variantes con mayor estabilidad proteolítica se determinan preferentemente mediante los métodos descritos en  
50 el ejemplo 12.

Preferentemente, la variante de la enzima fitasa preparada mediante los métodos de la invención tiene una estabilidad proteolítica (actividad residual) de al menos el 45%, preferentemente del 50%, 55%, más preferentemente al menos del 60% o el 65%, lo más preferentemente al menos del 70%.

Preferentemente, la variante de fitasa preparada mediante los métodos de la invención tiene una actividad específica  
55 mayor del 100% de la actividad de la silvestre a pH 4,0, preferentemente mayor del 105%, 110%, más



preferentemente mayor del 114%.

**Otras realizaciones de variantes sólo con propósitos ilustrativos**

En otra realización de la presente memoria se describen métodos de preparación de un pienso para consumo animal que comprende una variante de la enzima fitasa, comprendiendo dicho método las etapas secuenciales de i) realizar uno o más de los métodos anteriores para preparar una variante de la enzima fitasa y ii) añadir la variante preparada de la enzima fitasa a un pienso para consumo animal.

En una realización específica, la descripción da a conocer un método de preparación de un pienso para consumo animal que comprende una variante de la enzima fitasa, comprendiendo dicho método

a) Seleccionar una enzima fitasa madre, en donde la enzima fitasa madre se selecciona entre

- 10 i. una enzima fitasa madre con una homología de al menos el 75% a la SEQ ID n.º 3 o fragmento funcional de la misma,
- ii. una enzima fitasa madre procedente de *Buttiauxella spp.*, preferentemente de *Buttiauxella* P1-29 y/o
- iii. al menos una variante de la enzima fitasa;

b) Realizar al menos una alteración que es una inserción, una delección o una sustitución de un resto de aminoácido en la enzima fitasa madre para obtener una variante de la enzima fitasa.

c) Escrutar para identificar una variante de la enzima fitasa que, en comparación con la enzima fitasa madre, tiene unas mejores características, como se describe en la presente memoria, preferentemente seleccionadas entre una o más de:

- i) mayor termoestabilidad y/o
- 20 ii) actividad específica y/o
- iii) estabilidad proteolítica y/o

(d) Preparar la variante de la enzima fitasa

e) Añadir la variante de la enzima fitasa preparada a un pienso para consumo animal.

En otra realización, la descripción da a conocer métodos para preparar un pienso para consumo animal que comprende una variante de la enzima fitasa.

a) Someter a mutagénesis la secuencia nucleotídica (preferentemente ADN) que codifica una enzima fitasa madre, en donde dicho ácido nucleico se selecciona entre un ácido nucleico que codifica

- i. una enzima fitasa madre con homología de al menos el 75% a la SEQ ID n.º 3 o fragmento funcional de la misma, y/o
- 30 ii. una enzima fitasa madre procedente de *Buttiauxella spp.*, preferentemente de *Buttiauxella* P1-29.

b) Expresar la secuencia nucleotídica mutada (preferentemente ADN) obtenida en la etapa (a) en una célula hospedadora y

c) Escrutar las células hospedadoras para identificar las que expresan una variante de la enzima fitasa que, en comparación con la enzima fitasa madre, tiene mejores características, como está descrito en la presente memoria, preferentemente seleccionadas entre una o más de:

- i. mayor termoestabilidad y/o
- ii. mayor actividad específica y/o
- iii. mayor estabilidad proteolítica y/o

d) Preparar la variante de la enzima fitasa expresada por la célula hospedadora.

40 f) Añadir la variante de la enzima fitasa a un pienso para consumo animal.

Las realizaciones descritas y los aspectos preferentes del método de preparación de una variante de la enzima fitasa también se aplican a los métodos anteriores para preparar un pienso para consumo animal que comprende una variante de la enzima fitasa.

En otro aspecto de la invención se proporciona una célula hospedadora transformada o transfectada con un ácido

nucleico que codifica una fitasa tal y como se describe en la presente memoria.

Convenientemente, la célula hospedadora de acuerdo con este aspecto de la invención comprende una fitasa que comprende una secuencia de aminoácidos, o un fragmento funcional de la misma, como se expone en la SEQ ID n.º 3 o una secuencia que es homóloga al menos al 80% a ésta.

- 5 En una realización preferente, dicha célula hospedadora produce una fitasa.

En otro aspecto de la invención se da a conocer una célula hospedadora transformada o transfectada con un ácido nucleico que codifica una fitasa de acuerdo con la invención. Preferentemente, la fitasa es una fitasa de *Buttiauxella* sp., como se describe en la presente memoria, o un homólogo o derivado de la misma. Convenientemente, dicha enzima fitasa comprende una secuencia de aminoácidos, o un fragmento funcional de la misma, como se expone en una cualquiera de SEQ ID n.º 3 o una secuencia que es homóloga (idéntica) al menos al 80% a ésta. Preferentemente, dicha célula hospedadora produce una fitasa.

- 10

En una realización, la secuencia nucleotídica que se puede utilizar en la presente invención se puede obtener (aunque realmente no tiene necesariamente que obtenerse) de *Buttiauxella* sp., aunque se reconocerá que se pueden utilizar igualmente las enzimas aisladas y/o purificadas de cepas equivalentes.

- 15 Convenientemente, la célula hospedadora procede de un microorganismo que incluye bacterias y hongos, entre ellos levadura. En una realización particularmente preferente, la célula hospedadora es una célula bacteriana procarionta. Las células hospedadoras bacterianas idóneas incluyen bacterias de diferentes grupos taxonómicos procariontas, entre ellos las proteobacterias, que incluyen miembros de las subdivisiones  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , bacterias grampositivas tales como actinomicetos, firmicutos, clostridios y congéneres, flavobacterias, cianobacterias, bacterias verdes del azufre, bacterias verdes que no son del azufre y arqueas. Particularmente preferentes son las *Enterobacteriaceae* tales como las proteobacterias de *Escherichia coli* que pertenecen a la subdivisión  $\gamma$  y las bacterias grampositivas pobres en GC tales como *Bacillus*.
- 20

Las células hospedadoras fúngicas adecuadas incluyen las levaduras seleccionadas entre el grupo que consiste en *Ascomycota* que incluyen *Saccharomyces* tales como *Pichia*, *Hansenula* y *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* tales como *Schizosaccharomyces pombe* y *Ascomycota* anamórficos entre ellos *Aspergillus*.

- 25

Otras células hospedadoras eucariotas adecuadas incluyen células de insectos tales como las células SF9, SF21, *Trypplusiani* y M121. Por ejemplo, los polipéptidos de acuerdo con la invención se pueden expresar ventajosamente en sistemas de insectos. Al igual que se pueden expresar en las células de insectos en cultivo, los genes de fitasa se pueden expresar en insectos enteros. Los vectores víricos tales como el baculovirus permiten la infección de insectos enteros. Los insectos grandes, tales como la polilla de la seda, proporcionan un gran rendimiento de proteína heteróloga. La proteína se puede extraer de los insectos de acuerdo con las técnicas de extracción convencionales. Los vectores de expresión adecuados para uso en la invención incluyen todos los vectores que son capaces de expresar proteínas foráneas en las líneas celulares de insectos.

- 30

Otras células hospedadoras incluyen células vegetales seleccionadas entre el grupo que consiste en protoplastos, células, callos, tejidos, órganos, semillas, embriones, óvulos, cigotos, etc. La invención también da a conocer plantas enteras que han sido transformadas y comprenden el ADN recombinante de la invención.

- 35

La terminología «planta» o «vegetal» generalmente incluye algas eucariotas, embriofitas entre ellas *Bryophyta*, *Pteridophyta* y *Spermatophyta* tales como gimnospermas y angiospermas.

- 40 Preferentemente, dicha célula hospedadora es un microorganismo. Los microorganismos preferentes incluyen células bacterianas procariontas, preferentemente, *E. coli*, *B. subtilis* y otras especies del género *Bacillus*, levadura, preferentemente *Hansenula polymorpha* y *Schizosaccharomyces pombe*.

En otro aspecto de la invención se da a conocer una cepa de células bacterianas *Buttiauxella* sp. P1-29 depositada por Danisco Global Innovation, Sokeritehaantie 20, FIN-02460 Kantvik (Finlandia) el 22 de septiembre de 2004 con el número de acceso NCIMB 41248. Tal célula se puede incorporar directamente en el pienso para consumo animal.

- 45 En otro aspecto se da a conocer un método para producir fitasas que comprenden transfectar una célula hospedadora con un vector de expresión o plásmido de acuerdo con la invención, cultivar dicha célula hospedadora en las condiciones para la expresión de la fitasa y extraer dicha fitasa del medio de cultivo de las células hospedadoras.

- 50 Convenientemente, dicho método es para la producción de una fitasa que comprende la expresión de una secuencia de aminoácidos como la expuesta en la SEQ ID n.º 3 o una secuencia que tiene una homología de al menos el 80% con ésta o un fragmento eficaz de la misma en una célula hospedadora y extraer la proteína secretada del medio de cultivo de la célula hospedadora.

Otro aspecto de la descripción da a conocer una composición de pienso para consumo animal que comprende una fitasa de acuerdo con la invención. Preferentemente, la composición del pienso comprende una fitasa a una

concentración de 10-10 000 U/kg de pienso, preferentemente 200-2000 U/kg de pienso, más preferentemente, 500-1000 U/kg de pienso.

En una realización, la composición del pienso comprende una célula hospedadora de acuerdo con la descripción.

- 5 En otro aspecto se da a conocer el uso de una fitasa de acuerdo con la descripción en los alimentos o el pienso para consumo animal.

### ASPECTOS PREFERENTES

Los aspectos preferentes se presentan en las reivindicaciones acompañantes y en la descripción siguiente y el apartado de ejemplos.

### VENTAJAS ADICIONALES – sólo con propósitos ilustrativos

- 10 La presente descripción es ventajosa porque da a conocer fitasas que tienen una serie de propiedades que las hacen particularmente útiles como aditivos para los piensos para consumo animal.

En particular, las fitasas de la presente invención son activas a pH bajo y, preferentemente, en el intervalo de pH de 2 a 5,5, con un máximo de actividad alrededor de pH 4 a 4,5. Convenientemente, las fitasas de la presente descripción son activas al pH bajo del medio del estómago (al conservar aproximadamente el 40% de la actividad máxima a pH 2,5).

- 15

Además, las fitasas de la presente descripción se secretan con eficacia tanto en el hospedador nativo como durante la expresión heteróloga, lo que conduce a una producción y al aislamiento más eficaces para la adición al pienso.

- 20 Además, las fitasas de la presente descripción, preferentemente, tienen una amplia especificidad de sustrato, que incluye sustratos penta-, tetra-, tri- y difosfato, por lo que se incrementa la cantidad total disponible de fosfato para la absorción por el animal (fosfato disponible). Las fitasas de la presente descripción también tienen, preferentemente, una actividad específica alta en la región de 300 U/mg ± aproximadamente el 10%, preferentemente al menos 300 U/mg.

Los productos de la presente descripción se pueden utilizar como aditivos/complementos para alimentos y pienso. Los productos también pueden ser útiles para la producción comercial de diferentes fosfatos de inositol.

### 25 FITATO/ÁCIDO FÍTICO/FITASAS

El ácido fítico (hexakisfosfato de *myo*-inositol) es un constituyente importante de los cultivos de cereales, legumbres y colza. Su forma salina, el fitato, es la mayor forma de almacenamiento del fósforo en estas plantas.

Las fitasas catalizan la hidrólisis de monoésteres de fosfato del ácido fítico, y dan lugar a la formación escalonada de pentakis-, tetrakis-, tris-, bis- y monofosfatos de *myo*-inositol, así como a la liberación de fosfato inorgánico.

- 30 La terminología «fitasa de tipo silvestre» o «tipo silvestre» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a una enzima fitasa con una secuencia de aminoácidos encontrada en la naturaleza.

La terminología «variante de fitasa», «variante» o «forma modificada» se refiere a una enzima fitasa con una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de una fitasa madre que tiene una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos, que en conjunto se denominan «mutaciones».

- 35 La terminología «fitasa madre» o «enzima madre» se refiere a una enzima fitasa de la cual procede una variante de fitasa. Una fitasa madre puede ser una fitasa de tipo silvestre u otra variante de fitasa. En particular, en la presente invención, una «fitasa madre» se puede obtener de una *Buttiauxella* sp. Convenientemente, la «fitasa madre» se obtiene de la cepa de *Buttiauxella* P1-29 tal y como se describe en la presente memoria que, preferentemente, tiene la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID n.º 3.

### 40 AISLADA

En un aspecto de la descripción, preferentemente, la secuencia de aminoácidos o nucleotídica está en una forma aislada. La terminología «aislada» significa que la secuencia está al menos sustancialmente libre de al menos otro componente con el que la secuencia está asociada de forma natural en la naturaleza y es como se encuentra en la naturaleza.

### 45 PURIFICADA

En un aspecto, preferentemente, la secuencia aminoacídica o nucleotídica se encuentra en una forma purificada. La terminología «purificada» significa que la secuencia se encuentra en estado relativamente puro al menos al 1%, puro al 5% o puro al 10%, más preferentemente puro al menos al 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%. En una realización preferente, cuando se hace referencia a un polipéptido, la pureza tal y como se ha definido más arriba se determina en términos de estar purificada de otros polipéptidos mediante electroforesis en SDS-PAGE. En una

- 50

realización preferente, cuando se hace referencia a un polinucleótido, la pureza tal y como está definida más arriba se determina en términos de estar purificado de otros polinucleótidos.

### SECUENCIA NUCLEOTÍDICA

5 La presente descripción abarca secuencias nucleotídicas que codifican enzimas que tienen las propiedades específicas que se definen en la presente memoria.

10 La terminología «secuencia nucleotídica» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a una secuencia oligonucleotídica, secuencia de ácido nucleico o polinucleotídica, y variante, homólogos, fragmentos y derivados de la misma (tal como porciones de la misma). La secuencia nucleotídica puede ser de origen genómico o sintético o recombinante, que puede ser bicatenaria o monocatenaria tanto si se representa la hebra sentido como la antisentido.

La terminología «secuencia nucleotídica» o «molécula de ácido nucleico» en relación con la presente invención incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético y ARN. Preferentemente significa ADN, más preferentemente una secuencia de ADNc codificante de la presente invención.

15 En una realización preferente, la secuencia nucleotídica cuando se refiere al alcance propiamente dicho de la presente descripción, y cuando queda abarcada por él, no incluye la secuencia nucleotídica nativa de acuerdo con la presente descripción cuando está en su entorno natural y cuando está unida a su secuencia o secuencias asociadas de forma natural que están también en su entorno natural. Para facilitar la referencia, debemos llamar a esta realización preferente la «secuencia nucleotídica no nativa». En este sentido, la terminología «secuencia nucleotídica nativa» significa una secuencia nucleotídica completa que está en su entorno nativo y cuando está  
20 unida operativamente a un promotor entero con el que está asociada de forma natural, estando también dicho promotor en su medio natural. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos abarcada por el alcance de la presente invención se puede aislar y/o purificar después de la expresión de una secuencia de nucleótidos en su organismo nativo. Sin embargo, preferentemente, la secuencia de aminoácidos abarcada por el alcance de la presente invención puede ser expresada por una una secuencia nucleotídica en su organismo nativo, pero en donde la  
25 secuencia nucleotídica no se encuentra controlada por el promotor con el cual está asociada de forma natural dentro de ese organismo.

### PREPARACIÓN DE UNA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA

Típicamente, las secuencias nucleotídicas para uso en la presente invención se preparan con técnicas de ADN recombinante (a saber, ADN recombinante). Sin embargo, en una realización alternativa de la invención, la  
30 secuencia nucleotídica se podría sintetizar, entera o en parte, con métodos químicos bien conocidos en la técnica (véase Caruthers MH et al., (1980) *Nuc Acids Res Symp Ser* 215-23 y Horn T. et al., (1980) *Nuc Acids Res Symp Ser* 225-232).

35 Una secuencia nucleotídica que codifica o bien una enzima que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente memoria o una enzima que es adecuada para la modificación se puede identificar y/o aislar y/o purificar de cualquier célula u organismo que produzca dicha enzima. Se conocen bien varios métodos dentro de la técnica para la identificación y/o aislamiento y/o purificación de secuencias nucleotídicas. A modo de ejemplo, las técnicas de amplificación por PCR para preparar más de una secuencia se pueden utilizar una vez que se ha identificado y/o aislado y/o purificado una secuencia idónea.

40 A modo de otro ejemplo, una genoteca de ADN genómico y/o de ADNc se puede construir con ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo productor de la enzima. Si se conoce la secuencia aminoacídica de la enzima o una parte de la secuencia aminoacídica de la enzima, se pueden sintetizar sondas oligonucleotídicas marcadas y utilizarlas para identificar clones que codifican la enzima a partir de la genoteca genómica preparada del organismo. Alternativamente, una sonda oligonucleotídica marcada que contiene secuencias homólogas a otro gen conocido de  
45 la enzima se podría utilizar para identificar clones que codifican la enzima. En el último caso se utilizan condiciones de hibridación y lavado poco rigurosas.

Alternativamente, se podrían identificar clones que codifican la enzima mediante la inserción de fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, la transformación de bacterias que no expresan la enzima con la genoteca de ADN genómico resultante, y luego la siembra de las bacterias transformadas sobre  
50 placas de agar que contienen un sustrato de la enzima [p. ej., maltosa para una enzima que produce glucosidasa (maltasa)], lo que permite identificar los clones que expresan la enzima.

Aún en otra alternativa, la secuencia nucleotídica que codifica la enzima se puede preparar sintéticamente mediante los métodos estándares establecidos, p. ej., el método de fosforamiditas descrito por Beucage S. L. et al., (1981) *Tetrahedron Letters* 22, págs. 1859-1869, o el método descrito por Matthes et al., (1984) *EMBO J* 3, págs 801-805. En el método de las fosforamiditas, los oligonucleótidos se sintetizan, p. ej., en un sintetizador de ADN automático,  
55 se purifican, se alinean, se ligan y se clonan en los vectores apropiados.

La secuencia nucleotídica puede ser una mezcla de origen sintético o genómico, una mezcla de origen de ADNc y

5 sintético, o una mezcla de origen de ADNc y genómico, preparada mediante la ligación de fragmentos de origen en ADNc, genómico o sintético (cuando sea apropiado) de acuerdo con las técnicas estándares. Cada fragmento ligado corresponde a diferentes partes de la secuencia nucleotídica completa. La secuencia de ADN se puede preparar también mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos, por ejemplo, como se describe en la patente de los EE.UU. n.º US 4 683 202 o en Saiki R. K. et al., (*Science* (1988) 239, págs. 487-491).

10 Debido a la degeneración del código genético, se pueden producir fácilmente secuencias nucleotídicas en las cuales se ha cambiado el uso de tripletes codónicos, para algunos o todos los aminoácidos codificados por la secuencia nucleotídica original, por lo que se produce una secuencia nucleotídica con una homología baja con la secuencia nucleotídica original, pero que codifica la misma secuencia de aminoácidos, o una variante, que la codificada por la secuencia nucleotídica original. Por ejemplo, para la mayoría de los aminoácidos, la degeneración del código genético se encuentra en la tercera posición del triplete codónico (posición de titubeo) (para saber más, véase Stryer, Lubert, *Biochemistry*, tercera edición, Freeman Press, ISBN 0-7167-1920-7), por consiguiente, una secuencia nucleotídica en la que todos los tripletes codónicos han «titubeado» en la tercera posición sería idéntica aproximadamente al 66% con la secuencia nucleotídica original. Sin embargo, la secuencia nucleotídica corregida codificaría la misma secuencia aminoacídica primaria que la secuencia nucleotídica original, o una variante de la misma.

15 Por consiguiente, la presente invención se refiere adicionalmente al uso, en los métodos de la invención, de cualquier secuencia nucleotídica que tiene un uso de tripletes codónicos alternativos para al menos un triplete codónico codificador de aminoácido, pero que codifica la misma secuencia polipeptídica que la secuencia polipeptídica codificada por la secuencia nucleotídica original, o una variante de la misma.

Además, determinados organismos tienen típicamente sesgado cual el es triplete codónico que utilizan para codificar los aminoácidos. Las tablas de uso de codones preferentes están extensamente disponibles y se pueden utilizar para preparar genes con codones optimizados. Tales técnicas de optimización de codones se utilizan por norma para optimizar la expresión de transgenes en un hospedador heterólogo.

## 25 EVOLUCIÓN MOLECULAR

Una vez que se ha aislado y/o purificado una secuencia nucleotídica que codifica una enzima, o que se ha identificado una posible secuencia nucleotídica que codifica una enzima, puede ser deseable modificar la secuencia nucleotídica seleccionada, por ejemplo, puede ser deseable mutar la secuencia para preparar una enzima de acuerdo con los métodos de la presente invención.

30 Las mutaciones se pueden introducir mediante oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias nucleotídicas que flanquean los sitios de mutación deseados.

Un método adecuado se describe en Morinaga et al (*Biotechnology* (1984) 2, págs. 646-649). Otro método para introducir mutaciones en las secuencias nucleotídicas que codifican enzimas se describe en Nelson y Long (*Analytical Biochemistry* (1989), 180, págs. 147-151).

35 En vez de la mutagénesis específica de sitio, tal y como se describe más arriba, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente, por ejemplo, con un kit comercial tal como el kit de mutagénesis por PCR GeneMorph de Stratagene, o el kit de mutagénesis aleatoria por PCR Diversity de Clontech.

40 Un tercer método para obtener secuencias nuevas es fragmentar secuencias nucleotídicas no idénticas, mediante el uso tanto de una cualquiera de las muchas enzimas de restricción como de una enzima tal como la ADNasa I, y el reensamblaje de secuencias nucleotídicas completas que codifican proteínas funcionales. Alternativamente se pueden utilizar una o varias secuencias nucleotídicas no idénticas e introducir mutaciones durante el reensamblaje de la secuencia nucleotídica completa.

45 Así pues, es posible producir numerosas mutaciones aleatorias o específicas de sitio en una secuencia nucleotídica, bien *in vivo* o bien *in vitro*, y posteriormente escrutarlas para identificar la funcionalidad mejorada del polipéptido codificado mediante diversos métodos.

A modo de ejemplo no limitante, las mutaciones o variantes naturales de una secuencia polinucleotídica se pueden recombinar con el tipo silvestre o bien con otras mutaciones o variantes naturales para producir nuevas variantes. Tales variantes nuevas también se pueden escrutar para identificar la funcionalidad mejorada del polipéptido codificado. La producción de nuevas variantes preferentes se puede conseguir mediante los diferentes métodos bien establecidos en la técnica, por ejemplo, la mutagénesis en el umbral de errores (patente internacional WO 92/18645), la mutagénesis aleatoria mediada por oligonucleótidos (patente de los EE.UU. n.º US 5 723 323), el barajado de ADN (patente de los EE.UU. n.º US 5 605 793), y el ensamblaje de genes exomeiado (patente internacional WO 0058517). Otros métodos adecuados se describen, por ejemplo, en las patentes internacionales WO n.º 0134835, WO n.º 02/097130, WO n.º 03/012100, WO n.º 03/057247, WO n.º 2004/018674 y las patentes de los EE.UU. n.º US 6 303 344 y n.º US 6 132 970.

La aplicación de los métodos de evolución molecular mencionados más arriba y otros parecidos permite identificar y

seleccionar variantes de las enzimas para el uso en los métodos de la presente invención que tienen características preferentes sin ningún conocimiento previo de la estructura ni de la función de la proteína, y permite la producción de mutaciones o variantes no predecibles, pero beneficiosas. Existen numerosos ejemplos de la aplicación de la evolución molecular en la técnica para la optimización o alteración de la actividad de la enzima, a título nominativo y no exclusivo, uno o varios de los siguientes: optimización de la expresión y/o actividad en una célula hospedadora o *in vitro*, incremento de la actividad enzimática, alteración del sustrato y/o de la especificidad del producto, incremento o disminución de la estabilidad estructural o enzimática, alteración de la actividad/especificidad enzimática en las condiciones ambientales preferentes, p. ej., temperatura, pH, sustrato.

Los métodos de evolución molecular anteriores se pueden utilizar en los métodos para preparar una variante de la enzima fitasa como se describe en la presente memoria.

### SECUENCIAS AMINOACÍDICAS

La presente invención incluye métodos para preparar secuencias aminoacídicas de enzimas que tienen las propiedades específicas que se definen en la presente memoria.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «secuencia aminoacídica» o «secuencia de aminoácidos» es sinónima de la terminología «polipéptido» y/o de la terminología «proteína». En algunos casos, la terminología «secuencia aminoacídica» o «secuencia de aminoácidos» es sinónima de la terminología «péptido». En algunos casos, la terminología «secuencia aminoacídica» o «secuencia de aminoácidos» es sinónima de la terminología «enzima».

La secuencia de aminoácidos se puede preparar/aislar de una fuente adecuada, o se puede fabricar sintéticamente o se puede preparar mediante el uso de técnicas de ADN recombinante.

La enzima preparada por los métodos de la presente invención se puede utilizar junto con otras enzimas. También se describen en la presente memoria una combinación de enzimas en la que la combinación comprende la enzima preparada mediante los métodos de la presente invención y otra enzima, que puede ser otra enzima preparada por los métodos de acuerdo con la presente invención. Este aspecto se trata en un apartado posterior.

Preferentemente, la secuencia aminoacídica, cuando se refiere al alcance propiamente dicho de la presente invención, y cuando queda abarcada por él, no es una enzima nativa. En este sentido, la terminología «enzima nativa» significa una enzima completa que se encuentra en su medio nativo y cuando ha sido expresada por su secuencia nucleotídica nativa.

### VARIANTES/HOMÓLOGOS/DERIVADOS

La presente invención también abarca métodos para preparar variantes, homólogos y derivados de cualquier secuencia aminoacídica de una enzima o de cualquier secuencia nucleotídica que codifica tal enzima.

Aquí, la terminología «homólogo» significa una entidad que tiene una cierta homología con las secuencias aminoacídicas y las secuencias nucleotídicas. Aquí, la terminología «homología» es la misma que «identidad». Convenientemente, «homóloga» en este contexto se refiere al porcentaje de identidad de secuencia entre dos enzimas después de alinear sus secuencias con los algoritmos de alineamiento que se describen con más detalle más adelante.

En el presente contexto, se considera que una secuencia de aminoácidos homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser idéntica al menos al 80, 81, 85 o 90%, preferentemente al menos al 95, 96, 97, 98 o 99%, a la secuencia. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos, etc, p. ej., como la secuencia aminoacídica objeto. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (a saber, restos aminoacídicos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Con «fragmento funcional» se hace referencia a un fragmento del polipéptido que conserva las propiedades características de dicho polipéptido. En el contexto de la presente invención, un fragmento funcional de una enzima fitasa es un fragmento que conserva la capacidad de escisión de carotenoides de la proteína completa.

En el presente contexto, se considera que una secuencia nucleotídica homóloga incluye una secuencia nucleotídica que puede ser idéntica al menos al 80, 81, 85 o 90%, idéntica preferentemente al menos al 95, 96, 97, 98 o 99%, a una secuencia nucleotídica que codifica una enzima de la presente invención (la secuencia objeto). Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los sitios activos, etc., que la secuencia objeto. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (a saber, restos aminoacídicos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Para las secuencias aminoacídicas y las secuencias nucleotídicas, se pueden llevar a cabo comparaciones de homología a ojo, o más habitualmente, con la ayuda de los programas de comparación de secuencias fácilmente

disponibles. Estos programas informáticos disponibles en el mercado calculan un % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología se puede calcular sobre secuencias contiguas, a saber, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el correspondiente aminoácido en la otra secuencia, un resto a cada vez. Esto se denomina alineamiento «sin huecos». Típicamente, tales alineamientos sin huecos se realizan sólo con un número relativamente pequeño de restos.

Aunque se trata de un método muy simple y repetitivo, no tiene en cuenta que, por ejemplo, en una pareja de secuencias que por lo demás serían idénticas, una inserción o delección causará que los siguientes restos aminoacídicos no queden alineados, por lo que potencialmente dará lugar a una gran reducción en el % de homología cuando se realiza un alineamiento global. Por consiguiente, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias se diseñan para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta las posibles inserciones y delecciones sin penalizar excesivamente la puntuación de homología global. Esto se consigue con la inserción de «huecos» en el alineamiento de secuencias para intentar aumentar al máximo la homología local.

No obstante, estos métodos más complejos asignan «penalizaciones por hueco» a cada hueco que se introduce en el alineamiento, por lo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencias con tan pocos huecos como sea posible —lo que refleja una mayor relación entre las dos secuencias comparadas— conseguirá una mayor puntuación que uno con muchos huecos. Los «costes de los huecos afines» se utilizan típicamente para cargar un coste relativamente alto por la existencia de un hueco y una penalización más pequeña por cada resto adicional en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos utilizado con más frecuencia. Por supuesto, las penalizaciones altas por huecos producirán alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de los programas de alineamientos permiten modificar las penalizaciones por huecos. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores por defecto al utilizar tales programas informáticos para las comparaciones de secuencias. Por ejemplo, al utilizar el programa Bestfit de paquete GCG de Wisconsin, la penalización del hueco por defecto para las secuencias aminoacídicas es de -12 para un hueco y de -4 para cada extensión.

Por consiguiente, el cálculo del % máximo de homología requiere primero la producción de un alineamiento óptimo que tenga en cuenta las penalizaciones por hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo tal alineamiento es el programa BestFit del paquete GCG de Wisconsin (Devereux et al., 1984, *Nuc. Acids Research*, 12, pág. 387). Ejemplos de otros programas informáticos que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen a título nominativo y no exclusivo el paquete BLAST (véase Ausubel et al., 1999 *Short Protocols in Molecular Biology*, 4.<sup>a</sup> edición, capítulo 18), FASTA (Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 403-410) y el conjunto integrado de herramientas de comparación GENWORKS. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para realizar búsquedas en línea y sin línea (véase, Ausubel et al., 1999, *Short Protocols in Molecular Biology*, páginas 7-58 a 7-60).

Sin embargo, para algunas aplicaciones, es preferible utilizar el programa BestFit de GCG. Una nueva herramienta, llamada BLAST 2 Sequences, también está disponible par comparar secuencias de proteínas y de nucleótidos (véase *FEMS Microbiol Lett* 1999, 174 (2): 247-50; *FEMS Microbiol Lett* 1999, 177 (1): 187-8 y [tatiana@ncbi.nlm.nih.gov](mailto:tatiana@ncbi.nlm.nih.gov)).

Aunque el % de homología final se puede medir en términos de identidad, sin que el procedimiento de alineamiento por sí mismo esté basado típicamente en una comparación pareada de todo o nada. En su lugar se utiliza por lo general una matriz de ponderación de similitudes gradual que asigna puntuaciones a cada comparación de dos en dos basada en la similitud química o en la distancia evolutiva. Un ejemplo de tal matriz utilizada con frecuencia es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto del conjunto integrado de programas BLAST. Los programas del GCG de Wisconsin generalmente utilizan o bien los valores públicos por defecto o una tabla simbólica de comparaciones personalizada, si se le suministra (véase el manual de usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones es preferible utilizar los valores públicos por defecto para el paquete GCG, o en el caso de otros programas, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

Alternativamente, el porcentaje de homologías se puede calcular con la función de alineamiento múltiple de DNASIS™ (Hitachi Software), basada en un algoritmo análogo a CLUSTAL (Higgins D. G. & Sharp P. M. (1988), *Gene* 73 (1), 237-244).

Una vez que el programa ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular un % de homología, preferentemente un % de identidad de secuencia. Típicamente, el programa lo hace como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

En un aspecto preferente de la presente invención se utilizan los siguientes programas informáticos y ajustes para calcular el porcentaje de homología/identidad entre las secuencias. Para las secuencias aminoacídicas, el porcentaje de identidad (homología) o «positivos» se calcula con AlignX VectorNTI (Vector NTI Advance 9.1 de Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, EE.UU.) para cada posible pareja de secuencias aminoacídicas. Los ajustes se mantienen con los parámetros por defecto (penalización por apertura de huecos = 10, penalización por extensión del hueco = 0,1).

Para las secuencias de ácidos nucleicos, el porcentaje de identidad (homología) o «positivos» se calcula con el programa AlignX VectorNTI de Informax Inc. (EE.UU.) para cada posible pareja de secuencias de ácidos nucleicos. Los ajustes son los ajustes por defecto para ADN, que son: penalización por apertura de huecos = 15 y penalización por extensión del huecos = 6,66 (los mismos ajustes para los alineamientos múltiples).

- 5 Preferentemente, la identidad (homología) de aminoácidos se calcula a lo largo de la secuencia aminoacídica completa o, en el caso de los ácidos nucleicos, para un polinucleótido correspondiente que codifica las respectivas secuencias aminoacídicas completas.

Las secuencias también pueden tener deleciones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan lugar a un sustancia funcionalmente equivalente. Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos deliberadas basándose en la similitud de las propiedades de los aminoácidos (tales como polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos) y es, por lo tanto, útil agrupar los aminoácidos por grupos funcionales. Los aminoácidos se pueden agrupar juntos basándose tan solo en las propiedades de su cadena lateral. Sin embargo, es más útil incluir los datos de mutación también. Los conjuntos de aminoácidos así derivados es probable que estén conservados por razones estructurales. Estos conjuntos se pueden describir en la forma de un diagrama de Venn (Livingstone C. D. y Barton G. J. (1983) «Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation» *Comput. Appl. Biosci.* 9: 745-756) (Taylor W. R. (1986) «The classification of amino acid conservation» *J. Theor. Biol.* 199; 205-218). Se pueden realizar sustituciones conservativas, por ejemplo, de acuerdo con la tabla que viene a continuación que describe una agrupación de aminoácidos en diagrama de Venn ampliamente aceptada.

20

CONJUNTO		SUB-CONJUNTO	
Hidrófobo	FWYHKMILVAGC	Aromático	FWYH
		Alifático	ILV
Polar	WYHKREDCSTNQ	Cargado	HKRED
		Cargado positivamente	HKR
		Cargado negativamente	ED
Pequeño	VCAGSPTND	Diminuto	AGS

- La presente invención también abarca la sustitución homóloga (la sustitución y el reemplazo se utilizan en la presente memoria para hacer referencia al intercambio de un resto aminoacídico existente por un resto alternativo) que se pueda producir, a saber, la sustitución de un aminoácido por otro parecido, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. La sustitución no homóloga también se puede producir, p. ej., de una clase de resto a otra o alternativamente que implique la inclusión de aminoácidos no naturales tales como ornitina (de aquí en adelante representado por Z), ácido diaminobutírico ornitina (de aquí en adelante representado por B), norleucina ornitina (de aquí en adelante representado por O), piriilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Los reemplazos también se pueden realizar por aminoácidos no naturales.

- 30 Las secuencias de aminoácidos variantes pueden incluir grupos espaciadores adecuados que se pueden insertar entre dos restos aminoacídicos cualesquiera de la secuencia, entre ellos, grupos alquilo, tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de espaciadores de aminoácidos, tales como restos de glicina o de β-alanina. Otra forma de variación, que implica la presencia de uno o más restos aminoacídicos en forma peptóide, la conocerán bien por los expertos en la técnica. Para evitar dudas, se utiliza «la forma peptóide» para referirse a restos aminoacídicos variantes en los que el grupo sustituyente del carbono α se encuentra sobre el átomo de nitrógeno del resto en vez del carbono α. Los procedimientos para preparar péptidos en la forma peptóide se conocen bien en la técnica, por ejemplo, Simon R. J. et al., *PNAS* (1992) 89 (20), 9367-9371 y Horwell D. C., *Trends Biotechnol.* (1995) 13 (4), 132-134.

- 40 Las secuencias nucleotídicas para uso en la presente invención pueden incluir en ellas nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conocen una serie de tipos diferentes de modificaciones para oligonucleótidos. Estos incluyen esqueletos de metil-fosfonato y fosforotioato y/o la adición de acridina o de cadenas de polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los propósitos de la presente invención, se entiende que las secuencias nucleotídicas descritas en la presente memoria se pueden modificar mediante cualquier método disponible en la



técnica. Tales modificaciones se pueden llevar a cabo para mejorar la actividad *in vivo* o la vida útil de las secuencias nucleotídicas de la presente invención.

La presente invención también abarca el uso de secuencias nucleotídicas que son complementarias a las secuencias presentadas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas. Si la secuencia es complementaria a un fragmento de la misma, entonces la secuencia se puede utilizar como una sonda para identificar secuencias codificantes similares en otros organismos, etc.

Los polinucleótidos que no son homólogos al 100% a las secuencias de la presente invención, pero que caen dentro del alcance de la invención, se pueden obtener de numerosos modos. Otras variantes de las secuencias descritas en la presente memoria se pueden obtener, por ejemplo, rastreando con sondas las genotecas de ADN hechas de una serie de individuos, por ejemplo, individuos de diferentes poblaciones. Además, se pueden obtener otros homólogos y tales homólogos y fragmentos de los mismos serán en general capaces de hibridarse selectivamente a las secuencias mostradas en la lista de secuencias de la presente memoria. Tales secuencias se pueden obtener rastreando con sondas las genotecas de ADNc hechas de o genotecas de ADN genómico de otras especies, y rastreando tales genotecas con sondas que comprenden toda o parte de una cualquiera de las secuencias de la lista de secuencias adjunta en condiciones de rigor medio a alto. Se aplican consideraciones parecidas para obtener homólogos de otras especies y variantes alélicas de las secuencias polipeptídicas o nucleotídicas de la invención.

También se pueden obtener variantes y homólogos de cepas/especies por PCR degenerada que utilizará cebadores diseñados para hibridarse selectivamente a secuencias dentro de las variantes y los homólogos que codifican secuencias aminoacídicas conservadas dentro de las secuencias de la presente invención. Las secuencias conservadas se pueden predecir, por ejemplo, mediante el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de varios variantes/homólogos. Los alineamientos de secuencias se pueden realizar con los programas informáticos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se utiliza ampliamente el programa PileUp del GCG de Wisconsin.

Los cebadores utilizados en la PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se utilizarán en condiciones de rigor más bajo que los utilizados para clonar secuencias con los cebadores de secuencia única contra secuencias conocidas.

Alternativamente, tales polinucleótidos se pueden obtener mediante mutagénesis específica de sitio de secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil cuando, por ejemplo, se requieren cambios silenciosos en la secuencias de codones para optimizar el uso preferente de codones de una célula hospedadora determinada en la que las secuencias polinucleotídicas van a expresarse. Se pueden desear otros cambios de secuencia para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, o para alterar la propiedad o el funcionamiento de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

Se pueden utilizar los polinucleótidos (secuencias nucleotídicas) de la invención para producir un cebador, p. ej., un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, p. ej., marcada con una marcación reveladora mediante medios convencionales con marcadores radioactivos o no radioactivos, o los polinucleótidos se pueden clonar en vectores. Tales cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán una longitud de al menos 15, preferentemente al menos 20, por ejemplo al menos 25, 30 o 40 nucleótidos, y también están abarcados por la terminología polinucleótidos de la invención tal y como se utiliza en la presente memoria.

Los polinucleótidos tales como los polinucleótidos de ADN y las sondas de acuerdo con la invención se pueden producir de manera recombinante, sintética o por cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También se pueden clonar mediante técnicas estándares.

En general, los cebadores se producirán de manera sintética, lo que implica una fabricación por etapas de la secuencia de ácido nucleico deseada, nucleótido a nucleótido. Las técnicas para conseguir esto mediante las técnicas automáticas están fácilmente disponibles en la técnica. Por lo general se producirán polinucleótidos más largos mediante los medios recombinantes, por ejemplo, con las técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los cebadores se pueden diseñar para que contengan sitios de reconocimiento de enzimas de restricción idóneas para que el ADN amplificado se pueda clonar en un vector de clonación adecuado.

### **BIOLÓGICAMENTE ACTIVA**

Preferentemente, las secuencias variantes, etc, son al menos tan biológicamente activas como las secuencias presentadas en la presente memoria.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «biológicamente activa» se refiere a una secuencia que mantiene una estructura parecida (pero no necesariamente en el mismo grado) y/o una regulación parecida (pero no necesariamente en el mismo grado), y/o una actividad bioquímica parecida (pero no necesariamente en el mismo grado) a la de la secuencia que se produce de forma natural.

En particular, las secuencias variantes o las formas modificadas de las mismas tienen un perfil enzimático similar al perfil de la fitasa identificada en la presente memoria. Este perfil incluye características tales como ser una proteína secretada, tener un pH óptimo en el margen de pH de 2 a 5,5, preferentemente de 4,0 a 4,5, conservar una actividad

máxima de al menos el 50% en el margen de pH de 2,0 a 5,5 y/o tener una actividad específica superior a 300 U/mg.

## HIBRIDACIÓN

También se describen en la presente memoria secuencias que son complementarias a las secuencias de ácido nucleico preparadas mediante los métodos de la presente invención, o secuencias que son capaces de hibridarse bien a las secuencias preparadas por los métodos de la presente invención o bien a las secuencias que son complementarias a éstas.

La terminología «hibridación» tal y como se utiliza en la presente memoria debe incluir «el proceso mediante el cual una hebra de ácido nucleico se une a una hebra complementaria a través del apareamiento de bases», así como el procedimiento de amplificación que se lleva a cabo en las tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La presente invención también abarca el uso de secuencias nucleotídicas que son capaces de hibridarse a las secuencias que son complementarias a las secuencias presentadas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas.

La terminología «variante» también abarca secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridarse a las secuencias nucleotídicas presentadas en la presente memoria.

Preferentemente, la terminología «variante» abarca secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas (p. ej., 50 °C y SSC 0,2X {SSC 1X = NaCl a 0,15 M, citrato de trisodio a 0,015 M, pH 7,0}) a las secuencias nucleotídicas presentadas en la presente memoria.

Más preferentemente, la terminología «variante» abarca las secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridarse en condiciones muy rigurosas (p. ej., 65 °C y SSC 0,1X {SSC 1X = NaCl a 0,15 M, citrato de trisodio a 0,015 M, pH 7,0}) a las secuencias nucleotídicas presentadas en la presente memoria.

La presente invención también se refiere a las secuencias nucleotídicas que son capaces de hibridarse a las secuencias nucleotídicas para el uso en los métodos de la presente invención (que incluyen secuencias complementarias de las presentadas en la presente memoria).

La presente invención también se refiere a las secuencias nucleotídicas que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridarse a las secuencias nucleotídicas para el uso en los métodos de la presente invención (que incluyen secuencias complementarias de las presentadas en la presente memoria).

También se describen en la presente memoria secuencias polinucleotídicas que son capaces de hibridarse a las secuencias nucleotídicas presentadas en la presente memoria en condiciones de rigor de intermedio a máximo.

En un aspecto preferente, la presente descripción describe secuencias nucleotídicas que son capaces de hibridarse a la secuencia nucleotídica para el uso en los métodos de la presente invención, o el complemento de las mismas, en condiciones rigurosas (p. ej., 50 °C y SSC 0,2X).

En un aspecto más preferente, la presente descripción describe secuencias nucleotídicas de la invención que son capaces de hibridarse a la secuencia nucleotídica para el uso en los métodos de la presente invención, o un complemento de las mismas, en condiciones muy rigurosas (p. ej., 65 °C y SSC 0,1X).

## MUTAGÉNESIS ESPECÍFICA DE SITIO

Una vez que se ha aislado o purificado una secuencia nucleotídica que codifica una enzima, o que se ha identificado una posible secuencia nucleotídica que codifica una enzima, puede ser deseable mutar la secuencia para preparar una enzima preparada por los métodos de la presente invención.

Las mutaciones se pueden introducir con oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias oligonucleotídicas que flanquean los sitios de mutación deseados.

Un método adecuado se describe en Morinaga et al. (*Biotechnology* (1984) 2, p. 646-649). Otro método para introducir mutaciones en las secuencias nucleotídicas que codifican enzimas lo describen Nelson y Long (*Analytical Biochemistry* (1989), 180, p. 147-151). Otro método más lo describen Sarkar y Sommer (*Biotechniques* (1980), 8, p. 404-407 - «The megaprimer method or site directed mutagenesis»).

## RECOMBINANTE

En un aspecto, la secuencia para uso en la presente invención es una secuencia recombinante, esto es, una secuencia que se ha preparado mediante técnicas de ADN recombinante.

Estas técnicas de ADN recombinante se encuentran entre las capacidades del experto en la técnica. Tales técnicas se explican en la bibliografía, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A*

*Laboratory Manual*, 2.<sup>a</sup> edición, libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

## SINTÉTICA

En un aspecto, la secuencia para uso en la presente invención es una secuencia sintética, esto es, una secuencia que se ha preparado mediante síntesis enzimática o química *in vitro*. Incluye, a título nominativo y no exclusivo, las  
5 secuencias hechas con el uso de codones óptimo de los organismos hospedadores, tales como las levaduras metilótrofas *Pichia* y *Hansenula*.

## EXPRESIÓN DE ENZIMAS

La secuencia nucleotídica para uso en la presente invención se puede incorporar en un vector recombinante que se puede replicar. El vector se puede usar para replicar y expresar la secuencia nucleotídica, en la forma de enzima, en  
10 y/o desde una célula hospedadora compatible.

La expresión se puede controlar con secuencias de control, por ejemplo, secuencias reguladoras.

La enzima producida por una célula hospedadora recombinante mediante la expresión de la secuencia nucleotídica se puede secretar o se puede contener intracelularmente, según la secuencia y/o el vector usado. Las secuencias codificantes se pueden diseñar con secuencias señal que potencien la secreción directa de las secuencias  
15 codificantes de la sustancia a través de una membrana celular eucariota o procariota particular.

Ventajosamente, las enzimas de la presente invención se secretan.

## VECTOR DE EXPRESIÓN

La terminología «plásmido», «sistema de vector» o «vector de expresión» significa una construcción capaz de permitir la expresión *in vivo* o *in vitro*. En el contexto de la presente invención, estas construcciones se pueden usar  
20 para introducir dentro de las células hospedadoras genes que codifican enzimas. Convenientemente, los genes cuya expresión se introduce, se pueden denominar «transgenes expresables».

Preferentemente, el vector de expresión se incorpora en el genoma de un organismo hospedador adecuado. La terminología «incorporado» cubre preferentemente la incorporación estable en el genoma.

Las secuencias nucleotídicas descritas en la presente memoria que incluyen la secuencia de nucleótidos para uso  
25 en los métodos de la presente invención pueden estar presentes en un vector en el cual la secuencia nucleotídica está operativamente unida a secuencias reguladoras capaces de proporcionar la expresión de la secuencia nucleotídica en un organismo hospedador adecuado.

Los vectores para uso en la presente invención se pueden introducir por transformación en una célula hospedadora adecuada que se describe más adelante para proporcionar la expresión de un polipéptido de la presente invención.

30 La elección del vector, por ejemplo, un plásmido, cósmido o fago, a menudo dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir.

Los vectores para uso en la presente invención pueden contener uno o más genes marcadores de selección, tal como un gen, que confiere resistencia a antibiótico, p. ej., resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Alternativamente, la selección se puede llevar a cabo mediante cotransformación (tal y como se  
35 describió en la patente internacional WO91/17243).

Los vectores se pueden utilizar *in vitro*, por ejemplo para producir ARN, o se pueden utilizar para transfectar, transformar, transducir o infectar una célula hospedadora.

Así pues, en otra realización, la invención da a conocer un método para construir secuencias nucleotídicas de la presente invención mediante la introducción de una secuencia nucleotídica de la presente invención en un vector  
40 que se puede replicar, mediante la introducción del vector en una célula hospedadora compatible y mediante el crecimiento de la célula hospedadora en condiciones que dan lugar a la replicación del vector.

El vector puede comprender adicionalmente una secuencia nucleotídica que hace posible que el vector se replique en la célula hospedadora en cuestión. Ejemplos de tales secuencias son los orígenes de la replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1, pIJ101, pTZ12 y pET11.

## 45 SECUENCIAS REGULADORAS

En algunas aplicaciones, la secuencia nucleotídica para uso en la presente invención está operativamente unida a una secuencia reguladora que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia nucleotídica, tal como por la célula hospedadora elegida. A modo de ejemplo, la presente invención cubre un vector que comprende la secuencia nucleotídica de uso en los métodos de la presente invención unida operativamente a tal secuencia reguladora, a  
50 saber, el vector es un vector de expresión.

La terminología «operativamente unida» se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar de la forma para la que se diseñaron. Una secuencia reguladora «operativamente unida» a una secuencia codificante se liga de tal modo que la expresión de la secuencia codificante se consigue en una condición compatible con las secuencias de control.

- 5 La terminología «secuencias reguladoras» incluye promotores y potenciadores y otras señales de regulación de la expresión.

La terminología «promotor» se utiliza en el sentido normal de la técnica, p. ej., un sitio de unión de la ARN polimerasa.

- 10 La expresión mejorada de la secuencia nucleotídica que codifica la enzima preparada por los métodos de la presente invención se puede conseguir también mediante la selección de regiones reguladoras heterólogas, p. ej., promotor, líder para la secreción y regiones terminadoras.

Preferentemente, la secuencia nucleotídica utilizada en los métodos de acuerdo con la presente invención está operativamente unida a al menos un promotor.

- 15 En la técnica se conocen bien los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia nucleotídica en un hospedador bacteriano, fúngico o de levadura.

### CONSTRUCCIONES

La terminología «construcción» —que es sinónima de terminología tal como «conjugado», «casete» e «híbrido»— incluye una secuencia nucleotídica para el uso de acuerdo con la presente invención directa o indirectamente acoplada a un promotor.

- 20 Un ejemplo de un acoplamiento indirecto es la provisión de un grupo espaciador adecuado, tal como una secuencia intrónica, tal como el intrón Sh1 o el intrón ADH, intercalado entre el promotor y la secuencia nucleotídica de la presente invención. Lo mismo ocurre con la terminología «fusionada» en relación con la presente invención, que incluye el acoplamiento directo o indirecto. En algunos casos, la terminología no cubre la combinación natural de la secuencia nucleotídica que codifica la proteína habitualmente asociada al promotor del gen de tipo silvestre ni
- 25 cuando se encuentran ambos en su medio natural.

La construcción puede incluso contener o expresar un marcador, lo que permite la selección de la construcción genética.

Para algunas aplicaciones, preferentemente, la construcción de la presente invención comprende al menos la secuencia nucleotídica de la presente invención operativamente unida a un promotor.

### 30 CÉLULAS HOSPEDADORAS

La terminología «célula hospedadora», en relación con la presente invención, incluye cualquier célula que comprende bien la secuencia nucleotídica o bien un vector de expresión como el descrito más arriba y que se usa en la producción recombinante de una enzima que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente memoria o en los métodos de la presente invención.

- 35 Por lo tanto, otra realización de la presente invención da a conocer células hospedadoras transformadas o transfectadas con una secuencia nucleotídica que expresa las enzimas descritas en la presente invención. Las células se elegirán para que sean compatibles con dicho vector y pueden, por ejemplo, ser células procariotas (por ejemplo, bacterianas), fúngicas, de levadura o vegetales. Preferentemente, las células hospedadoras no son células humanas.

- 40 Ejemplos de organismos hospedadores bacterianos convenientes son las especies bacterianas grampositivas o gramnegativas.

En una realización preferente, la célula hospedadora es *Escherichia coli*, ya que se ha observado que la fitasa de *Buttiauxella* p1-29 se secreta con eficacia desde *E. coli*. Las enzimas fitasa, incluidas las variantes, se caracterizaron después de su expresión heteróloga en uno o más de los hospedadores de expresión siguientes: *Escherichia coli*

45 K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*. Estos hospedadores, por lo tanto, son también preferentes.

- Según la naturaleza de la secuencia nucleotídica que codifica la enzima preparada mediante los métodos de la presente invención, y/o si se desea o no procesar adicionalmente la proteína expresada, se pueden preferir hospedadores eucariotas tales como levaduras u otros hongos. En general se prefieren las células de levadura frente a las células fúngicas porque se manipulan con más facilidad. Sin embargo, algunas proteínas o bien se
- 50 secretan mal desde la célula de levadura o, en algunos casos, no se procesan adecuadamente (p. ej., hiperglucosilación en la levadura). En estos casos se debe seleccionar un organismo hospedador fúngico diferente.

El uso de células hospedadoras adecuadas —tales como células de levadura, fúngicas o vegetales— puede

proporcionar modificaciones postraduccionales (p. ej., miristoilación, glucosilación, truncamiento, lapidación, y fosforilación de tirosina, serina o treonina) cuando se necesite para conferir la actividad biológica óptima en los productos de expresión recombinantes de la presente invención.

La célula hospedadora puede ser una cepa con proteasas defectuosas o carente de ellas.

- 5 El genotipo de la célula hospedadora se puede modificar para mejorar la expresión.

Los ejemplos de modificaciones de células hospedadoras incluyen la falta de proteasas, complementación de ARNt raros y la modificación del potencial reductor en el citoplasma para mejorar la formación de los puentes disulfuro.

- 10 Por ejemplo, la célula hospedadora *E. coli* puede sobreexpresar ARNt raros para mejorar la expresión de las proteínas heterólogas tal y como se ejemplificó/describió en Kane (*Curr Opin Biotechnol* (1995), 6, 494-500 «Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *E. coli*»). La célula hospedadora puede carecer de una serie de enzimas reductoras, por lo que se favorece la formación de puentes disulfuro estables tal y como se ejemplificó/describió en Bessette (*Proc Natl Acad Sci USA* (1999), 96, 13703-13708 «Efficient folding of proteins with multiple disulphide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm»).

- 15 En una realización, las células hospedadoras en el contexto de la presente invención incluyen las células que se pueden añadir directamente en el pienso para consumo animal.

### ORGANISMO

- 20 La terminología «organismo» en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que pueda comprender la secuencia nucleotídica que codifica las enzimas que se describen en la presente invención y/o los productos obtenidos a partir de éstas, y/o en donde un promotor puede permitir la expresión de la secuencia nucleotídica de acuerdo con la presente invención cuando está presente en el organismo.

Los organismos adecuados pueden incluir un procariota, hongo, levadura o una planta.

- 25 La terminología «organismo transgénico» con respecto a la presente descripción incluye cualquier organismo que comprende la secuencia nucleotídica que codifica las enzimas que se describen en la presente invención y/o los productos obtenidos de éstas, y/o en donde un promotor puede permitir la expresión de la secuencia nucleotídica para uso en los métodos de acuerdo con la presente invención dentro del organismo. Preferentemente, la secuencia nucleotídica se incorpora en el genoma del organismo.

La terminología «organismo transgénico» no cubre las secuencias codificantes nucleotídicas nativas en su medio natural cuando se encuentran controladas por su promotor nativo que se encuentra también en su medio natural.

- 30 Por lo tanto, el organismo transgénico descrito en la presente memoria incluye un organismo que comprende cualquiera de, o combinaciones de, la secuencia nucleotídica que codifica las enzimas que se describen en la presente memoria, construcciones de acuerdo con la presente descripción, vectores de acuerdo con la presente descripción, plásmidos de acuerdo con la presente descripción, células de acuerdo con la presente descripción, tejidos de acuerdo con la presente descripción o los productos de los mismos.

- 35 Por ejemplo, el organismo transgénico también puede comprender la secuencia nucleotídica que codifica la enzima preparada con los métodos de la presente invención controlada por un promotor heterólogo.

### TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS/ORGANISMO HOSPEDADORES

Tal y como se indicó antes, el organismo hospedador puede ser un organismo procariota o eucariota. Ejemplos de hospedadores procariotas adecuados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*.

- 40 Las enseñanzas sobre la transformación de los hospedadores procariotas están bien documentadas en la técnica, por ejemplo, véase, Sambrook et al (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.<sup>a</sup> edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Otros métodos adecuados se presentan en los ejemplos de la presente memoria. Si se utiliza un hospedador procariota, entonces podría necesitarse la modificación conveniente de la secuencia nucleotídica antes de la transformación, tal como la retirada de intrones.

- 45 Las células de los hongos filamentosos se pueden transformar mediante los diferentes métodos conocidos en la técnica, tal como un procedimiento basado en la formación de los protoplastos y la transformación de los protoplastos seguida de la regeneración de la pared celular de la manera conocida. El uso de *Aspergillus* como un microorganismo hospedador se describe en la patente europea n.º EP 0 238 023.

- 50 Otro organismo hospedador puede ser una planta. Una revisión de las técnicas generales utilizadas para transformar plantas se puede encontrar en los artículos de Potrykus (*Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* [1991] 42: 205-225) y Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech* marzo/abril 1994, 17-27). Otras enseñanzas sobre la transformación de las plantas se pueden encontrar en la patente europea n.º EP-A-0449375.

Las enseñanzas generales sobre la transformación de hongos, levaduras y plantas se presentan en los apartados que vienen a continuación.

### HONGO TRANSFORMADO

- 5 Un organismo hospedador puede ser un hongo, tal como un hongo filamentoso. Ejemplos de tales hospedadores adecuados incluyen cualquier miembro que pertenezca a los géneros *Thermomyces*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Trichoderma* y similares.

10 Las enseñanzas sobre la transformación de los hongos filamentosos están revisadas en la patente de los EE.UU. n.º US-A-5741665 que afirma que las técnicas estándares para la transformación de los hongos filamentosos y el cultivo de los hongos se conoce bien en la técnica. Una revisión exhaustiva de las técnicas que se han aplicado a *N. crassa* se encuentra, por ejemplo, en Davis y de Serres, *Methods Enzymol* (1971) 17A: 70-143.

En la patente de los EE.UU. n.º US-A-5674707 se revisan más enseñanzas sobre la transformación de los hongos filamentosos.

En un aspecto, el organismo hospedador puede ser del género *Aspergillus*, tal como *Aspergillus niger*.

- 15 Un *Aspergillus* transgénico de acuerdo con la presente descripción también se puede preparar siguiendo, por ejemplo, las enseñanzas de Turner G. 1994 (*Vectors for genetic manipulation*. En: Martinelli S. D., Kinghorn J. R. (Editores) «Aspergillus: 50 years on». *Progress in industrial microbiology*, vol. 29. Elsevier Amsterdam, 1994, págs. 641-666).

La expresión génica en los hongos filamentosos se ha revisado en Punt et al. (2002) *Trends Biotechnol* Mayo de 2002; 20 (5): 200-6, Archer & Peberdy *Crit Rev Biotechnol* (1997) 17 (4): 273-306.

### 20 LEVADURA TRANSFORMADA

En otra realización, el organismo transgénico puede ser una levadura.

Una revisión de los principios de la expresión génica heteróloga en la levadura se da a conocer en, por ejemplo, *Methods Mol Biol* (1995), 49: 341-54, y en *Curr Opin Biotechnol* (1997) oct; 8 (5): 554-60.

- 25 En este sentido, la levadura, tal como las especies *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (véase *FEMS Microbiol Rev* (2000 24 (1): 45-66), se puede utilizar como vehículo para la expresión génica heteróloga.

Una revisión de los principios de la expresión génica heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* y la secreción de los productos génicos la ofrecen E. Hinchcliffe y E. Kenny (1993, «Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes», *Yeasts*, vol. 5, Anthony H Rose y J Stuart Harrison, eds, 2.ª edición, Academic Press Ltd.).

- 30 Para la transformación de la levadura se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, un *Saccharomyces* transgénico de acuerdo con la presente invención se puede preparar siguiendo las enseñanzas de Hinnen et al., (1978, *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA* 75, 1929); Beggs, J. D. (1978, *Nature*, Londres, 275, 104); e Ito, H. et al. (1983, *J Bacteriology* 153, 163-168).

Las células de levadura transformadas se pueden seleccionar mediante diferentes marcadores de selección, tales como marcadores auxótrofos de resistencia dominante a antibióticos.

### 35 PLANTAS/CÉLULAS VEGETALES TRANSFORMADAS

Un organismo hospedador adecuado para la presente invención puede ser una planta. Una revisión de las técnicas generales se puede encontrar en los artículos de Potrykus (*Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* [1991] 42: 205-225) y Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech* marzo/abril 1994, 17-27).

### CULTIVO Y PRODUCCIÓN

- 40 Las células hospedadoras transformadas con la secuencia nucleotídica de la presente invención se pueden cultivar en condiciones que conducen a la producción de la enzima codificada y que facilitan la recuperación de la enzima a partir de las células y/o del medio de cultivo.

El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para hacer crecer la célula hospedadora en cuestión y obtener la expresión de la enzima.

- 45 La proteína producida por un célula recombinante se puede mostrar sobre la superficie de la célula.

La enzima se puede secretar desde las células hospedadoras y se puede recuperar convenientemente del medio de cultivo con procedimientos bien conocidos.

**SECRECIÓN**

Puede ser deseable que la enzima se secrete desde el hospedador de expresión al medio de cultivo desde el cual se puede recuperar la enzima con más facilidad. De acuerdo con la presente invención, la secuencia líder para secreción puede seleccionarse basándose en el hospedador de expresión deseado. También se pueden utilizar

5 secuencias señal híbridas con el contexto de la presente invención.

Ejemplos típicos de secuencias líder para secreción heteróloga son las que proceden del gen de la amiloglucosidasa (AG) fúngica (*glA*, tanto la versión de 18 como de 24 aminoácidos, p. ej., de *Aspergillus*), el gen del factor a (levaduras, p. ej., *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Hansenula*) o el gen de la  $\alpha$ -amilasa (*Bacillus*).

A modo de ejemplo, la secreción de las proteínas heterólogas en *E. coli* se revisa en *Methods Enzymol* (1990) 182: 132-43.

10

**DETECCIÓN**

En la técnica se conocen multitud de protocolos para detectar y medir la expresión de la secuencia aminoacídica. Los ejemplos incluyen el inmunoensayo enzimático (ELISA, por su nombre en inglés), el radioinmunoensayo (RIA) y la clasificación de células activadas fluorescentes (FACS, por su nombre en inglés).

15 Los expertos en la técnica conocen una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación que se pueden usar en diferentes ensayos de aminoácidos y ácidos nucleicos.

Una serie de compañías tales como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) y US Biochemical Corp (Cleveland, OH) suministran kits comerciales y protocolos para estos procedimientos.

Las moléculas indicadoras o marcadores adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromógenos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de tales marcadores incluyen las patentes de los EE.UU. n.º US-A-3 817 837; US-A-3 850 752; US-A-3 939 350; US-A-3 996 345; US-A-4 277 437; US-A-4 275 149 y US-A-4 366 241.

20

De igual forma se pueden producir inmunoglobulinas recombinantes, tal y como se muestra en la patente de los EE.UU. n.º US-A-4 816 567.

25 En la técnica se conocen otros ensayos adecuados para detectar la actividad fitasa y se ejemplifican en la presente memoria.

**PROTEÍNAS DE FUSIÓN**

La secuencia aminoacídica para uso en los métodos de acuerdo con la presente invención se puede producir como una proteína de fusión, por ejemplo, para ayuda en la extracción y a la purificación. Los ejemplos de compañeros en las proteínas de fusión incluyen la glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de activación transcripcional y/o de unión al ADN) y ( $\beta$ -galactosidasa). También puede ser conveniente la inclusión de un sitio de escisión proteolítica entre la proteína compañera para fusión y la secuencia de la proteína de interés para permitir la retirada de las secuencias de la proteína para fusión.

30

Preferentemente, la proteína para fusión no obstaculizará la actividad de la secuencia de la proteína.

35 Los sistemas de expresión de la fusión génica en *E. coli* se han revisado en *Curr. Opin. Biotechnol* (1995) 6 (5): 501-6.

En otra realización de la invención, la secuencia de aminoácidos puede estar ligada a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, en el escrutinio de peptidotecas para identificar agentes capaces de afectar a la actividad de la sustancia puede ser útil la codificación de una sustancia química que exprese un epítipo heterólogo que sea reconocido por un anticuerpo disponible en el mercado.

40

**OTRAS SECUENCIAS**

Las secuencias para uso de acuerdo con la presente invención también se pueden utilizar junto con una o más proteínas adicionales de interés (POI, por su nombre en inglés) o secuencias nucleotídicas de interés (NOI, por su nombre en inglés).

45 Los ejemplos no limitantes de POI incluyen: xilanasas, lipasas, fosfatasa ácida y/o otros. Éstos incluyen enzimas que, por ejemplo, modulan la viscosidad del pienso. La NOI puede ser incluso una secuencia antisentido de cualquiera de dichas secuencias.

La POI puede ser incluso una proteína para fusión, por ejemplo, para ayudar en la extracción y purificación y para mejorar el metabolismo del fitato *in vivo*.

50 La POI puede incluso estar fusionada a una secuencia de secreción.

Otras secuencias pueden también facilitar la secreción o incrementar la producción de la POI secretada. Tales secuencias podrían codificar proteínas chaperona como, por ejemplo, el producto del gen *cyp B* de *Aspergillus niger* descrito en la solicitud de patente del Reino Unido n.º 9821198.0.

5 La NOI que codifica la POI se puede modificar genéticamente para alterar su actividad por numerosas razones, que incluyen, a título nominativo y no exclusivo, alteraciones que modifican el procesamiento y/o la expresión del producto de expresión de la misma. A modo de otro ejemplo, la NOI también se puede modificar para optimizar la expresión en una célula hospedadora determinada. Se puede desear la introducción de otros cambios de secuencia que introduzcan sitios de reconocimiento de enzimas de restricción.

10 La NOI que codifica la POI puede incluir dentro de ella nucleótidos sintéticos o modificados, tales como esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato.

La NOI que codifica la POI se puede modificar para incrementar su estabilidad intracelular y su semivida. Las posibles modificaciones incluyen, a título nominativo y no exclusivo, la adición de secuencias flanqueantes en los extremos 5' y/o 3' de la molécula o el uso de fosforotioato o del 2'-O-metilo en vez de enlaces de fosfodiesterasa con el esqueleto de la molécula.

#### 15 **ANTICUERPOS** — sólo para ilustración

Un aspecto de la presente invención se refiere a los aminoácidos que son inmunológicamente reactivos con el aminoácido de la SEQ ID n.º 3.

Los anticuerpos se pueden producir por técnicas estándares, tales como la inmunización con la sustancia de la invención, o utilizando una genoteca de expresión en fagos.

20 Para los propósitos de esta invención, la terminología «anticuerpo», a menos que se especifique lo contrario, incluye, a título nominativo y no exclusivo, anticuerpos monoclonales, policlonales, quiméricos, monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos producidos por una genoteca de expresión de Fab, así como imitadores de los mismos. Tales fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos completos que conservan su actividad de unión a una sustancia diana, fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')<sub>2</sub>, así como anticuerpos monocatenarios (scFv, por su nombre en inglés), proteínas de fusión y otras proteínas sintéticas que comprenden el sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Además, los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanizados. Los anticuerpos neutralizantes, a saber, los que inhiben la actividad biológica de las sustancias polipeptídicas, son especialmente preferentes para el diagnóstico y la terapéutica.

30 Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero determinado (p. ej., ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con la secuencia de la presente invención (o una secuencia que comprende un epítipo inmunitario de la misma). Según la especie hospedadora, se pueden utilizar diferentes adyuvantes para incrementar la respuesta inmunitaria.

35 El suero del animal inmunizado se recoge y se trata de acuerdo con los procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales contra la secuencia de la presente invención (o una secuencia que comprende un epítipo inmunológico de la misma) contiene anticuerpos contra otros antígenos, los anticuerpos policlonales se pueden purificar mediante cromatografía de inmunoafinidad. Las técnicas para producir y procesar antiseros policlonales se conocen en la técnica. Para que tales anticuerpos se puedan construir, la invención también da a conocer polipéptidos de la invención o fragmentos de los mismos haptenizados a otro polipéptido para el uso como inmunógenos en los animales o en los humanos.

40 Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la secuencia de la presente invención (o una secuencia que comprende un epítipo inmunitario de la misma) también los pueden producir fácilmente los expertos en la técnica e incluyen, a título nominativo y no exclusivo, la técnica del hibridoma (Koehler y Milstein (1975 *Nature* 256: 495-497), la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kosbor et al., (1983) *Immunol Today* 4:72; Cote et al., (1983) *Proc Natl Acad Sci* 80: 2026-2030) y la técnica del hibridoma de EBV (Cole et al., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan Rickman Liss Inc, págs. 77-96).

Además, se pueden utilizar técnicas desarrolladas para producir «anticuerpos quiméricos», el ajuste de los genes de anticuerpo de ratón en genes de anticuerpo humano para obtener una molécula con la especificidad por el antígeno y actividad biológica adecuadas (Morrison et al., (1984) *Proc Natl Acad Sci* 81: 6851-6855; Neuberger et al., (1984) *Nature* 312: 604-608; Takeda et al., (1985) *Nature* 314: 452-454).

50 Alternativamente, las técnicas descritas para producir anticuerpos monocatenarios (patente de los EE.UU. n.º 4 946 779) se pueden adaptar para producir los anticuerpos monocatenarios específicos contra la sustancia.

También se pueden generar fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de unión específicos para la sustancia. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, a título nominativo y no exclusivo, fragmentos F(ab')<sub>2</sub> que se pueden producir digiriendo con pepsina la molécula del anticuerpo, y los fragmentos Fab que se pueden generar por la reducción de los puentes disulfuro en los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente, se pueden construir genotecas de



expresión de Fab para permitir la identificación rápida y fácil de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse W. D. et al., (1989) *Science* 256: 1275-1281).

#### APLICACIÓN A GRAN ESCALA

- 5 En una realización preferente de la presente invención, la secuencia de aminoácidos que codifica una fitasa procedente de *C. freundii* o los métodos de la presente invención se utilizan para aplicaciones a gran escala. En particular, los métodos de la presente invención se pueden utilizar para la producción a gran escala de fitasas para el uso industrial como aditivos/complementos de composiciones de alimentos o piensos para consumo animal.

Preferentemente, la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad que va desde 5 g/l a unos 10 g/l del volumen total del cultivo de células después del cultivo del organismo hospedador.

- 10 Preferentemente, la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad que va desde 100 mg/l a unos 900 mg/l del volumen total del cultivo de células después del cultivo del organismo hospedador.

Preferentemente, la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad que va desde 250 mg/l a unos 500 mg/l del volumen total del cultivo de células después del cultivo del organismo hospedador.

#### USO DE LAS FITASAS —sólo para ilustración

- 15 Tal y como se mencionó más arriba, la presente invención también se refiere a la producción de fitasas tal y como se describe en la presente memoria.

En particular, la presente invención también se refiere al uso de las secuencias aminoacídicas tal y como se describe en la presente memoria para la producción de compuestos de fosfato orgánico e inorgánico.

- 20 Así pues, la presente invención se refiere adicionalmente al uso de las secuencias nucleotídicas que codifican fitasas para generar sistemas o vectores de expresión para la expresión de las fitasas.

Además, la presente invención se refiere al uso de tales sistemas o vectores de expresión para la generación de células hospedadoras que expresan fitasas.

La invención se refiere adicionalmente al uso de células hospedadoras modificadas para generar precursores de compuestos de fosfato orgánico e inorgánico o para generar compuestos específicos de fosfato orgánico.

- 25 Los compuestos adecuados de fosfato orgánico e inorgánico incluyen pentakis-, tetrakis-, tris-, bis- y monofosfatos de *myo*-inositol .

- 30 Por consiguiente, la invención da a conocer convenientemente un método para producir un compuesto de fosfato orgánico que comprende tratar un fitato con una fitasa procedente de *Buttiauxella* sp. Preferentemente, el método se caracteriza por que la enzima comprende la secuencia aminoacídica mostrada como SEQ ID n.º 3 o una secuencia que tiene una identidad (homología) de al menos el 80% con ésta o un fragmento eficaz, o forma modificada de la misma. Convenientemente, el fosfato orgánico es fitato o todos los posibles estereoisómeros de di-, tri-, tetra- y penta-fosfatos de *myo*-inositol. Otros fosfatos orgánicos convenientes incluyen tetra-fosfatos de inositol y oligofosfatos de inositol. En una realización preferente, el método es un procedimiento biotecnológico *in vivo*.

- 35 Tales métodos para producir un compuesto de fosfato orgánico pueden comprender convenientemente las etapas de:

- a) proporcionar una célula hospedadora que comprende transgenes expresables que comprenden la fitasa de *Buttiauxella* sp;
- b) cultivar el organismo transgénico en condiciones adecuadas para la expresión del transgén; y
- c) recuperar el compuesto de fosfato orgánico a partir del cultivo.

- 40 Los compuestos se pueden utilizar para una serie de aplicaciones, entre ellas, ensayos para la caracterización de las fitasas. Algunos fosfatos de inositol hacen de moléculas señalizadoras en la regulación intracelular y se pueden utilizar como sustancias químicas de investigación.

- 45 En otro aspecto se da a conocer un método para producir alimentos o pienso para consumo animal. El pienso para consumo animal se produce típicamente en molinos de pienso en los que los materiales brutos primero se muelen hasta un tamaño de partícula adecuado y luego se mezclan con aditivos pertinentes. A continuación, el pienso se puede producir como una harina o como gránulos; lo último típicamente implica un método mediante el cual se eleva la temperatura a un valor deseado y luego se pasa el pienso a través de una matriz para producir gránulos de un tamaño determinado. Posteriormente se pueden añadir aditivos líquidos, tales como grasa y enzima. Se dejan enfriar los gránulos antes de transportarlos. La producción del pienso para consumo animal también puede implicar  
50 una etapa adicional que incluye la extrusión o expansión antes de la granulación.

En consecuencia, en la presente memoria se describe el uso de una secuencia de aminoácidos que codifica una fitasa o una célula hospedadora que expresa una fitasa para producir una fitasa para el uso en la fabricación de un producto alimenticio o pienso para consumo animal. En un aspecto se describe el uso de una secuencia de aminoácidos como la descrita en la presente memoria en la fabricación de un producto alimenticio o pienso para consumo animal. En otro aspecto se describe un uso de una célula hospedadora de acuerdo con la descripción en la fabricación de un producto para alimento o pienso para consumo animal. En otro aspecto se da a conocer un uso de un sistema o vector de expresión de acuerdo con la descripción en la fabricación de un producto alimenticio o pienso para consumo animal.

La presente descripción también describe la utilización de las enzimas como un componente de combinaciones de pienso con otros componentes para dispensar a los animales.

### COMBINACIÓN CON OTROS COMPONENTES

Las enzimas preparadas mediante los métodos de la presente invención se pueden utilizar en combinación con otros componentes o vehículos.

Los vehículos adecuados para enzimas para pienso incluyen trigo (molido grueso). Además, hay una serie de técnicas de encapsulación que incluyen las basadas en el recubrimiento con grasa/cera, la adición de gomas vegetales, etc.

Los ejemplos de otros componentes incluyen uno o más de espesantes, gelificantes, emulsionantes, aglutinantes, modificadores de cristal, edulcorantes (incluidos los edulcorantes artificiales), modificadores reológicos, estabilizantes, antioxidantes, colorantes, enzimas, sustancias de arrastre, vehículos, excipientes, diluyentes, lubricantes, aromatizantes, materia colorante, agentes de suspensión, disgregantes, aglutinantes de granulación, etc. Estos otros componentes pueden ser naturales. Estos otros componentes se pueden preparar mediante el uso de técnicas químicas y/o enzimáticas.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «espesante o gelificante» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un producto que impide la separación mediante el retraso o el bloqueo del movimiento de partículas, bien gotitas de líquidos inmiscibles, aire o sólidos insolubles.

La terminología «estabilizante» tal y como se utiliza en la presente memoria se define como un ingrediente o combinación de ingredientes que impiden que un producto (p. ej., un ingrediente alimentario) cambie con el tiempo.

La terminología «emulsionante» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un ingrediente (p. ej., un ingrediente para un ingrediente alimentario) que impide la separación de las emulsiones.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «aglutinante» se refiere a un ingrediente (p. ej., un ingrediente alimentario) que aglutina el producto a través de una reacción física o química.

La terminología «modificador de cristal» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un ingrediente (p. ej., un ingrediente alimentario) que afecta a la cristalización de la grasa o del agua.

«Sustancias de arrastre» o «vehículos» hacen referencia a materiales adecuados para la administración de la composición e incluyen cualquier material conocido en la técnica tal como, por ejemplo, cualquier líquido, gel, solvente, diluyente líquido, solubilizante o similar, que no es tóxico y que no interacciona con ningún componente de la composición de una manera perjudicial.

Ejemplos de sustancias de arrastre nutricionalmente aceptables incluyen, por ejemplo, cereales, agua, soluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, vaselina, aceites vegetales y similares.

Ejemplos de excipientes incluyen uno o más de: celulosa microcristalina y otras celulosas, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico, glicina, almidón, lactosa y polietilenglicoles de alta masa molecular.

Ejemplos de disgregantes incluyen uno o más de: almidón (preferentemente almidón de maíz, de patata o de tapioca), glucolato de almidón de sodio, croscarmelosa sódica y algunos silicatos complejos.

Ejemplos de aglutinantes de granulación incluyen uno o más de: polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, maltosa, gelatina y goma arábica.

Ejemplos de lubricantes incluyen uno o varios de: estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

Ejemplos de diluyentes incluyen uno o más de: agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

Los otros componentes se pueden utilizar simultáneamente (p. ej., cuando se encuentran en mezcla o incluso cuando se suministran por vías diferentes) o secuencialmente (p. ej., se pueden suministrar por vías diferentes).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «componente adecuado para consumo animal o humano» significa un compuesto que es, o que se puede añadir a la composición de la presente invención como, un suplemento que puede ser de beneficio nutritivo, ser un sustituto de la fibra o tener un efecto generalmente beneficioso para el consumidor.

- 5 A modo de ejemplo, los componentes pueden ser prebióticos tales como alginato, xantano, pectina, goma de algarroba (LBG, por su nombre en inglés), inulina, goma guar, galacto-oligosacárido (GOS), fructo-oligosacárido (FOS), lactosacarosa, oligosacáridos de soja, palatinosa, isomalto-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos y xilo-oligosacáridos.

#### **SUSTANCIA PARA ALIMENTO O PIENSO**

- 10 Los compuestos se pueden utilizar como, o en la preparación de, una sustancia alimenticia o para pienso. Aquí, la terminología «alimento» se utiliza en un sentido amplio —y cubre los alimentos y los productos alimenticios para humanos así como los alimentos para animales (a saber, un pienso). La terminología «pienso» se utiliza con referencia a los productos que se dan de comer a los animales durante la crianza del ganado. En un aspecto preferente, el alimento o el pienso es para el consumo de animales monogástricos tales como el cerdo, aves y los peces.

Los alimentos o el pienso pueden estar en forma de una solución o como un sólido, según el uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

#### **INGREDIENTES Y SUPLEMENTOS PARA ALIMENTOS Y PIENSO**

Los compuestos se pueden utilizar como un ingrediente alimentario o para pienso.

- 20 Tal y como se utiliza en la presente memoria la terminología «ingrediente alimentario o para pienso» incluye una formulación, que es alimentos o productos alimenticios, o que se puede añadir a ellos, e incluye formulaciones que se pueden usar en poca cantidad en una amplia variedad de productos.

El ingrediente alimentario puede estar en forma de una solución o como un sólido, según el uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

- 25 Los compuestos pueden ser complementos alimenticios, o se pueden añadir a ellos.

#### **COMPOSICIONES PARA ALIMENTOS Y PIENSOS — sólo para ilustración**

Las composiciones para pienso para animales monogástricos típicamente incluyen composiciones que comprenden productos vegetales que contienen fitato. Tales composiciones incluyen harina de maíz, harina de soja, harina de colza, harina de semilla de algodón, maíz, trigo, cebada y piensos basados en sorgo.

- 30 Las fitasas descritas en la presente memoria pueden ser —o se pueden añadir a— sustancias y composiciones alimenticias o para piensos.

La presente descripción también describe un método de preparación de un ingrediente o complemento alimentario o para pienso, comprendiendo el método mezclar fitasas producidas por el procedimiento de la presente descripción o la composición de acuerdo con la presente descripción con otro ingrediente alimentario. El método para preparar o

- 35 un ingrediente alimentario es también otro aspecto de la presente descripción. Los métodos para preparar pienso para consumo animal se presentan más arriba. La enzima se puede añadir también en forma de una formulación sólida, o como un aditivo para pienso, tal como una premezcla. Una forma sólida se añade típicamente antes o durante la etapa de mezclado; y una forma líquida se añade típicamente después de la etapa de granulación.

#### **FÁRMACOS —sólo para ilustración**

- 40 Las fitasas de la presente descripción también se pueden utilizar en preparaciones farmacéuticas o para la combinación en productos alimenticios para proporcionar algún efecto farmacéutico. Por ejemplo, la patente europea EP 1 389 915 describe el uso de una fitasa en una comida o bebida para incrementar la disponibilidad de calcio, hierro y/o cinc de la comida o bebida para los humanos.

- 45 Además, la patente europea n.º EP 1 392 353 describe un medicamento o complemento nutritivo que contiene fitasa, que es útil para incrementar la biodisponibilidad de los bioelementos, p. ej., calcio y hierro, y para combatir las enfermedades por carencias.

Aquí, la terminología «fármacos» se utiliza en un sentido amplio, y cubre los fármacos y/o los alimentos medicinales para humanos así como los fármacos y/o los alimentos medicinales para animales (a saber, aplicaciones veterinarias). En un aspecto preferente, el fármaco es para uso humano y/o para cría de animales.

- 50 El fármaco puede tener propósitos terapéuticos —que pueden ser curativos o paliativos o preventivos en la naturaleza. El fármaco puede tener incluso propósitos diagnósticos.

Cuando se utiliza como —o en la preparación de— un fármaco, el producto y/o los compuestos de la presente invención se pueden utilizar junto con uno o varios de: un vehículo farmacéuticamente aceptable, un diluyente farmacéuticamente aceptable, un excipiente farmacéuticamente aceptable, un adyuvante farmacéuticamente aceptable, un ingrediente farmacéuticamente activo.

- 5 El fármaco puede estar en forma de una solución o como un sólido, según el uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

**INGREDIENTE FARMACÉUTICO** —sólo para ilustración

- 10 El producto y/o los compuestos de la presente descripción se pueden utilizar como ingredientes farmacéuticos. Aquí, el producto y/o la composición de la presente invención pueden ser el único componente activo o puede ser al menos uno entre varios (a saber, 2 o más) componentes activos.

El ingrediente farmacéutico puede estar en forma de una solución o como un sólido, según el uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

El ingrediente farmacéutico puede estar en forma de un producto efervescente para mejorar las propiedades de disolución del fármaco.

- 15 **FORMAS** —sólo para ilustración

El producto y/o los compuestos de la presente descripción se pueden utilizar de cualquier forma adecuada, tanto si están solos como si están presentes en una composición. Asimismo, las fitasas producidas de acuerdo con la presente invención (a saber, ingredientes, tal como ingredientes alimentarios, ingredientes para alimentos funcionales o ingredientes farmacéuticos) se pueden utilizar de cualquier forma adecuada.

- 20 Ejemplos adecuados de formas incluyen uno o más de: comprimidos, píldoras, cápsulas, óvulos, soluciones o suspensiones, que pueden contener aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retrasada, modificada, sostenida, pulsante o controlada.

- 25 A modo de ejemplo, si el producto y/o la composición se utilizan en forma de comprimido —tal como para el uso como un ingrediente funcional—, pudiendo contener también los comprimidos uno o más de: excipientes, disgregantes, aglutinantes de granulación o lubricantes.

Ejemplos de vehículos nutricionalmente aceptables para el uso en la preparación de las formas incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, vaselina y similares.

Los excipientes preferentes para las formas incluyen lactosa, almidón, una celulosa, lactosa o polietilenglicoles de alto peso molecular.

- 30 Para las suspensiones acuosas y/o elixires, los compuestos de escisión carotenoides se pueden combinar con diferentes edulcorantes o aromatizantes, material colorante o de tinción, con emulsionantes y/o agentes de suspensión y con diluyentes tal como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

Las formas también pueden incluir capsulas de gelatina; capsulas de fibra, comprimidos de fibra, etc.

**TÉCNICAS DE LA METODOLOGÍA GENERAL DEL ADN RECOMBINANTE**

- 35 La presente invención emplea, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que se encuentran dentro de las capacidades de una persona experta en la técnica. Tales técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 y suplementos periódicos); *Current Protocols in Molecular*  
40 *Biology*, cap. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; and, D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press.

**Ejemplos**

- 45 La invención se ilustra a continuación además en los siguientes ejemplos no limitantes.

**Ejemplo 1. Ensayo de la actividad fitasa**

µl = microlitro

- 50 Se llevaron a cabo ensayos de fitasa en placas de microtitulación. La mezcla de reacción (100 µl) contenía: fitato a 2 mM y CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM, pH 3,5. Se dejó que la reacción transcurriese durante 1 h a 37 °C, y pasado dicho tiempo se midió el fosfato liberado mediante un perfeccionamiento de un

procedimiento conocido (Heinonen J. K., Lahti R. J. *Anal Biochem.* 113 (2), 313-317 (1981)). Brevemente, se añadieron 200 µl de una solución de AMM recién preparada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 7,5 N, molibdato de amonio a 15 mM y acetona —1:1:2) a la mezcla de reacción de 100 µl en cada pocillo de la placa de microtitulación. Se midió la absorbancia a 390 nm transcurridos al menos 10 min y no más 30 min desde que se añadió el reactivo AMM. Se determinó la cantidad de fosfato mediante la construcción de una curva de calibración con soluciones de fosfato de concentración conocida. Para evaluar la actividad de la fitasa a diferentes valores de pH, se utilizaron los siguientes tampones (todos a 200 mM): glicina/HCl entre un pH 2,0 y 3,0, acetato de sodio/ácido acético entre pH 3,5 y 5,5, Tris/ácido maleico entre un pH 6,0 y 7,5.

#### Ejemplo 2. Cepa P1-29 productora de fitasa

La cepa bacteriana P1-29 se aisló originalmente de una masa de material vegetal en desintegración recogido del fondo de un lodazal en el bosque del sur de Finlandia. La cepa se puede cultivar de forma aerobia a 30 °C en muchos medios de cultivo sencillos, p. ej., LB (peptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 1%, pH 7,4) o medio PP1 con poco fosfato (peptona al 1%, extracto de carne de vacuna al 1%, extracto de levadura al 0,5%, CaCl<sub>2</sub> a 0,2 M. Se prepara el medio ajustando el pH a aproximadamente 11 con NaOH e hirviendo durante 10 min. El precipitado se retira por filtración, se reajusta el pH a 5,5 y se esteriliza el medio mediante autoclave durante 15 min a 121 °C).

Después de crecer en medio PP1 líquido, se vio que la cepa mostraba actividad fitasa tanto a pH 3,5 como 5,5 (se ensayó como se describe en el ejemplo 1). La proporción de las actividades a 3,5 y 5,5 era aproximadamente de 1,3. También se midió la actividad por separado en las células y en el sobrenadante del cultivo de P3-42. De acuerdo con estas mediciones, la mayor parte de la actividad fitasa estaba unida a la célula, encontrándose el 10-20% de la actividad en el sobrenadante del medio de cultivo.

La cepa se deposita con NCIMB con el número de acceso 41248.

#### Ejemplo 3. Aislamiento del ADN cromosómico de la cepa P1-29.

Se preparó ADN cromosómico esencialmente mediante el procedimiento estándar (Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1996). Un cultivo de 250 ml hecho crecer durante una noche a 30 °C en medio LB se centrifugó a 10 000 rpm durante 30 min, se lavó en 20 ml de tris-HCl a 50 mM, EDTA a 5 mM, pH 8, y se resuspendió en 10 ml de TES frío (tris-HCl a 50 mM, EDTA a 5 mM, glucosa al 15%, pH 8). Se le añadió lisozima a 10 mg/ml y la suspensión celular se incubó a 37 °C durante 30-60 min hasta que se produjo la lisis, lo que se constató mediante la dilución de 100 µl de la mezcla de reacción en 1 ml de SDS al 1% y la comprobación de una consistencia «mucosa». En este momento se añadieron SDS y proteinasa K (Sigma) a una concentración final del 1% y de 0,5 mg/ml, respectivamente. Se incubó la mezcla de reacción durante 30 min a 56 °C seguido de la adición de 2 ml de NaCl a 5 M y 1,4 ml de bromuro de cetiltrimetilamonio (Sigma) al 10%. Se continuó la incubación durante 15 min a 65 °C. Se extrajo una vez la solución con cloroformo/alcohol de isoamílico (24:1) y una vez con fenol/cloroformo. Después de las extracciones, se mezcló la fase del agua con 0,6 volúmenes de isopropanol, el precipitado de ADN se recogió por centrifugación (10 000 rpm, 15 min), se lavó con etanol al 70%, se secó al vacío y se resuspendió en 2 ml de tris-HCl a 10 mM, EDTA a 1 mM, pH 8, ARNasa a 5 µg/ml.

#### Ejemplo 4. Identificación taxonómica de la cepa bacteriana P1-29.

Un fragmento del gen del ARNr 16S de la cepa P1-29 se amplificó mediante la reacción de la cadena polimerasa (PCR) con ADN polimerasa *Taq* (Roche) con los cebadores; 536f (CAGCMGCCGCGGTAATWC) y 1392r (ACGGGCGGTGTGTRC), (Lane, D. J. En *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Stackbrandt, E. y Goodfellow, M. eds, John Wiley & Sons, Nueva York: págs. 115-117 (1991)). Se utilizó el programa siguiente: 1) etapa inicial de desnaturalización del ADN de 5 min a 95 °C; 2) 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C; 3) una etapa final de extensión a 70 °C durante 10 min. Los productos de la PCR, con un tamaño de aproximadamente 900 pares de bases, se purificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% y se extrajeron del gel con un kit de purificación del gen (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR purificados se secuenciaron en Medprobe (Noruega) como un servicio comercial. El área secuenciada se recoge como SEQ ID n.º 1. Esta secuencia se comparó con las secuencias de ADN en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Las coincidencias más altas (688-689 de 691 nucleótidos, 99,6% a 99,7%) se encontraron con las secuencias del gen del ARN 16S de varias cepas de *Buttiauxella* tal como *B. izardii* DSM 9397, *B. gaviniae* DSM 9393 y *B. noackiae* ATCC 51607T. Por consiguiente, la cepa P1-29 se puede clasificar taxonómicamente como *Buttiauxella* sp.

#### Ejemplo 5. Clonación del gen de la fitasa de *Buttiauxella* sp. P1-29.

El ADN cromosómico de la *Buttiauxella* sp. P1-29 se ha digerido parcialmente con la endonucleasa de restricción *Sau3A* y la digestión se fraccionó en un gel de agarosa al 1%. Los fragmentos de ADN de 3 a 5 kb se aislaron del gel con un kit de purificación en gel (Qiagen) y se ligaron con los brazos desfosforilados digeridos con BamHI del λ-ZAP (Stratagene). Las etapas posteriores para la construcción de la genoteca siguieron las instrucciones del kit de clonación Gigapack/ZAP Express Predigested Vector de Stratagene. La forma fágica de la genoteca se convirtió en una forma plasmídica mediante el procedimiento de «excisión en masa» que describe el fabricante (Stratagene). El

escrutinio de la genoteca en plásmidos se efectuó de modo similar a los primeros métodos publicados para la detección de la actividad fitasa en las placas de Petri (Howson y Davis. *Enzyme Microb. Technol.* 5, 377-382 (1983); Chen J. C. *Biotechnology techniques* 12 (10) 751-761 (1998); Riccio M. L. et al., *J. Appl. Microbiol.* 82, 177-185 (1997)). Se aislaron varios clones positivos para la fitasa y se purificaron mediante subclonación. Estos aislados se hicieron crecer en un cultivo líquido (medio LB a 30 °C y 200 rpm durante unas 24 h) y se midió la actividad fitasa (ejemplo 1) en las suspensiones celulares resultantes. Un clon que tenía la actividad fitasa más alta (unas 1,2 U/ml a pH 3,5) se seleccionó para la caracterización posterior. El ADN plasmídico se aisló de este clon, se denominó pBK(P1-29), y se caracterizó mediante la secuenciación parcial del ADN del inserto de ADN (el servicio de secuenciación se obtuvo de Medprobe (Noruega)). La secuencia que comprende el gen de la fitasa se recoge como SEQ ID n.º 2. La secuencia deducida de la fitasa de *Buttiauxella* sp. P1-29 se recoge como SEQ ID n.º 3. La comparación de la SEQ ID n.º 3 con las secuencias en GenBank con el servicio BLAST proporcionado por el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) identificó que la fitasa de *Obesumbacterium proteus* (n.º de acceso de GenBank AAQ90419) era el homólogo conocido más cercano de la fitasa de *Buttiauxella* sp. P1-29. Sin embargo, el nivel de homología es más bien bajo: sólo aproximadamente el 74% de los restos aminoacídicos son idénticos en ambas proteínas.

### Ejemplo 6. Amplificación y expresión del gen de la fitasa de *Buttiauxella* sp. P1-29

El gen de la fitasa se amplificó por PCR. El ADN cromosómico de la cepa *Buttiauxella* sp. P1-29 se utilizó como plantilla y los oligonucleótidos o29-5 (GGAATTCATATGACGATCTCTGCGTTTAAC) y o29-3 (GGAATTCGGATCCTTACTGTAGCTGGCAGCCTG) como cebadores. La amplificación se llevó a cabo con el kit Expand High Fidelity PCR System (Roche). Se utilizó el programa siguiente: 1) desnaturalización inicial del ADN durante 3 min a 94 °C; 2) 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 55 °C, 1 min a 68 °C, 1 min a 72 °C, 1 min a 74 °C; 3) una etapa final de extensión de 10 min a 72 °C. El producto resultante de la PCR se purificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% seguido de la extracción del ADN desde el gel utilizando un kit de purificación en gel (Qiagen). El producto de PCR purificado se digirió con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* y se aisló de la mezcla de reacción mediante el kit de purificación de PCR (Qiagen). El vector plasmídico pET11a (Novagen) se digirió con las endonucleasas de restricción *NdeI* y *BamHI*, se desfosforiló con la fosfatasa alcalina de camarón (Roche) y se purificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. La banda de ADN plasmídico linealizado se cortó del gel y se purificó con un kit de purificación en gel (Qiagen). Los dos fragmentos de ADN purificados se ligaron con la ADN ligasa de T4 (Roche). La reacción de ligación se precipitó con etanol al 70%, se lavó con etanol y se resuspendió directamente en 50 µl de células electrocompetentes XL1-Blue MRF' de *E. coli*. La suspensión se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,1 cm (BioRad) y se electroporaron con un Gene Pulser Xcell (BioRad) ajustado a 1800 V, 25 µF y 200 Ω. Inmediatamente después de la electroporación, se añadió 1 ml de medio LB, la suspensión celular se transfirió a un tubo de plástico de 15 ml (Falcon) y se incubó a 37 °C con agitación (200 rpm) durante 1 h. Las células transformadas se sembraron en placas de LB con 100 µg/ml y se incubaron durante una noche a 37 °C. Se hicieron crecer 24 transformantes en cultivo líquido y los cultivos se utilizaron para ensayar la actividad fitasa y el aislamiento del ADN plasmídico. Se seleccionó un clon que producía la actividad fitasa más alta y cuyo ADN plasmídico generaba el patrón de restricción esperado. El plásmido contenido en este clon denominado pET11(P1-29) se utilizó para transformar la cepa hospedadora de expresión BL21(DE3)pLysS (Novagen). La suspensión de células transformadas se agitó durante 1 h a 37 °C en LB con glucosa al 2% y se inoculó en 50 ml de LB con ampicilina (100 µg/ml) y glucosa (2%), y se hizo crecer durante una noche a 30 °C con agitación (200 rpm). La DO del cultivo resultante se midió a 600 nm y se utilizó el cultivo para inocular 11 de LB + ampicilina (100 µg/ml) a una DO<sub>600</sub> de 0,04. Se dejó que creciera durante una noche a 30 °C. La actividad fitasa en tales cultivos era típicamente de 8 a 12 U/ml. Aproximadamente el 40% de la actividad fitasa se secretaba al medio de cultivo y el resto permanecía asociada a las células. Estas observaciones demuestran que la fitasa de *Buttiauxella* P1-29 se secreta en *E. coli* de un modo algo más eficaz que en su hospedador nativo. La actividad en el cultivo de una cepa de control BL21(DE3)pLysS transformada con el pET11 creciendo en las mismas condiciones estaba por debajo de 0,5 U/ml.

### Ejemplo 7. Purificación de la fitasa recombinante de *Buttiauxella* P1-29.

El cultivo de BL21(DE3)pLysS transformada con pET11(P1-29) se centrifugó para retirar las células bacterianas, se concentró con un evaporador rotatorio a aproximadamente 1/10 del volumen original y se dializó frente a agua hasta que la conductividad de la solución disminuyó por debajo de 250 µS/cm. Se ajustó el pH de la solución a 8,0 con tris base y se aplicó a una columna (3 x 20 cm) de DEAE Sepharose Fast Flow (Roche) equilibrada con tris-HCl a 25 mM, pH 8,0. La columna se lavó con el tampón de equilibrio a una velocidad de flujo de 3 ml/min durante 30 min seguido de una elución con tres gradientes sucesivos de NaCl en tris-HCl a 25 mM, pH 8,0: 0-50 mM, 50-150 mM y 150-500 mM. Cada uno de los tres gradientes se programó durante 1 h con una velocidad de flujo constante de 3 ml/min. Se recogieron fracciones de 9 ml y se les ensayó la actividad fitasa. Se detectó un fuerte pico de actividad. La proteína en la fracción del pico se concentró con concentradores Centriplus (Amicon) y se analizó por SDS-PAGE en un gel al 12% y el sistema estándar de tampones de Laemmli. Los resultados de este análisis indicaron que la preparación de la fitasa recombinante de *Buttiauxella* P1-29 obtenida mediante DEAE Sepharose contenía un único componente proteico prominente. Los análisis semicuantitativos basados en el escaneo de la imagen digital del gel (figura 1) indican que la pureza es de aproximadamente el 65%.

**Ejemplo 8. Perfil del pH de la fitasa recombinante de *Buttiauxella* P1-29**

5 La dependencia del pH que tiene la actividad fitasa de *Buttiauxella* P1-29 (purificada de acuerdo con el ejemplo 7) se estudió en los tampones y en las condiciones descritas en el ejemplo 1. La enzima era activa en un amplio margen de pH (2 a 5,5) con un máximo en torno a pH 4,5 y un fuerte «hombro» de la curva en torno a pH 3 (figura 2).

**Ejemplo 9. Especificidad de sustrato de la fitasa recombinante de *Buttiauxella* P1-29.**

10 Las fracciones de los fosfatos de inositol que contienen tres, cuatro o cinco fosfatos por resto de inositol se aislaron mediante cromatografía de intercambio iónico a partir de un hidrolizado parcial de ácido fítico tratado con fitasa fúngica (Natuphos). La producción y la purificación de estas preparaciones era un servicio comercial de BioChemis Ltd (San Petersburgo, Rusia). La contaminación de cada fracción con fosfatos de inositol que tienen un grado diferente de fosforilación fue de menos del 5%, a juzgar por el análisis de HPLC (Sandberg A. S., Ahderinne R. J. *Food Sci.* 51 (3), 547-550). Se utilizaron fructosa-1,6-difosfato y fructosa-6-fosfato comerciales (Sigma) como sustratos modelo para estimar la especificidad de la fitasa de *Buttiauxella* P1-29 frente a los sustratos di- y 15 monofosfato. La actividad de la fitasa de *Buttiauxella* purificada según el ejemplo 7 con diferentes sustratos se midió mediante el ensayo estándar (ejemplo 1) a pH 3,5 con una concentración de los sustratos de 2 mM en la mezcla de reacción final. Los resultados (figura 3) indican que la enzima tiene una especificidad de sustrato extremadamente amplia. Su actividad con penta-, tetra- y trifosfatos era esencialmente igual o algo más elevada que la actividad con el ácido fítico como sustrato. Incluso la fructosa-1,6-difosfato, un mal sustrato para la mayoría de las fitasas, se 20 hidrolizó con bastante eficacia mediante la fitasa de *Buttiauxella* sp. (en particular, con la fitasa procedente de P1-29). La hidrólisis de la fructosa-6-fosfato también era detectable, aunque era mucho menos eficaz que la hidrólisis de los otros sustratos analizados.

**Ejemplo 10. Actividad específica de la fitasa recombinante de *Buttiauxella* P1-29**

25 La actividad específica de la fitasa de *Buttiauxella* P1-29 se estimó con la preparación purificada de acuerdo con el ejemplo 7. La actividad fitasa se midió a pH 3,5 de acuerdo con el ejemplo 1. Se calculó la concentración de fitasa midiendo la concentración total de proteína con el kit BCA Protein Assay (Pierce) y corrigiéndola por el contenido de fitasa estimado mediante SDS PAGE (ejemplo 7). De acuerdo con estas mediciones, la actividad específica de la fitasa recombinante de *Buttiauxella* P1-29 es de unas 300 U/mg a 37 °C.

**Ejemplo 11. Generación y caracterización de variantes de fitasa**

30 Se construyeron variantes de fitasa mediante mutagénesis de la secuencia nucleotídica SEQ ID n.º 2 con los métodos de mutagénesis que se recogen más arriba, tal como los métodos descritos en Morinaga et al (*Biotechnology* (1984) 2, págs 646-649) o en Nelson y Long (*Analytical Biochemistry* (1989), 180, págs. 147-151) o el protocolo de mutagénesis en el umbral de errores descrito en la patente internacional n.º WO 92/18645. Otro método adecuado para la PCR mutagénica se describe en Cadwell y Joyce (*PCR Methods Appl.* 3 (1994), 136-140).

35 Las variantes de la enzima fitasa se caracterizaron tras su expresión heteróloga en uno o más de los siguientes hospedadores de expresión: *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*.

40 Se obtuvieron variantes de la fitasa que diferían en una o más posiciones de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3, entre ellas, dos posiciones, tres posiciones, cuatro posiciones, cinco posiciones, seis posiciones, siete posiciones, ocho posiciones, nueve posiciones, diez posiciones, once posiciones, doce posiciones. Cuando se necesitaron rondas iterativas de mutagénesis, se realizaron como está descrito en la presente memoria.

Caracterización de las variantes de fitasa

**1. Termoestabilidad**

45 La termoestabilidad de tales variantes se caracterizó por la temperatura de inactivación de la enzima. La temperatura de inactivación se determinó al medir la actividad residual de la enzima fitasa después de la incubación durante 10 min a diferentes temperaturas y el posterior enfriamiento a temperatura ambiente. La temperatura de inactivación es la temperatura a la que la actividad residual es del 50% en comparación con la actividad residual después de la incubación durante el mismo tiempo en las mismas condiciones a temperatura ambiente. Cuando era necesario, se realizaron interpolaciones y extrapolaciones a partir de los datos de actividad medidos para determinar la temperatura que corresponde a la actividad residual del 50%. Se calcularon las diferencias de termoestabilidad en 50 °C mediante la sustracción de las temperaturas de inactivación de las dos enzimas entre sí.

## ES 2 391 078 T3

La tabla 1 recoge las diferencias de termoestabilidad para diferentes variantes:

TABLA 1:

Diferencias de termoestabilidad (DT) para las variantes derivadas de la fitasa madre mostrada en la SEQ ID n.º 3	
Variante	D.T.
K59E	2,5
T167V	2,5
K240T	2,1
T167I	3,0
K240E	3,3
D244C	4,2
Q289Y	4,4
T209K	1,8
F197S	1,0
D125E/H193R	1,5
A294E/N303K	3,5
T167I/K240T	4,1
D223E/K240E/N351D	2,7
T167I/K240T/A294E/N303K	6,1
T167I/K240E/A242S/A294E/N303K	8,2
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K	11,5
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K	15,2
A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K	12,0
D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	16,5
A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F	17,7
N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	20,2

2. Otras características

5 También se mejoraron otras características.

La termoestabilidad, la actividad específica y la estabilidad a la pepsina de determinadas variantes se compararon



con ensayos que se describen más arriba. La estabilidad de la pepsina de tales variantes se caracterizó mediante actividades residuales medidas a pH 3,5 y 37 °C después de la incubación con la pepsina en comparación con las condiciones de control (actividad residual = actividad después de la incubación con la pepsina / actividad después de la incubación en las condiciones de control). La incubación con la pepsina se realizó durante 2 horas a pH 2,0, pepsina a 0,25 mg/ml, CaCl<sub>2</sub> a 1 mM y SAB a 5 mg/ml a 37 °C. Las condiciones de control eran 2 horas a pH 5,0, CaCl<sub>2</sub> a 1 mM y SAB a 5 mg/ml a 37 °C.

La tabla 2 muestra las propiedades de determinadas variantes (derivadas de la fitasa de tipo silvestre de acuerdo con la SEQ ID n.º 3, y comparadas con ella).

TABLA 2:

Estabilidad frente a la pepsina para las variantes derivadas de la fitasa madre mostrada en la SEQ ID n.º 3	
Variante	Estabilidad frente a la pepsina [% de actividad residual]
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K	63
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K	72
A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K	34
D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	62
A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F	61
N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	77

10

TABLA 3:

Actividad específica para una variante derivada de la fitasa madre mostrada en la SEQ ID n.º 3:	
Variante	Actividad específica [% de actividad de la silvestre a pH 4,0]
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K	115

Los siguientes párrafos numerados se incluyen sólo para ilustración.

1. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que corresponde a una fitasa de *Buttiauxella* sp., o una forma modificada, un polipéptido homólogo, una variante, un equivalente funcional o un fragmento eficaz de la misma.
2. Un polipéptido de acuerdo con lo descrito en el párrafo 1, que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID n.º 3 o una secuencia que tiene una identidad (homología) de al menos el 75%, preferentemente tiene una identidad (homología) de al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, con éste o un fragmento funcional del mismo.

20

## ES 2 391 078 T3

3. Un polipéptido de acuerdo con los párrafos 1 o 2, en donde dicho polipéptido está aislado y/o purificado.
4. Un polipéptido de acuerdo con los párrafos 1 a 3, en donde dicho polipéptido muestra actividad fitasa.
5. Un polipéptido de acuerdo con los párrafos 1 a 4, caracterizado por que se puede obtener de, preferentemente está derivado de, la cepa P1-29 de *Buttiauxella* sp depositada con el número de acceso NCIM 41248.
6. Un polipéptido de acuerdo con los párrafos 4 o 5 o un equivalente funcional del mismo, caracterizado por que dicha fitasa tiene una actividad específica de al menos 100, más preferentemente al menos 200, lo más preferentemente al menos 300 U/mg, en donde dicha actividad específica se determina mediante la incubación de dicha fitasa en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a pH 4,5, a una temperatura de 37 °C.
7. Un polipéptido de acuerdo con los párrafos 4 a 6 o un equivalente funcional del mismo, caracterizado por que dicha fitasa tiene una actividad máxima en torno a pH de 3 a 6, preferentemente en torno a pH de 4 a 5, lo más preferentemente en torno a pH 4,5, en donde dicha actividad se determina mediante la incubación de dicha fitasa en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a una temperatura de 37 °C.
8. Un polipéptido de acuerdo con lo descrito en uno cualquiera de los párrafos 1 a 7, que comprende mutaciones en al menos una de las siguientes posiciones (numeración de acuerdo con la numeración en la SEQ ID n.º 3): 59, 70, 122, 125, 167, 193, 197, 204, 209, 211, 221, 223, 225, 240, 242, 244, 268, 281, 289, 294, 303, 336 o 351.
9. Un polipéptido de acuerdo con lo descrito en el párrafo 8, en el que dicha fitasa comprende una o más de las mutaciones siguientes:
  - K 59 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
  - T 70 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y; o
  - A 122 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
  - D 125 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
  - T 167 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y; o
  - H 193 A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
  - F 197 A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
  - T 204 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y; o
  - T 209 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y; o
  - A 211 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
  - G 221 A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
  - I 223 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
  - S 225 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y; o
  - K 240 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
  - A 242 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
  - D 244 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
  - A 268 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
  - L 281 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
  - Q 289 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y; o
  - A 294 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
  - N 303 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o
  - I 336 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o

## ES 2 391 078 T3

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

10. Un polipéptido/enzima fitasa de acuerdo con lo descrito en el párrafo 8 o 9, que comprende al menos una mutación seleccionada entre el grupo que consiste en: K59E; T167V; K240T; T167I; K240E; D244C; Q289Y; T209K o F197S.
- 5 11. Un polipéptido/enzima fitasa de acuerdo con lo descrito en los párrafos 8 a 10, que comprende una combinación de mutaciones seleccionadas entre el grupo que consiste en:
- D125E/H193R; o
- A294E/N303K; o
- T167I/K240T; o
- 10 D223E/K240E/N351D; o
- T167I/K240T/A294E/N303K; o
- T167I/K240E/A242S/A294E/N303K; o
- A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K; o
- A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K; o
- 15 A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K; o
- D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K; o
- A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F o
- N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/ A294E/N303K.
- 20 12. Un polipéptido/enzima fitasa de acuerdo con lo descrito en los párrafos 8 a 11, en donde dicho polipéptido o enzima fitasa aislado es una variante mejorada de la enzima fitasa, que en comparación con la enzima fitasa madre tiene una o varias propiedades seleccionadas entre:
- i. mayor termoestabilidad y/o
- ii. actividad específica y/o
- iii. estabilidad proteolítica
- 25 13. Una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada entre
- i) Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la fitasa como se describe en uno cualquiera de los párrafos 1 a 12.
- 30 ii) Un ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID n.º 3 u homólogo del mismo, en condiciones de rigor medio, preferentemente unas condiciones de rigor alto o muy alto.
- iii) Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia que se presenta en la SEQ ID n.º 2 o un homólogo de la misma.
- iv) Un ácido nucleico que se hibrida con la SEQ ID n.º 2 o un complemento de la misma en condiciones de rigor medio, preferentemente unas condiciones de rigor alto o muy alto.
- 35 14. Una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con el párrafo 13, que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID n.º 3, o una secuencia que tiene una identidad (homología) de secuencia de al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% con ella o un fragmento eficaz de la misma.
- 40 15. Una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con los párrafos 13 o 14, que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que, o que es complementaria a, o que contiene cualquier sustitución de codones adecuada de cualquiera de, los de la SEQ ID n.º 2, o comprende una secuencia que tiene una homología de secuencia de al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% con la SEQ ID n.º 2.
- 45 16. Una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con los párrafos 13 a 15, en donde dicha molécula de ácido nucleico codifica el polipéptido de los párrafos 8 a 12.

17. Un plásmido o sistema de vector que comprende un nucleótido de acuerdo con los párrafos 13 a 16.
18. Un plásmido o sistema de vector de acuerdo con el párrafo 17, en donde dicho plásmido o sistema de vector es un vector de expresión para la expresión de una cualquiera de las enzimas de acuerdo con los párrafos 1 a 12, y/o comprende polinucleótidos de acuerdo con los párrafos 13 a 16 en un microorganismo.
- 5 19. Una célula hospedadora transformada o transfectada con un plásmido o sistema de vector como el descrito en uno cualquiera de los párrafos 17 o 18.
20. Una célula hospedadora como la descrita en el párrafo 19, que comprende una fitasa que comprende una secuencia aminoacídica, o fragmento funcional de la misma, como se presenta en la SEQ ID n.º 3 o una secuencia polipeptídica homóloga que es homóloga al menos al 75% con ésta.
- 10 21. Una célula hospedadora como la descrita en el párrafo 19 o 20, en donde dicha célula hospedadora procede de un microorganismo, que incluye las bacterias tal como *B. Subtilis*, *E. coli*, y hongos, entre ellos levadura tal como *H. polymorpha*, *S. pombe*, *S. cerevisiae*, y hongos filamentosos, tal como *Trichoderma spp.* y *Aspergillus spp.* tal como *A. oryzae*.
- 15 22. Una célula hospedadora como la descrita en el párrafo 21, en donde dicho microorganismo es una célula bacteriana procariota, preferentemente *E. coli*.
23. Una célula bacteriana de la cepa *Buttiauxella sp.* P1-29 depositada con el número de acceso NCIMB 41248.
24. Un método para producir un polipéptido, que comprende expresar una secuencia de aminoácidos de acuerdo con los párrafos 1 a 12, y/o expresar los polinucleótidos de acuerdo con los párrafos 13 a 16, en una célula hospedadora y separar dicha fitasa del medio de cultivo de la célula hospedadora.
- 20 25. Un método para producir alimento o pienso para consumo animal, que comprende una etapa de pulverizar un polipéptido como el descrito en uno cualquiera de los párrafos 1 a 12 en forma líquida sobre dicho alimento o pienso para consumo animal.
26. Un método para producir alimento o pienso para consumo animal, que comprende una etapa de mezclar el polipéptido como el descrito en uno cualquiera de los párrafos 1 a 12 como un producto seco con dicho alimento o pienso para consumo animal.
- 25 27. Utilización de una fitasa como la descrita en uno cualquiera de los párrafos 1 a 12 en alimento o pienso para consumo animal.
28. Una composición de alimento o de pienso para consumo animal que comprende bien i) una fitasa como la descrita en uno cualquiera de los párrafos 1 a 12 y/o ii) un pienso para consumo animal producido mediante el método de acuerdo con los párrafos 25 o 26.
- 30 29. Un método de preparación de una variante de la enzima fitasa, comprendiendo dicho método las etapas secuenciales siguientes:
- 35 a) Seleccionar al menos una enzima fitasa madre, en donde la al menos una enzima fitasa madre se selecciona entre i) los polipéptidos de acuerdo con los párrafos 1 a 12 y/o ii) al menos una variante de la enzima fitasa;
- b) Generar al menos una variante de la fitasa mediante la introducción de al menos una alteración de dicha enzima fitasa madre que es una inserción, una delección o una sustitución o combinación de las mismas, de un resto aminoacídico en dicha enzima fitasa madre para obtener al menos una variante de la enzima fitasa;
- 40 c) Escrutar dicha al menos una variante de la enzima fitasa para identificar una variante mejorada de la enzima fitasa que, en comparación con la enzima fitasa madre, tiene una o varias propiedades seleccionadas entre:
- i) mayor termoestabilidad y/o
- ii) actividad específica y/o
- iii) estabilidad proteolítica
- 45 d) Preparar dicha variante mejorada de la enzima fitasa, preferentemente para producir una variante de la enzima fitasa purificada y/o aislada.
30. Un método de acuerdo con el párrafo 29, en el que durante la etapa b) se genera una población de variantes de la enzima fitasa y en la etapa c) se escruta al menos una proporción de dicha población de variantes de la enzima fitasa.

- 5 31. Método de acuerdo con los párrafos 29 o 30, en el que la etapa a) comprende someter a mutagénesis una secuencia nucleotídica de acuerdo con los párrafos 11 a 13 que codifica una enzima fitasa madre, y la etapa b) comprende expresar la secuencia nucleotídica mutada obtenida en la etapa (a) en una célula hospedadora, y la etapa c) comprende escrutar las células hospedadoras, o extracto(s) de las mismas, para identificar una variante mejorada de la enzima fitasa con dicha propiedad o propiedades mejoradas.
- 10 32. Un método de acuerdo con los párrafos 29 a 31 que, después de la etapa c), y opcionalmente la etapa d), comprende además al menos una ronda posterior de repetición de las etapas a) a c) y opcionalmente la etapa d), en donde, preferentemente, en dicha ronda o rondas posteriores, la al menos una enzima fitasa madre de la etapa a) se selecciona entre dicha al menos una variante de la enzima fitasa y/o una variante mejorada de la fitasa preparada de acuerdo con el método de los párrafos 29 a 31.
- 15 33. Un método de acuerdo con los párrafos 29 a 32, en el que la etapa c) comprende el escrutinio de las células hospedadoras para identificar las que expresan una variante mejorada de la enzima fitasa que, en comparación con i) dicha enzima fitasa madre y/o ii) un polipéptido que comprende la SEQ ID n.º 3, tiene una diferencia de termoestabilidad de al menos 2,5.
- 20 34. Un método de acuerdo con los párrafos 29 a 33, en el que la etapa c) comprende el escrutinio de las células hospedadoras para identificar las que expresan una variante mejorada de la enzima fitasa que, en comparación con i) dicha enzima fitasa madre y/o ii) un polipéptido que comprende la SEQ ID n.º 3, tiene una estabilidad frente a la pepsina de al menos 30.
- 35 35. Un método de acuerdo con los párrafos 29 a 34, en el que la etapa c) comprende el escrutinio de las células hospedadoras para identificar las que expresan una variante mejorada de la enzima fitasa que en comparación con i) dicha enzima fitasa madre y/o ii) un polipéptido que comprende la SEQ ID n.º 3, tiene una proporción de actividad específica en comparación con la fitasa codificada por la SEQ ID n.º 3 de al menos 110.
- 25 36. Una variante mejorada de fitasa preparada de acuerdo con el método de los párrafos 29 a 35.
- 30 37. Una construcción de ácido polinucleico, preferentemente una construcción de ADN, que comprende una secuencia de ácido polinucleico que codifica una variante mejorada de la enzima fitasa de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 16 o 36.
- 35 38. Un vector de expresión recombinante que comprende una construcción de ácido polinucleotídico de acuerdo con el párrafo 37.
39. Una célula hospedadora que está transformada con un ácido polinucleico de ADN de acuerdo con el párrafo 37 y/o un vector de acuerdo con el párrafo 38.
40. Un método para producir una variante mejorada de la enzima fitasa, que comprende cultivar la célula hospedadora de acuerdo con el párrafo 39 en las condiciones que permiten la expresión de dicha variante mejorada de la enzima fitasa.
41. Composición para pienso o para alimento, que comprende al menos una variante mejorada de la enzima fitasa según uno cualquiera de los párrafos 8 a 12 o 36, o una célula hospedadora según el párrafo 38, en donde dicha composición para alimento o pienso está preparada preferentemente de acuerdo con los métodos de los párrafos 25 o 26.

SEQ ID n.º 1

ACTACGACGCAC TTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCT  
TTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGA  
TGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCT  
TTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGT  
TGCGGGACTTAACCCAACATTTCAACAACGAGCTGACGACAGCCATGCA  
GCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACTAAGGCATCTCTGCCAAATTCT  
GTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCA  
CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAAACC  
TTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGC  
CACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACT  
ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTC  
AGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCT  
ACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCACCCCCCTCTACAAGACTCTA  
GCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCCGAGGTTGAGCCCCGGG

SEQ ID n.º 2

TTTCACATAGCAAACAACAACGAGACGAACTCGACGTTACCGCTTTGCTT  
CTGGAGTATATTTATCAGACTCAAACACCCCAAAGAAAAGAGGCTGTAAA  
TGACGATCTCTGCGTTTAAACCGCAAAAACTGACGCTTCACCCTGGTCTG  
TTCGTAGCACTGAGCGCCATATTTTCATTAGGCTCTACGGCCTATGCCAA  
CGACACTCCCGCTTCAGGCTACCAGGTTGAGAAAGTGGTAATACTCAGCC  
GCCACGGGGTGCGAGCACCAACCAAATGACACAGACCATGCGCGACGTA  
ACACCTAATACCTGGCCCGAATGGCCAGTAAAATTGGGTATATCACGCC  
ACGCGGTGAGCATCTGATTAGCCTGATGGGCGGGTTTTATCGCCAGAAGT  
TTCAACAACAGGGCATTTTATCGCAGGGCAGTTGCCCCACACCAAACCTCA  
ATTTATGTCTGGGCAGACGTTGATCAGCGCACGCTTAAAACCTGGCGAAGC  
TTTCTGGCAGGGCTTGCTCCGGAATGTCATTTAACTATTACCACCAGC  
AGGACATCAAAAAGCCGATCCGCTGTTCCATCCGGTGAAAGCGGGCACC  
TGTTCAATGGATAAAAACCTCAGGTCCAACAGGCCGTTGAAAAGAAGCTCA  
AACCCCATTTGATAATCTGAATCAGCACTATATTCCTTTCTGGCCTTGA

TGAATACGACCCTCAACTTTTCGACGTCGGCCTGGTGTGAGAAACACAGC  
 GCGGATAAAAGCTGTGATTTAGGGCTATCCATGCCGAGCAAGCTGTGAT  
 AAAAGATAATGGCAACAAAGTCGCTCTCGACGGGGCCATTGGCCTTTCGT  
 CTACGCTTGCTGAAATTTTCCTGCTGGAATATGCGCAAGGGATGCCGCAA  
 GCGGCGTGGGGGAATATTCATTTCAGAGCAAGAGTGGGCGTCGCTACTGAA  
 ACTGCATAACGTCCAGTTTGATTTGATGGCACGCACGCCTTATATCGCCA  
 GACATAACGGCACGCCTTTATTGCAGGCCATCAGCAACGCGCTGAACCCG  
 AATGCCACCGAAAGCAAACCTGCCTGATATCTCACCTGACAATAAGATCCT  
 GTTTATTGCCGGACACGATACCAATATTGCCAATATCGCAGGCATGCTCA  
 ACATGCGCTGGACGCTACCTGGGCAACCCGATAACACCCCTCCGGGCGGC  
 GCTTTAGTCTTTGAGCGTTTGGCCGATAAGTCAGGGAAACAATATGTTAG  
 CGTGAGCATGGTGTATCAGACTCTCGAGCAGTTGCGCTCCCAAACACCAC  
 TTAGCCTTAATCAACCTGCGGGAAGCGTACAGCTAAAAATTCCTGGCTGT  
 AACGATCAGACGGCTGAAGGATACTGCCCGCTGTCGACGTTCACTCGCGT  
 GGTTAGCCAAAGCGTGGAACCAGGCTGCCAGCTACAGTAAATATCAGACA  
 AAAAAATGCCGCTCGCGATTAAGCGAACGGCATTACTTCCTAGCTTCCC  
 AGCTCGGATTAGCATGGCGAGAGCCGAAAACTT

SEQ ID n.º 3

MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILS  
 RHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYRQK  
 FQQQGILSQGSCPTPNSIYVWADVDRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQ  
 QDIKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQA VEKEAQTPIDNLNQHYPFLAL  
 MNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNKVALDGAIGLS  
 STLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIA  
 RHNGTPLLQAI SNALNPNATESKLPDISPDNKILFLAGHDTNIANIAGML  
 NMRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLQQLRSQTP  
 LSLNQPAGSVQLKI PGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

ES 2 391 078 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DANISCO A/S

<120> ENZIMAS

5

<130> P021161wo

<140> PCT/IB2005/003376

<141> 2005-10-17

10

<150> GB 0423139.5

<151> 2004-10-18

<160> 7

15

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 691

20 <212> ADN

<213> *Buttiauxella*

<400> 1

```
actacgacgc actttatgag gtccgcttgc tctcgcgagg tcgcttctct ttgtatgcgc      60
cattgtagca cgtgtgtagc cctactcgtg agggccatga tgacttgacg tcatccccac      120
cttcctccag tttatcactg gcagtctcct ttgagttccc ggccgaaccg ctggcaacaa      180
aggataaggg ttgcgctcgt tgcgggactt aacccaacat ttcacaacac gagctgacga      240
cagccatgca gcacctgtct cacagtcccc gaaggcacta aggcatctct gccaaattct      300
gtggatgtca agagtaggta aggttctctc cgttgcatcg aattaaacca catgctccac      360
cgcttgtgcg ggcccccgtc aattcatttg agttttaacc ttgcggccgt actccccagg      420
cggtcgactt aacgcgtagt ctccggaagc cactcctcaa ggaacaacc tccaagtcga      480
catcgtttac ggcgtggact accaggggat ctaatcctgt ttgctcccca cgctttcgca      540
cctgagcgtc agtctttgtc cagggggccg ccttcgccac cggtatctct ccagatctct      600
acgcatttca ccgctacacc tggaattcta cccccctcta caagactcta gcctgccagt      660
ttcgaatgca gttcccaggt tgagcccggg g      691
```

<210> 2

25 <211> 1534

<212> ADN



ES 2 391 078 T3

<213> *Buttiauxella*

<400> 2

tttcacatag caaacaacaa cgagacgaac tcgacgttac cgctttgctt ctggagtata	60
tttatcagac tcaaacaccc caaagaaaag aggctgtaaa tgacgatctc tgcgtttaac	120
cgcaaaaaac tgacgcttca ccctggctcg ttcgtagcac tgagcgccat attttcatta	180
ggctctacgg cctatgccaa cgacactccc gcttcaggct accaggttga gaaagtggta	240
atactcagcc gccacggggt gcgagcacca accaaaatga cacagacat gcgcgacgta	300
acacctaata cctggcccga atggccagta aaattgggtt atatcacgcc acgcggtgag	360
catctgatta gcctgatggg cgggttttat cgccagaagt ttcaacaaca gggcatttta	420
tcgcagggca gttgccccac accaaactca atttatgtct gggcagacgt tgatcagcgc	480
acgcttaaaa ctggcgaagc tttcctggca gggcttgctc cggaatgtca ttaactatt	540
caccaccagc aggacatcaa aaaagccgat ccgctgttcc atccggtgaa agcgggcacc	600
tgttcaatgg ataaaactca ggtccaacag gccgttgaaa aagaagctca aacccccatt	660
gataatctga atcagacta tattcccttt ctggccttga tgaatacgac cctcaacttt	720
tcgacgtcgg cctggtgtca gaaacacagc gcggataaaa gctgtgattt agggctatcc	780
atgccgagca agctgtcgat aaaagataat ggcaacaaag tcgctctcga cggggccatt	840
ggcctttcgt ctacgcttgc tgaaattttc ctgctggaat atgcgcaagg gatgccgcaa	900
gcggcgtggg ggaatattca ttcagagcaa gagtgggctg cgctactgaa actgcataac	960
gtccagtttg atttgatggc acgcacgcct tataatcgcca gacataacgg cacgccttta	1020
ttgcaggcca tcagcaacgc gctgaacccg aatgccaccg aaagcaaact gcctgatatc	1080
tcacctgaca ataagatcct gtttattgcc ggacacgata ccaatattgc caatatcgca	1140
ggcatgctca acatgcgctg gacgctacct gggcaacccg ataacacccc tccgggcggc	1200
gctttagtct ttgagcgttt ggccgataag tcagggaaac aatatgttag cgtgagcatg	1260
gtgtatcaga ctctcgagca gttgcgctcc caaacaccac ttagccttaa tcaacctgcg	1320
ggaagcgtac agctaaaaat tcctggctgt aacgatcaga cggctgaagg atactgcccg	1380
ctgtcgacgt tcaactcgcgt ggtagccaa agcgtggaac caggctgcca gctacagtaa	1440
atatcagaca aaaaaatgc cgctcgcgat taagcgaacg gcattacttc ctagcttccc	1500
agctcggatt agcatggcga gagccgaaaa actt	1534

5 <210> 3

<211> 446

<212> PRT

<213> *Buttiauxella*

10 <220>

<221> SITIO

<222> (59)..(59)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

<222> (70)..(70)

5 <223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

<222> (122)..(122)

10 <223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

<222> (125)..(125)

15 <223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

<222> (167)..(167)

20 <223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

<222> (193)..(193)

25 <223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

<222> (197)..(197)

30 <223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

<222> (204)..(204)

35 <223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

<222> (209)..(209)

<223> Cualquier aminoácido

5 <220>

<221> SITIO

<222> (211)..(211)

<223> Cualquier aminoácido

10 <220>

<221> SITIO

<222> (221)..(221)

<223> Cualquier aminoácido

15 <220>

<221> SITIO

<222> (223)..(223)

<223> Cualquier aminoácido

20 <220>

<221> SITIO

<222> (225)..(225)

<223> Cualquier aminoácido

25 <220>

<221> SITIO

<222> (240)..(240)

<223> Cualquier aminoácido

30 <220>

<221> SITIO

<222> (242)..(242)

<223> Cualquier aminoácido

35 <220>

<221> SITIO

<222> (244)..(244)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

5 <222> (268)..(268)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

<222> (281)..(281)

10 <223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

<222> (289)..(289)

15 <223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

<222> (294)..(294)

20 <223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

<222> (303)..(303)

25 <223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

<222> (336)..(336)

30 <223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

<222> (351)..(351)

35 <223> Cualquier aminoácido

<400> 3

Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly  
 1 5 10 15

Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr  
 20 25 30

Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile  
 35 40 45

Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met  
 50 55 60

Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly  
 65 70 75 80

Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe  
 85 90 95

Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys  
 100 105 110

Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr  
 115 120 125

Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His  
 130 135 140

Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe  
 145 150 155 160

His Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln  
 165 170 175

Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln  
 180 185 190

His Tyr Ile Pro Phe Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser

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

<210> 4

<211> 18

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador oligonucleotídico

<400> 4

cagcmgccgc ggtaatwc 18

5

<210> 5

<211> 15

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> cebador oligonucleotídico

<400> 5

15 acgggcggtg tgtrc 15

<210> 6

<211> 30

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> cebador oligonucleotídico

25 <400> 6

ggaattcata tgacgatctc tgcgttaac 30

<210> 7

<211> 33

30 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador oligonucleotídico

35

<400> 7

ggaattcgga tcctactgt agctggcagc ctg 33



## REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de una variante de la enzima fitasa, comprendiendo dicho método las siguientes etapas secuenciales:

5 a) seleccionar al menos una enzima fitasa madre, en donde la al menos una enzima fitasa madre es un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en:

- un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se presenta en la SEQ ID n.º 3 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80% con ésta;
- un polipéptido que se puede obtener de la cepa P1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada con el número de acceso NCIMB 41248;
- 10 • un polipéptido que se puede obtener mediante la expresión de la SEQ ID n.º 2 o una secuencia nucleotídica que se puede obtener de la cepa P1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada con el número de acceso NCIMB 41248 o una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con ésta; y
- 15 • un polipéptido que se puede obtener de la cepa P1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada con el número de acceso NCIMB 41248 y en donde el péptido se obtiene mediante la expresión de la SEQ ID n.º 2 o de una secuencia de nucleótidos que se puede obtener de la cepa P1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada con el número de acceso NCIMB 41248 o de una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con ésta,

20 en donde dicho polipéptido tiene actividad fitasa, en donde dicho polipéptido tiene una actividad específica de al menos 300 U/mg, en donde dicha actividad específica se determina mediante la incubación de dicho polipéptido en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a pH 3,5, a una temperatura de 37 °C;

25 b) generar al menos una variante de fitasa mediante la introducción de al menos una alteración de dicha enzima fitasa madre que es una inserción, una delección o una sustitución o combinación de las mismas, de un resto aminoácido en dicha enzima fitasa madre para obtener al menos una variante de la enzima fitasa;

c) escrutar en busca de dicha al menos una variante de la enzima fitasa para identificar una variante de la enzima fitasa mejorada que, en comparación con la enzima fitasa madre, tiene al menos una o varias propiedades mejoradas seleccionadas entre:

- i. mayor termoestabilidad; y/o
- 30 ii. mayor actividad específica; y/o
- iii. mayor estabilidad proteolítica;

d) preparar dicha variante mejorada de la enzima fitasa.

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido está aislado y/o purificado.

35 3. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que dicho polipéptido tiene un máximo de actividad alrededor de pH 3 a 6, en donde dicha actividad se determina mediante la incubación de dicho polipéptido en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a una temperatura de 37 °C.

40 4. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que dicho polipéptido tiene un máximo de actividad a aproximadamente pH 4 a 5, en donde dicha actividad se determina mediante la incubación de dicho polipéptido en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a una temperatura de 37 °C.

45 5. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que dicho polipéptido tiene un máximo de actividad a aproximadamente pH 4,5, en donde dicha actividad se determina mediante la incubación de dicho polipéptido en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a una temperatura de 37 °C.

6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende mutaciones en al menos una de las siguientes posiciones, numeradas de acuerdo con la numeración en la SEQ ID n.º 3: K 59, T 70, A 122, D 125, T 167, H 193, F 197, T 204, T 209, A 211, S 221, I 223, S 225, K 240, A 242, D 244, A 268, S 281, Q 289, A 294, N 303, I 336 o N 351.

5 7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho polipéptido comprende una o varias de las siguientes mutaciones:

K 59 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o

T 70 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y; o

A 122 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o

10 D 125 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o

T 167 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y; o

H 193 A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o

F 197 A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o

T 204 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y; o

15 T 209 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y; o

A 211 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o

S 221 A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o

D 223 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o

G 225, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y; o

20 K 240 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o

A 242 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o

D 244 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o

A 268 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M; N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o

S 281 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o

25 Q 289 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y; o

A 294 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o

N 303 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o

I 336 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; o

N 351 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y.

30 8. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende al menos una mutación seleccionada entre el grupo que consiste en: K59E; T167V; K240T; T167I; K240E; D244C; Q289Y; T209K o F197S.

9. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende una combinación de mutaciones seleccionadas entre el grupo que consiste en:

D125E/H193R; o

A294E/N303K; o

5 T167I/K240T; o

D223E/K240E/N351D; o

T167I/K240T/A294E/N303K; o

T167I/K240E/A242S/A294E/N303K; o

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

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

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

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

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

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

15 10. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho polipéptido comprende la combinación de las mutaciones:

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

20 11. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que dicho polipéptido es una variante de la enzima fitasa que tiene mayor estabilidad térmica y/o mayor actividad específica y/o mayor estabilidad proteolítica que la enzima fitasa codificada por la SEQ ID n.º 2.

12. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que durante la etapa b) se genera una población de variantes de la enzima fitasa y en la etapa c) se escruta al menos una proporción de dicha población de variantes de la enzima fitasa.

25 13. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la etapa a) comprende someter a mutagénesis una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima fitasa madre, y la etapa b) comprende expresar la secuencia de nucleótidos mutada obtenida en la etapa (a) en una célula hospedadora, y la etapa c) comprende el escrutinio de las células hospedadoras, o de un extracto(s) de las mismas, para identificar una variante mejorada de la enzima fitasa con dicha propiedad o propiedades mejoradas.

30 14. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que, después de la etapa c), y opcionalmente la etapa d), comprende adicionalmente al menos una ronda posterior de repetición de las etapas a) a c), y opcionalmente la etapa d).

35 15. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la etapa c) comprende el escrutinio de las células hospedadoras que expresan una variante mejorada de la enzima fitasa que, en comparación con dicha enzima fitasa madre, tiene una diferencia de termoestabilidad de al menos 2,5 °C, en donde la diferencia de la termoestabilidad se calcula sustrayendo la temperatura de inactivación de la enzima fitasa madre de la temperatura de inactivación de la enzima fitasa mejorada, en donde la temperatura de inactivación es la temperatura a la que la actividad residual es del 50% después de la incubación durante 10 min y el posterior enfriamiento a temperatura ambiente, en comparación con la actividad residual después de la incubación durante el mismo tiempo en las mismas condiciones a temperatura ambiente.

16. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la etapa c) comprende el escrutinio de las células hospedadoras que expresan una variante mejorada de la enzima fitasa que, en comparación con dicha enzima fitasa madre, tiene una estabilidad frente a la pepsina de al menos el 30% de actividad residual, en donde la actividad residual se calcula comparando la actividad medida a pH 3,5, 37 °C, después de la incubación durante 2 horas a pH 2,0 con pepsina a 0,25 mg/ml, CaCl<sub>2</sub> a 1 mM y SAB a 5 mg/ml a 37 °C, con la actividad después de la incubación durante 2 horas a pH 5,0, CaCl<sub>2</sub> a 1 mM y SAB a 5 mg/ml a 37 °C sin pepsina.
17. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la etapa c) comprende el escrutinio de las células hospedadoras para identificar las que expresan una variante mejorada de la enzima fitasa que, en comparación con dicha enzima fitasa madre, tiene una proporción de la actividad específica de al menos el 110%.
18. Método de preparación de una variante de la enzima fitasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la fitasa madre comprende la secuencia de aminoácidos que se presenta en la SEQ ID n.º 3 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 85% con ella.
19. Método de preparación de una variante de la enzima fitasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la fitasa madre comprende una polipéptido que se puede obtener mediante la expresión de la SEQ ID n.º 2 o una secuencia de nucleótidos que se puede obtener de la cepa P1-29 de *Buttiauxella* sp. depositada con el número de acceso NCIMB 41248 o una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 85% con ella.
20. Método de preparación de una variante de la enzima fitasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la fitasa madre comprende un polipéptido que se puede obtener de una molécula de ácido nucleico aislada que se hibrida a la SEQ ID n.º 2 en condiciones rigurosas a 50 °C y en SSC a 0,2X.
21. Método de preparación de una variante de la enzima fitasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la fitasa madre comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID n.º 3.

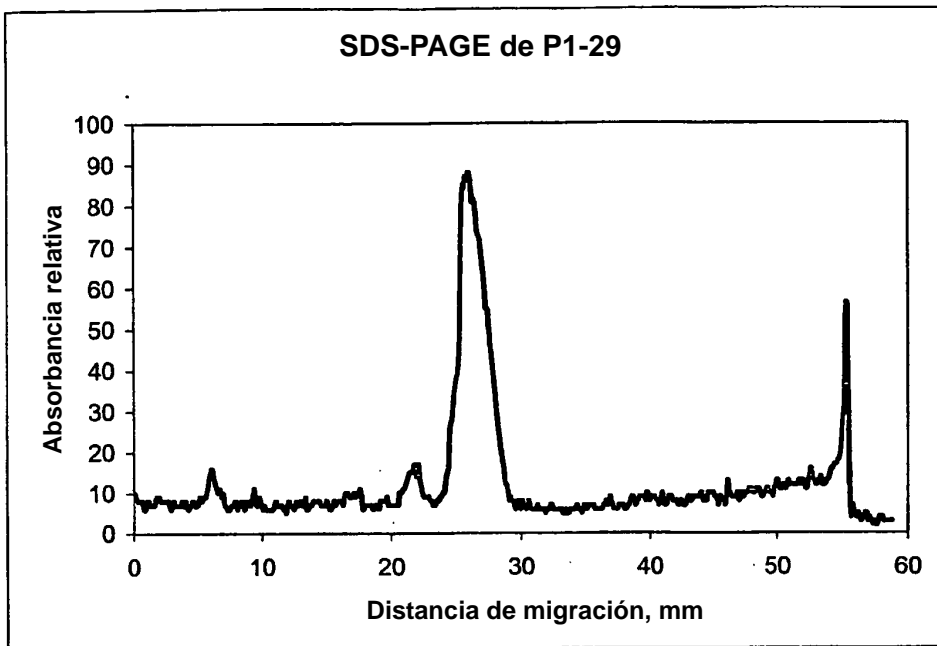


Figura 1

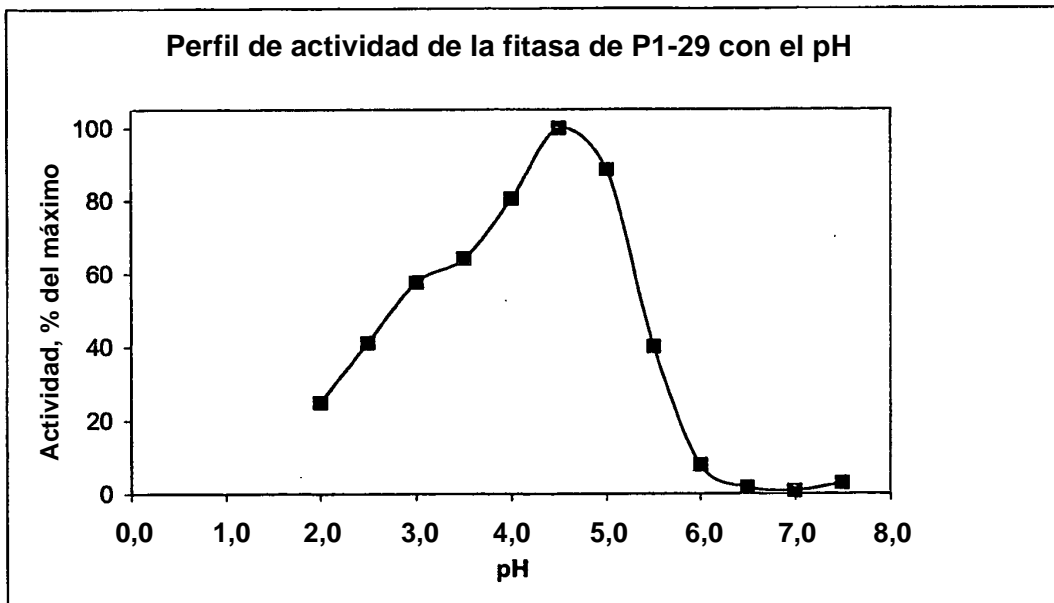


Figura 2

5

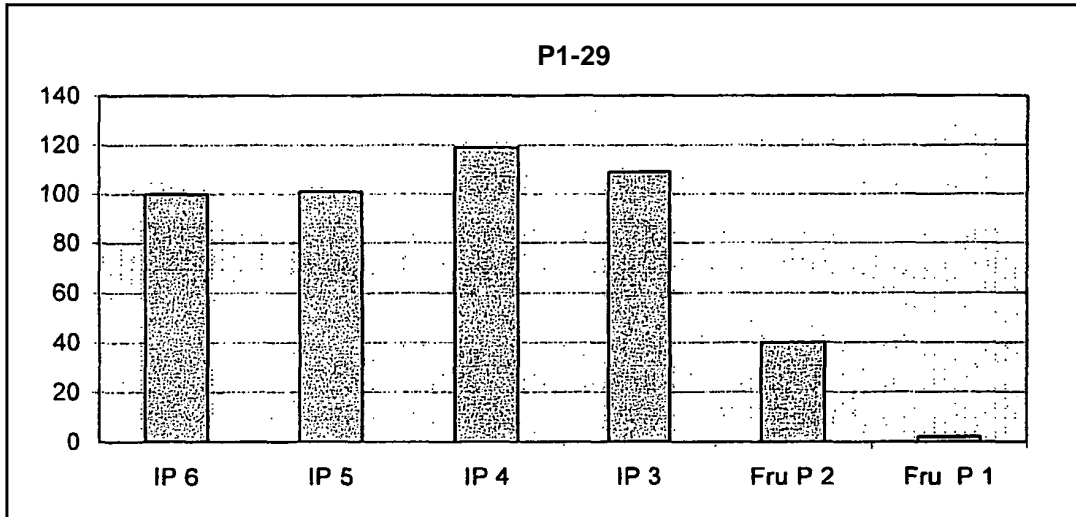


Figura 3