

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 432**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2005 E 05797743 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 1812565**

54 Título: **Polipéptido con una actividad de fitasa y secuencia de nucleótidos que codifica éste**

30 Prioridad:

15.10.2004 DE 102004050410

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.04.2013

73 Titular/es:

**AB ENZYMES GMBH (100.0%)
FELDBERGSTRASSE 78
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:

**NGUYEN, KHANH QUOC y
WINTER, BRUNO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 401 432 T3

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).

DESCRIPCIÓN

Polipéptido con una actividad de fitasa y secuencia de nucleótidos que codifica éste

5 El invento se refiere a una molécula de ADN recombinante, que codifica un polipéptido con una actividad de fitasa, así como al polipéptido codificado como tal. En particular, el invento se refiere a una molécula de ADN recombinante, que codifica un polipéptido con una actividad de fitasa, habiéndose obtenido la secuencia de ADN mediante una variación de la fitasa de *E. coli* madura de tipo silvestre, habiendo sido modificadas unas posiciones definidas de aminoácidos en comparación con la secuencia de tipo silvestre. El invento se refiere además a un procedimiento para la expresión de la fitasa recombinante así como a su utilización en la tecnología de los alimentos y piensos.

10 El ácido fítico o 1,2,3,4,5,6-hexaquis-dihidrógenofosfato de mioinositol (denominado abreviadamente hexaquisfosfato de mioinositol) es la fuente principal de inositol y la forma primaria de almacenamiento de fosfato en semillas de plantas. En las semillas de leguminosas, aproximadamente un 70 % del contenido de fosfato se presenta como una sal mixta de potasio, magnesio y calcio del ácido fítico. Las semillas, los granos de cereales y las leguminosas son unos componentes importantes de formulaciones de alimentos y piensos, en particular de preparados de piensos para animales; pero también en la alimentación humana van ganando crecientemente en importancia los cereales y las leguminosas.

15 Las unidades de fosfato del ácido fítico (PPU, acrónimo de Phytic acid Phosphate Units) fijan en forma de un complejo a ciertos cationes divalentes y trivalentes tales como iones de metales, es decir a unos iones importantes desde el punto de vista fisiológico nutritivo tales como calcio, hierro, zinc y magnesio, así como a los elementos traza manganeso, cobre y molibdeno. Junto a esto, el ácido fítico fija también proteínas hasta una cierta medida mediante una interacción electrostática.

20 El ácido fítico y sus sales, los fitatos, frecuentemente no se metabolizaban, puesto que no se absorben desde el tracto gastrointestinal, es decir que ni el fósforo allí contenido ni los iones de metales quelatados, ni las proteínas fijadas están disponibles desde el punto de vista fisiológico de nutrición.

25 Puesto que el fósforo es un elemento esencial para el crecimiento de todos los organismos, los alimentos y piensos tienen que ser suplementados con un fosfato inorgánico. Muy frecuentemente también tienen que ser suplementados los iones esenciales desde el punto de vista fisiológico de nutrición, tales como los de hierro y calcio. Además, se reduce el valor fisiológico de nutrición de cualquier dieta, puesto que las proteínas son fijadas por el ácido fítico. Como consecuencia, el ácido fítico es designado frecuentemente como un factor anti-valor nutritivo.

30 Además, debido a la ausencia de una metabolización del ácido fítico, el fósforo del fitato es segregado a través del tracto gastrointestinal de los animales, lo que conduce a una indeseada impurificación por fosfato del medio ambiente, como consecuencia de lo cual puede llegarse, por ejemplo, a una eutrofización de las aguas y a un crecimiento excesivo de las algas.

35 El ácido fítico o los fitatos (estas expresiones son utilizadas en lo sucesivo como sinónimas excepto que se indique otra cosa distinta) pueden ser degradados por unas fitasas. Las semillas de plantas que contienen ácido fítico, contienen unas enzimas fitasas endógenas. En el caso de su asimilación, los fitatos que se encuentran en alimentos o respectivamente piensos, son hidrolizables en teoría por las fitasas endógenas de las plantas, por unas fitasas procedentes de la flora intestinal y por unas fitasas procedentes de la mucosa intestinal. Sin embargo, en la práctica el potencial de hidrólisis de las fitasas endógenas de plantas y de las fitasas que se presentan en el intestino, siempre y cuando que estén presentes, no es suficiente ni con mucho para garantizar de una manera significativa la biodisponibilidad del fósforo fijado en los fitatos. Por lo tanto, a los alimentos o respectivamente piensos se les añaden frecuentemente unas fitasas exógenas.

40 Las fitasas pueden ser producidas por plantas así como por microorganismos. Entre los microorganismos, se conocen unas bacterias que producen fitasas así como unos hongos y unas levaduras que producen fitasas.

45 Los productores de fitasas que se presentan en la naturaleza tienen sin embargo la desventaja, de que se forma una fitasa sólo en determinadas cantidades y con unas propiedades definidas. Sin embargo, tal como se ha expuesto precedentemente, subsiste una necesidad aumentada de una fitasa en particular para la industria de los alimentos y piensos.

50 El presente invento se basa por consiguiente en la misión de poner a disposición un polipéptido con una actividad de fitasa, que se pueda producir de una manera rentable. En particular, la fitasa debe de poder ser producida a un precio barato. La fitasa debe de conservar, además, las propiedades esenciales de la fitasa natural de tipo silvestre de *E. coli*, pero debe de distinguirse por una actividad aumentada en el material sobrenadante del cultivo o respectivamente por una segregabilidad mejorada. Entre las propiedades esenciales de la fitasa natural de tipo silvestre se cuentan en particular la capacidad de mejorar la disponibilidad de fosfato in vivo e in vitro, así como la idoneidad como un agente coadyuvante de panificación.

65

El presente invento se basa, además, en la misión de poner a disposición un gen para un polipéptido con una actividad de fitasa, que en el caso de una expresión en una célula anfitriona tenga como consecuencia una actividad aumentada de la proteína codificada de esta manera en el material sobrenadante del cultivo o respectivamente una secreción aumentada del polipéptido. El polipéptido debe de ser producido de una manera rentable y a un precio barato. En particular, la expresión del polipéptido debe de conducir a unos rendimientos más altos en microorganismos eucarióticos, comparada con la expresión de la fitasa de tipo silvestre. Además, se deben de poner a disposición las secuencias de ADN que codifican el polipéptido, unas correspondientes construcciones artificiales de ADN y unos vectores, así como una fuente para la enzima recombinante, que sea apropiada para la utilización comercial para alimentos y piensos y en procesos industriales, y unas composiciones que contengan la enzima conforme al invento.

Por fin, se encontró sorprendentemente que una mutación en la región desde el aminoácido 189 inclusive hasta el aminoácido 211 inclusive y/o desde el aminoácido 137 inclusive hasta el aminoácido 152 inclusive de la fitasa de tipo silvestre de *E. coli* conduce a una actividad aumentada en el material sobrenadante del cultivo total por la proteína fitasa sin perjudicar a los efectos ventajosos y a las propiedades esenciales de la fitasa de tipo silvestre de *E. coli*.

Se han descrito varias fitasas procedentes de *E. coli* en la bibliografía, p.ej. en la cita de Dassa y colaboradores, 1990, J. Bacteriol. 172: 5497-5500 (n° de acceso M58708). Ya fueron asimismo descritos unos mutantes modificados genéticamente de la fitasa de *E. coli*, los cuales conducían a una estabilidad térmica aumentada y/o a unas actividades específicas más altas (véanse Rodríguez y colaboradores, 2000, Arch. Biochem. Biophys., 382:105-112, Lanahan y colaboradores, 2003, el documento de solicitud de patente de los EE.UU. US 2003 0157646 A1 y el documento de solicitud de patente internacional WO 01/90333). Una mutagénesis específica para un sitio de la fitasa de *Escherichia coli* con unas propiedades enzimáticas mejoradas se ha descrito además en el documento WO 01/36607. El mutante con Val-Tyr descrito aquí en la posición 200 no corresponde, sin embargo, a la mutación en la posición 200 conforme al invento, puesto que, de acuerdo con el documento WO 01/36607, se había utilizado otro modo de recuento de la secuencia, es decir que se había incluido en el recuento la secuencia directora. La posición 222 en la secuencia de acuerdo con esta publicación (WO 01/36607) corresponde por consiguiente a la posición 200 del recuento conforme al invento. Otras proteínas con una actividad de fitasa se han divulgado en los documentos WO 99/08539, WO 01/90333, WO 02/095003, WO 03/038035, WO 03/038111, WO 04/015084 y WO 00/71728.

Además, la publicación de Garret y colaboradores: Applied Environ. Microbiol. 2004, 70(5), 3041-3046 describe unos mutantes de la fitasa de *E. coli* con una aumentada estabilidad térmica y gastrointestinal.

El estado de la técnica no contiene sin embargo ninguna descripción acerca de unas mutaciones en la fitasa de *E. coli*, que conduzcan a una producción aumentada de una enzima procariótica en el caso de una expresión por medio de un microorganismo eucariótico. Además, el estado de la técnica no contiene ninguna mención acerca del recurso de conseguir, por medio de una variación y en particular una mutación de la fitasa de *E. coli*, una actividad aumentada en el material sobrenadante del cultivo mediante la enzima producida de esta manera. En particular, el estado de la técnica no contiene ninguna mención acerca de la importancia funcional de las posiciones 189 hasta 211 y/o de las posiciones 137 hasta 152 de la secuencia de la fitasa de *E. coli* de tipo silvestre. De manera muy especial, el estado de la técnica no contiene ninguna mención acerca de la importancia funcional de la posición 200 de la secuencia de la fitasa de *E. coli* de tipo silvestre.

El problema planteado por esta misión se resuelve mediante una molécula de ADN recombinante que, después de su expresión en una célula anfitriona procariótica o eucariótica, codifica un polipéptido con una actividad de fitasa, comprendiendo la molécula de ADN recombinante una secuencia de ADN, escogida entre el conjunto formado por a) unas secuencias de ADN, que se han obtenido mediante variaciones de la secuencia de la fitasa de *E. coli* madura de tipo silvestre, teniendo las secuencias de ADN por lo menos una mutación, que se escoge entre el conjunto formado por Val 200 → Leu, Val 200 → Ile, Val 200 → Pro, Val 200 → Tyr, Leu 207 → Tyr y Leu 207 → Phe, y b) unas secuencias de ADN que, debido a la degeneración del código genético, están emparentadas con las secuencias de acuerdo con a), realizándose que la molécula de ADN recombinante, en el caso de una expresión en una adecuada célula anfitriona, va acompañada por una actividad aumentada de la proteína codificada de esta manera en el material sobrenadante del cultivo.

El invento se refiere además a un procedimiento para la producción de un polipéptido con una actividad de fitasa según unas técnicas recombinantes que comprenden la cultivación de unas células anfitrionas procarióticas y/o eucarióticas recombinantes, que contienen una secuencia de ácido nucleico conforme al invento, en unas condiciones que fomentan la expresión de la enzima así como la subsiguiente obtención de la enzima. Además de esto, el invento se refiere a la utilización del polipéptido con una actividad de fitasa en unos procedimientos habituales, p.ej. en unos procedimientos, que o bien ponen en libertad in vitro a unos minerales a partir de unos complejos con fitato en materiales vegetales, p.ej. en el caso del tratamiento de piensos, o a su utilización al cocer pan, o que los ponen en libertad in vivo, es decir a la administración del polipéptido con una actividad de fitasa a animales. Además, el invento se refiere a la utilización de las secuencias de polinucleótidos conformes al invento para la producción de unas sondas destinadas a descubrir unas secuencias similares, que codifican unas correspondientes enzimas, en otros organismos, así como para la transformación de células anfitrionas.

La presente solicitud de patente describe además una secuencia de señal derivada del gen de la fitasa de *Aspergillus niger*.

5 Las Figuras adjuntas ilustran más detalladamente el invento:

La Fig. 1: muestra una SDS-PAGE de unos materiales sobrenadantes del cultivo de unas cepas transformadas con los plásmidos pKDa2 y pKDa4. Las bandas 1 y 6 contienen unas proteínas de marcación. La descripción exacta está contenida en el Ejemplo 6 y en la Tabla 3.

10 La Fig. 2: muestra un mapa plasmídico de pKDa2 (mutante con Tyr²⁰⁰)

La Fig. 3: muestra un mapa plasmídico de pKDa4 (de tipo silvestre)

15 La Fig. 4: muestra un mapa plasmídico de Da2pUC3

La Fig. 5: muestra una secuencia de ADN, que codifica la fitasa de *E. coli* de tipo silvestre (uso de codones de *E. coli*) (Dassa y colaboradores, 1990, J. Bacteriol. 172:5497-5500, n° de acceso: M58704), proteína madura

20 El plásmido Da2pUC3 fue presentado bajo el número de presentación DSM 16396 el 7 de mayo de 2004 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos celulares) GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, de acuerdo con las condiciones del Convenio de Budapest.

25 Sorprendentemente, se encontró que una mutación de aminoácidos en la región de las posiciones 189 hasta 211 (inclusive los valores límites) y/o una mutación de aminoácidos en la región de las posiciones 137 hasta 152 (inclusive los valores límite) de la secuencia de la fitasa de *E. coli* de tipo silvestre va acompañada por una actividad manifiestamente aumentada en el material sobrenadante del cultivo en el caso de una expresión en una célula anfitriona. En este caso, se trata de las siguientes mutaciones: Val 200 → Leu, Val 200 → Ile, Val 200 → Pro, Val 200 → Tyr, Leu 207 → Tyr y Leu 207 → Phe. Las mutaciones preferidas son Val 200 → Leu, Val 200 → Pro y Val 200 → Tyr. De manera especialmente preferida, una mutación se presenta en la posición Val 200. Sin estar vinculados por la subsiguiente explicación teórica, se supone que mediante la modificación conforme al invento resultan unas modificaciones en dos regiones estructurales de la fitasa, que están contiguas en el espacio, es decir de la hoja desplegable β y de la hélice α, y estas regiones son modificadas mediante una interacción hidrófoba de tal manera que resulta una mejor densidad de empaquetamiento. Ésta conduce, a su vez, a una actividad aumentada en el material sobrenadante del cultivo o respectivamente a una secreción de una enzima modificada de tal manera. Dentro del marco de la precedente condición, en las mencionadas regiones se pueden llevar a cabo y combinar unas mutaciones arbitrarias, siempre y cuando que un microorganismo transformado con una correspondiente secuencia de ADN segregue la fitasa codificada en unas cantidades aumentadas desde la célula anfitriona, mediando conservación de la actividad enzimática y de las otras propiedades fisiológicas de la fitasa de *E. coli* de tipo silvestre, o respectivamente con la propiedad de conducir a una aumentada actividad (actividad global) en el material sobrenadante del cultivo. De manera preferida, el mejoramiento de la actividad en el material sobrenadante del cultivo o respectivamente la eficiencia de secreción de un mutante, comparado la fitasa de *E. coli* de tipo silvestre es de por lo menos un 10 %, de manera preferida de por lo menos un 20 %, en el caso de efectuarse la medición en idénticas condiciones. La determinación de la actividad enzimática de la fitasa así como la medición de otras propiedades fisiológicas de la fitasa se pueden llevar a cabo según unos procedimientos en sí conocidos.

30 La consecución de un aumento de por lo menos un 10 % de la actividad en el material sobrenadante del cultivo o respectivamente de la eficiencia de la secreción de la fitasa, comparada con la eficiencia de la secreción de la fitasa de tipo silvestre, era sorprendente y no ha resultado evidente. En particular, era sorprendente el hecho de que el mutante Val 200 → Tyr vaya acompañado de un aumento del 100 % de la eficiencia de secreción, comparado con la de la fitasa de tipo silvestre (véase el Ejemplo 4).

35 Dentro del estado de la técnica se han descrito unos ensayos, con el fin de mejorar las propiedades de una fitasa. Así, la publicación Archives Biochem. Biophys., 2000, 382(1), 105-112 describe en la página 109, Tabla 3, las actividades de la fitasa en el material sobrenadante del cultivo en el caso de una secreción por medio de la levadura *Pichia pastoris*. La fitasa de *E. coli* de tipo silvestre (que no es exactamente idéntica en cuanto a la secuencia con respecto a la secuencia de pKDa4 conforme al invento) fue segregada después de 96 horas en una cantidad de 117 unidades ml⁻¹. En este caso se ha de señalar, que la determinación de la actividad de acuerdo con esta publicación no es idéntica a la determinación de la actividad de acuerdo con el Ejemplo 4 del presente invento. De acuerdo con el estado de la técnica en la publicación arriba mencionada el sustrato se incubaba con la enzima a un pH de 2,5. Conforme al invento, la incubación se efectúa a un pH de 5,0. A partir de las curvas que aparecen en la página 109, Figura 3 de esa publicación, se establece que 117 U ml⁻¹ a un pH de 2,5 solo corresponderían a aproximadamente 60 U ml⁻¹ a un pH de 5 (52 % de actividad restante). Por consiguiente, la actividad enzimática, medida en esta publicación, de la fitasa de *E. coli* de tipo silvestre segregada, que ha sido codificada por el uso de codones del tipo

silvestre de *E. coli*, es considerablemente menor que la actividad enzimática segregada, de 158 a 188 U ml⁻¹, que se obtiene con la cepa de *T. reesei* transformada con el pKDa4.

La secuencia de ADN correspondiente a la secuencia de la fitasa mutada conforme al invento se puede conseguir mediante utilización de unos arbitrarios usos de codones, siempre y cuando que mediante el uso de codones no se influya desventajosamente sobre el nivel de la secreción. Así, por ejemplo, se puede utilizar el uso de codones del microorganismo utilizado para la expresión, pero también se puede utilizar el uso de codones de *E. coli* o respectivamente de una variante de éste. Además, la secuencia de la fitasa de *E. coli* mutada conforme al invento puede contener otras variaciones de secuencia. En este caso se pueden llevar a cabo unas variaciones arbitrarias adicionalmente a las mutaciones precedentemente descritas, siempre y cuando que no sea perjudicada desventajosamente la propiedad de la consecución de una actividad aumentada en el material sobrenadante del cultivo o respectivamente de una eficiencia de la secreción, y siempre y cuando que sean conservadas la actividad enzimática y otras propiedades esenciales de la fitasa de *E. coli* de tipo silvestre.

Unas correspondientes variaciones son bien conocidas para un experto en la especialidad dentro del sector de la técnica del ADN recombinante, y éstas abarcan las mutaciones precedentes así como las variaciones ejemplificativas expuestas seguidamente.

Conforme al invento, se pueden utilizar unas moléculas formadas por adición y/o supresión del polipéptido modificado conforme al invento. Así, el polipéptido modificado con una actividad de fitasa conforme al invento se puede prolongar mediante adosamiento de otras secuencias junto al extremo terminal de N y/o al extremo terminal de C. De esta manera se pueden producir unas moléculas híbridas, que poseen otras propiedades ventajosas. A modo de ejemplo, se pueden adosar unas proteínas de fusión o respectivamente unas proteínas segregadas naturalmente en un alto grado, con lo cual se mejora aún más la eficiencia de la secreción. Además, se pueden adosar los segmentos activos de secuencias de otras enzimas, con el fin de obtener unas enzimas con una especificidad múltiple. Además, se pueden adosar unas secuencias polares o apolares, con el fin de influir de un modo deliberado sobre las propiedades de solubilidad o respectivamente sobre la capacidad de pasar a través de membranas de la enzima así obtenida. De manera preferida, en este caso el extremo N-terminal se une con una fitasa de *Aspergillus* o con una fosfatasa ácida. De igual manera, se pueden llevar a cabo unas elongaciones del terminal de C de la secuencia de la fitasa de *E. coli* mutada. De esta manera se pueden obtener unas fitasas con una estructura cuaternaria modificada.

Conforme al invento, se pueden suprimir también unos segmentos de secuencia del polipéptido con una actividad de fitasa, siempre y cuando que no sea perjudicada la propiedad de la secreción o respectivamente actividad aumentada en el material sobrenadante del cultivo mediante conservación de la actividad de fitasa.

Las mutaciones, las elongaciones y los acortamientos se pueden llevar a cabo de una manera en sí conocida según unos procedimientos bien conocidos en el sector especializado.

Las modificaciones tomadas en consideración precedentemente del polipéptido con una actividad de fitasa corresponden a unas correspondientes mutaciones o respectivamente modificaciones de la pertinente molécula de ADN. Conforme al invento se toman en consideración en tal caso también aquellas secuencias, que se hibridan en condiciones relajadas o rigurosas con las secuencias conformes al invento. Además, el invento se refiere también a aquellas secuencias, que tienen una homología de por lo menos 70 %, de manera preferida de por lo menos 90 % y en particular de por lo menos 95 %, con la secuencia de nucleótidos reivindicada o respectivamente con las partes reivindicadas de ésta, siempre y cuando que las respectivas secuencias conduzcan al aumento de la actividad en el material sobrenadante del cultivo o respectivamente de la eficiencia de secreción del polipéptido con una actividad de fitasa, que ha sido codificado por ellas. De manera preferida la homología es de 70 a 100 tantos por ciento. El grado de la identidad se determina en este caso preferiblemente de tal manera que se averigua el número de los restos de la secuencia más corta, que participa en la comparación, y que posee un "correspondiente" trozo antagonista en la otra secuencia. Para las finalidades del presente invento, en este caso la homología se determina preferiblemente de un modo usual mediante utilización de los algoritmos usuales. Conforme al invento, para la comparación sólo se aprovechan los ADNc's (cromosómicos) de las respectivas proteínas maduras. Como secuencias homólogas, se determinaron conforme al invento unos trozos antagonistas similares, de manera preferida idénticos, de la secuencia, con ayuda de unos conocidos programas de ordenador. Un ejemplo de un programa de este tipo es el programa Clone Manager Suite, que contiene la parte de programa Align Plus y que es distribuido por la entidad Scientific & Educational Software, Durham, NC, EE.UU. En este caso, se lleva a cabo una comparación de dos secuencias de ADN tales como las precedentemente definidas, bajo la "Option local alignment" o respectivamente según el método FastScan-MaxScore o según el método de Needleman-Wunsch mediante conservación de los valores de defecto (del inglés default). Especialmente, para el cálculo de la homología se usó conforme al invento la versión del programa "Clone Manager 7 Align Plus 5" con las funciones "Compare Two Sequences/Local Fast Scan-Max Score/Compare DNA sequences". En este caso se utilizaron los algoritmos accesibles a partir de las siguientes fuentes: Hirschberg, D.S. 1975. A linear space algorithm for computing longest common subsequences [Un algoritmo espacial lineal para procesar las subsecuencias comunes más larga]. Commun Assoc Comput Mach 15 18:341-343; Myers, E.W. y W. Miller. 1988. Optimal alignments in linear space [Alineaciones óptimas en un espacio lineal]. CABIOS 4:1, 11-17; Chao, K-M, W.R. Pearson y W. Miller. 1992.

Aligning two sequences within a specified diagonal band [Alineación de dos secuencias entre una banda diagonal especificada]. CABIOS 8:5, 481-487. El invento se refiere, además, también a unas secuencias de ADN que, debido a la degeneración del código genético, están emparentadas con las secuencias conformes al invento, así como a unas variantes alélicas de éstas. La degeneración del código genético puede resultar en este caso debido a una degeneración natural o debido a un uso de codones escogido especialmente. Las variantes alélicas que se presentan en la naturaleza, se pueden identificar mediando utilización de unas técnicas bien conocidas de la biología molecular, tales como p.ej. la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de unas técnicas de hibridación.

Una secuencia de ADN, que codifica un polipéptido conforme al invento, se puede utilizar para transformar a unas células anfitrionas arbitrarias tales como, por ejemplo, células de hongos, levaduras, bacterias, plantas o mamíferos. Las células transformadas de esta manera se distinguen por una secreción aumentada de una fitasa. La enzima fitasa producida de esta manera conduce también a una liberación eficiente de fosfato a partir de fosfatos de mioinositol.

Las expresiones "proteína", "péptido" y "polipéptido" deben de ser utilizadas de un modo intercambiable. Los conceptos "un polipéptido o una enzima con una actividad de fitasa" o "una fitasa" deben de designar a cualquier enzima, que puede dar lugar a la liberación de un fosfato inorgánico a partir de diferentes fosfatos de mioinositol. Ejemplos de tales substratos de fosfatos de mioinositol (de fitasa) son el ácido fítico y unas sales arbitrarias de éste, por ejemplo, fitato de sodio o fitato de potasio o unas sales mixtas. También unos arbitrarios isómeros de posición de los di-, tri-, tetra- o penta-fosfatos de mioinositol pueden servir como sustrato de una fitasa. La actividad de fitasa se puede determinar mediando utilización de cualquier sistema de ensayo arbitrario, en cuyo caso se utiliza uno de estos substratos. Una variante de fitasa conforme al invento abarca unas variantes de polipéptidos, que se derivan de una fitasa especial mediante supresión o adición de uno o varios aminoácidos junto al extremo terminal de N y/o terminal de C de la proteína natural, mediante supresión o adición de uno o varios aminoácidos en uno o varios sitios en la proteína natural, o mediante sustitución de uno o varios aminoácidos en uno o varios sitios en la fitasa. La producción de tales variantes es por lo general conocida para un experto en la especialidad. Por ejemplo, se pueden producir unas variantes de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos mediante una mutación en el ADN. Unos procedimientos para realizar una mutagénesis y una modificación de una secuencia de nucleótidos son bien conocidos en el sector especializado (compárense, a modo de ejemplo, las citas de Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488 (1985), de Kunkel y colaboradores, Methods in Enzymol., 154:367 (1987), el documento de patente de los EE.UU. n° 4.873.192, y de Walker y Gaastra coordinadores de edición, Techniques in Molecular Biology (Técnicas en la biología molecular), Mac Millan Publishing Company, Nueva York (1983)). Unas menciones acerca de unas adecuadas sustituciones de aminoácidos, que no perjudican a la actividad biológica de la proteína que interesa, se encuentran en el modelo de Dayhoff y colaboradores, Atlas of Protein Sequence and Structure (Atlas de las secuencias y estructuras de proteínas), Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C. (1978). Se prefieren unas sustituciones conservadoras tales como el intercambio de un aminoácido por otro que tiene unas propiedades similares.

El invento se refiere también a unas composiciones de ácidos nucleicos o de proteínas, aisladas o esencialmente purificadas. En este caso, el concepto de "un polinucleótido/polipéptido aislado y purificado o respectivamente un segmento de éste" designa a un polinucleótido o respectivamente un polipéptido o respectivamente un segmento de éstos, que se presenta aislado desde su entorno natural. Un segmento aislado de un poli(ácido nucleico) o un polipéptido se puede presentar en una forma purificada o se puede presentar en un entorno no natural, tal como, por ejemplo, en una célula anfitriona transgénica. Por ejemplo, un segmento de polinucleótido o una proteína, aislado/a o purificado/a, o una parte biológicamente activa de éste/a, está esencialmente exento/a de otro material o medio de cultivo celular en el caso de una producción según técnicas recombinantes o está esencialmente exento/a de compuestos precursores químicos o de otros compuestos químicos. De manera preferida, un polinucleótido aislado está exento de unas secuencias (de manera preferida de unas secuencias codificadoras de proteínas), que flanquean de modo natural al ácido nucleico (es decir unas secuencias, que están localizadas junto a los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que procede el ácido nucleico. Por ejemplo, de acuerdo con diferentes formas de realización, la molécula aislada de ácido nucleico contiene menos de aproximadamente 5 kb (kilobases), 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de unas secuencias de nucleótidos, que flanquean de modo natural a la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula, de la que se deriva el ácido nucleico. Una proteína, que está esencialmente exenta de un material celular, abarca unas composiciones de una proteína o un polipéptido con menos de aproximadamente 70 %, 50 %, 30%, 20 %, 10 % o 5 % (referido al peso en seco) de una proteína impurificadora. Cuando la proteína conforme al invento o un fragmento biológicamente activo de ésta se produce por medios recombinantes, el medio de cultivo abarca de manera preferida menos de aproximadamente 70 %, 50 %, 30 %, 20 %, 10 % o 5 % (referido al peso en seco) de los compuestos precursores químicos o de las sustancias químicas no proteínicas. Unos fragmentos y unas variantes de las secuencias de nucleótidos conformes al invento o unas proteínas o unos segmentos de proteínas, que son codificados de esta manera, se abarcan asimismo conforme al invento. El concepto de "fragmento" designa a una parte de la secuencia de nucleótidos o a una parte de la secuencia de aminoácidos, y por lo tanto a una parte del polipéptido o de la proteína, que es codificado/a por ésta.

El invento se refiere también a unos casetes de expresión, que se pueden utilizar para la introducción del marco de lectura abierto, que codifica una fitasa conforme al invento, en una célula anfitriona. Ellos abarcan de manera

- preferida una región de inicio de la transcripción, que está unida con el marco de lectura abierto. Un casete de expresión de este tipo puede contener un gran número de sitios de corte por restricción para la inserción del marco de lectura abierto y/o de otros ADN's, p.ej. una región reguladora de la transcripción y/o unos genes marcadores seleccionables. El casete de transcripción abarca en la dirección 5'→3' de la transcripción una región de transcripción y traducción, la secuencia de ADN que interesa, y una región de transcripción y traducción, que es funcional en una célula microbiana. La región de terminación puede ser natural en lo que se refiere a la región de iniciación de la transcripción, puede ser natural en lo que se refiere a la secuencia de ADN que interesa o se puede derivar de otra fuente arbitraria.
- La expresión "marco de lectura abierto" (ORF, acrónimo de Open Reading Frame) designa a la secuencia de aminoácidos, que es codificada entre el codón de iniciación y el codón de detención de la traducción de una secuencia codificadora. Las expresiones "codón de iniciación" y "codón de detención" designan a una unidad de tres nucleótidos contiguos (codones) en una secuencia codificadora, que especifican el inicio y la detención de una cadena de la síntesis de proteínas (traducción del ARNm (mensajero)).
- El concepto de "unión funcional" designa, en conexión con un ácido nucleico, a un compuesto como una parte constituyente de la misma molécula de ácidos nucleicos en una posición y una orientación adecuadas para la iniciación de la transcripción del promotor. Un ADN en unión funcional con un promotor se encuentra bajo la regulación de la iniciación de la transcripción del promotor. Las secuencias codificadoras pueden estar unidas funcionalmente con la secuencia reguladora en una orientación en el mismo sentido o antisentido. En el caso de hacerse referencia a unos polipéptidos, el concepto de "una unión funcional" significa la unión como una parte constituyente del mismo polipéptido, es decir a través de enlaces peptídicos.
- Conforme al invento se pueden utilizar unos promotores arbitrarios. El concepto de "promotor" designa a la secuencia de nucleótidos que se encuentra usualmente corriente arriba (5') en lo que se refiere a la secuencia codificadora y que controla la expresión de la secuencia codificadora, poniendo a disposición el reconocimiento para la polimerasa de ARN y otros factores, que son requeridos para una transcripción correcta. El promotor utilizado conforme al invento puede comprender un promotor mínimo, es decir una corta secuencia de ADN a base de una caja TATA y otras secuencias, que especifican el sitio de iniciación de la transcripción, junto al que están adosados los elementos reguladores para el control de la expresión.
- El promotor conforme al invento puede comprender también una secuencia de nucleótidos, que comprende un promotor mínimo y unos elementos reguladores, que puede controlar la expresión de una secuencia codificadora o de un ARN funcional. Este tipo de secuencia de promotor se compone de unos elementos próximos y distantes situados corriente arriba, siendo designados los elementos citados en último lugar frecuentemente como intensificadores (del inglés enhancer). Como consecuencia, un intensificador es una secuencia de ADN, que puede estimular a la actividad del promotor y que puede ser un elemento latente en el promotor o un elemento heterólogo insertado, con el fin de reforzar a la altura de expresión o a la especificidad para ciertos tejidos de un promotor. Tanto el intensificador como también otros elementos promotores situados corriente arriba fijan de un modo específico para una secuencia a unas proteínas, que se fijan a un ADN, las cuales promueven sus efectos. Los promotores se pueden derivar en su totalidad de un gen natural o pueden estar compuestos de diferentes elementos, que se derivan de diferentes promotores presentes en la naturaleza, o incluso pueden estar compuestos también de unos segmentos de ADN sintéticos. Un promotor puede contener también unas secuencias de ADN, que participan en la fijación de unos factores proteínicos, que controlan la eficiencia de la iniciación de la transcripción como respuesta a unas condiciones fisiológicas o debidas al desarrollo.
- Los elementos promotores, en particular los elementos TATA, que son inactivos o que poseen una actividad promotora fuertemente reducida en ausencia de una activación corriente arriba, son designados como promotores mínimos o promotores de núcleo. En presencia de un adecuado factor de transcripción o respectivamente de unos adecuados factores de transcripción, la función del promotor mínimo se encuentra en el hecho de hacer posible la transcripción. Un promotor mínimo o de núcleo se compone, por consiguiente, solamente de todos los elementos fundamentales, que son necesarios para la iniciación de la transcripción, p.ej. de una caja TATA y/o de un iniciador.
- El invento se refiere también a los vectores conformes al invento, que contienen un ADN. Estos vectores abarcan unos arbitrarios plásmidos, cósmidos, fagos y otros vectores en una forma bicatenaria o monocatenaria, lineal o circular, que eventualmente pueden ser, por su parte, transmisibles o movilizables, y que o bien pueden transformar a un anfitrión procariótico o eucariótico mediante integración en el genoma celular o bien se presentan fuera del cromosoma (p.ej. unos plásmidos que se replican autónomamente con un origen de la replicación).
- Unos vectores, plásmidos, cósmidos, cromosomas sintéticos de levaduras (YACs, acrónimo de Yeast Artificial Chromosomes), cromosomas bacterianos artificiales (BACs, acrónimo de Bacterial Artificial Chromosomes) y unos segmentos de ADN destinados a la utilización para la transformación de células, comprenden por lo general el ADN que codifica una fitasa conforme al invento, así como otro ADN distinto, tal como un ADNc, un gen o unos genes, que deben de ser introducidos en las células. Estas construcciones artificiales de ADN pueden abarcar otras estructuras tales como promotores, intensificadores, poliengarzadores o también genes reguladores, siempre y cuando que éstas/os sean necesarias/os. Uno de los segmentos de ADN o enes, que se había(n) escogido para la

introducción en las células, codifica(n) convenientemente una proteína, que es expresada en las células transformadas (células recombinantes), obtenidas de esta manera, lo que conduce a una característica escrutable o seleccionable y/o confiere a la célula transformada un fenotipo mejorado.

5 La construcción de unos vectores, que se pueden utilizar conforme al invento, es conocida para un experto en la especialidad en este sector a la vista de la divulgación precedente (compárese p.ej. la cita de Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual [Clonación molecular: Un Manual de laboratorio] (2ª edición, Coldspring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y. (1989)). El casete de expresión conforme al invento puede
10 contener uno o varios sitios de corte por restricción, con el fin de poner al polinucleótido que codifica la fitasa bajo la regulación de una secuencia reguladora. El casete de expresión puede contener también una señal de terminación en unión funcional con el polinucleótido, así como unas secuencias reguladoras, que se necesitan para la traducción en debida forma del polinucleótido. El casete de expresión, que contiene el polinucleótido conforme al invento, puede ser quimérico, es decir que por lo menos uno de sus componentes es heterólogo referido a por lo menos uno
15 de los otros componentes. La expresión del polinucleótido en el casete de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo, de un promotor inducible, de un promotor regulable, de un promotor vírico o de un promotor sintético.

Los vectores pueden contener ya unos elementos reguladores, p.ej. unos promotores, o las secuencias de ADN conformes al invento pueden ser manipuladas de tal manera, que ellas contengan tales elementos. Unos elementos
20 promotores adecuados, que se pueden utilizar, son conocidos en el sector especializado, y son, por ejemplo, para *Trichoderma reesei* el promotor de *cbh 1-* o *cbh-2*, para *Aspergillus oryzae* el promotor de *amy*, para *Aspergillus niger* los promotores de *xyl*, *glaA*, *alcA*, *aphA*, *tpiA*, *gpdA*, *sucl* y *pkiA*. Unos elementos promotores adecuados, que se pueden utilizar para la expresión en levaduras, son conocidos en el sector especializado y son, por ejemplo, el promotor de *pho5* o el promotor de *gap* para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*, y para *Pichia pastoris*, p.ej. el promotor de *aoxl*, o el promotor de *fmd* o el promotor de *mox* para *H. polymorpha*.
25

Un ADN, que se adecua para la introducción en células, puede contener, junto al ADN conforme al invento, también un ADN, que se había derivado de una fuente arbitraria o que se ha aislado a partir de ésta. Un ejemplo de un ADN derivado es una secuencia de ADN, que había sido identificada como un fragmento útil en un organismo determinado, y que luego se había sido sintetizada químicamente en una forma esencialmente pura. Un ejemplo de
30 un tal ADN es una adecuada secuencia de ADN, que se había obtenido por ejemplo mediando utilización de unas endonucleasas de restricción, de tal manera que ella se pueda manipular ulteriormente, por ejemplo amplificar, conforme al invento. Un ADN de este tipo es designado usualmente como ADN recombinante. Por lo tanto, un ADN adecuado abarca un ADN totalmente sintético, un ADN semisintético, un ADN aislado a partir de fuentes biológicas y un ADN derivado de un ARN introducido. Por lo general, el ADN introducido no es ningún componente original del genotipo del ADN del organismo receptor, pero conforme al invento también un gen se puede aislar y modificar eventualmente a partir de un genotipo establecido, y a continuación se pueden introducir múltiples copias del gen en el mismo genotipo, p.ej. con el fin de reforzar la producción de un producto génico establecido.
35

40 El ADN introducido abarca sin restricciones un ADN procedente de unos genes, tal como, por ejemplo, de bacterias, levaduras, hongos o virus. El ADN introducido puede abarcar unos genes modificados o sintéticos, unas partes de genes o unos genes quiméricos, inclusive unos genes procedentes del mismo genotipo o de un genotipo diferente.

El ADN utilizado para la transformación conforme al invento puede ser circular o lineal, bicatenario o monocatenario. Por lo general, el ADN se presenta en forma de un ADN quimérico tal como un ADN plasmídico, que contiene también unas regiones codificadoras, que están flanqueadas por unas secuencias reguladoras, las cuales apoyan a la expresión del ADN recombinante presente en la célula transformada. Por ejemplo, el ADN propiamente dicho puede contener, o se puede componer de, un promotor, que es activo en una célula, que se deriva de una fuente, que se diferencia de la célula, o se puede utilizar un promotor, que ya está presente en la célula, es decir la célula
50 diana de la transformación.

Por lo general, el ADN introducido es relativamente pequeño, de menos que aproximadamente 30 kb, para minimizar la sensibilidad frente a una degradación física, química o enzimática, que aumenta con el tamaño del ADN.

55 La selección de un adecuado vector de expresión depende de las células anfitrionas. Los vectores de expresión en levaduras u hongos pueden comprender un origen de la replicación, un promotor y un intensificador adecuados, y abarcan también unos/as arbitrarios/as necesarios/as sitios de fijación a ribosomas, sitios de poliadenilación, sitios de donantes y aceptores de empalme, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias flanqueadoras en 5' no traducidas.
60

Ejemplos de células anfitrionas adecuadas son: células de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Mucor*, *Penicillium*, etc., tales como, por ejemplo, levaduras, de los géneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Trichosporon*, *Schwanniomyces*, *Hansenula*, *Pichia* y similares. Unos sistemas anfitriones adecuados son, por ejemplo, unos hongos tales como *Aspergilli*, p.ej. *Aspergillus niger* (ATCC 9142) o *Aspergillus ficuum* (NRLL 3135) o *Trichoderma* (p.ej. *Trichoderma reesei* QM6a) y unas levaduras tales como *Saccharomyces*, p.ej. *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia*, tales como p.ej. *Pichia*
65

pastoris o *Hansenula*, p.ej. *H. polymorpha* (DSMZ 70277). Tales microorganismos se pueden obtener a partir de unos sitios de presentación reconocidos, p.ej. de la American Type Culture Collection (ATCC), de la Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) oder de la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) o de cualesquiera otros sitios de presentación.

5 El casete de expresión puede contener en la dirección de transcripción 5'-3' una región de transcripción y traducción del polinucleótido conforme al invento y una región de transcripción y terminación, que es funcional in vivo o in vitro. La región de terminación puede ser natural en lo que se refiere a la región de iniciación de la transcripción o puede ser natural en lo que se refiere al polinucleótido o puede ser de otra procedencia. Las secuencias reguladoras pueden estar localizadas corriente arriba (secuencias no codificadoras en 5'), dentro (un intrón) o corriente abajo (secuencias no codificadoras en 3') de una secuencia codificadora, e influyen sobre la transcripción, el procesamiento del ARN o la estabilidad y/o la traducción de la secuencia codificadora asociada. Las secuencias reguladoras pueden comprender, sin limitaciones, unos/as intensificadores, promotores, sitios de fijación a repesores, secuencias directoras de la traducción, intrones o secuencias de señal de poliadenilación. Ellas pueden comprender unas secuencias naturales o sintéticas así como unas secuencias, que constituyen una combinación de secuencias sintéticas y naturales.

El vector utilizado conforme al invento puede comprender también unas secuencias adecuadas para la amplificación de la expresión.

20 Ejemplos de unos promotores, que se pueden utilizar conforme al invento, son unos promotores, de los que se sabe que ellos controlan la expresión en las células eucarióticas. Se pueden utilizar cualesquiera promotores con la capacidad para la expresión en hongos filamentosos. Ejemplos de ellos son un promotor, que es inducido fuertemente por un almidón o una celulosa, p.ej. un promotor para la glucoamilasa o α -amilasa del género *Aspergillus* o la celulasas (celobiohidrolasa) del género *Trichoderma*, un promotor para unas enzimas en la ruta glicolítica del metabolismo, tal como, por ejemplo, la fosfoglicerato cinasa (PGK) y la glicerinaldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD), etc. Se prefiere el promotor de la celobiohidrolasa I, de la celobiohidrolasa II, de la amilasa, de la glucoamilasa, de la xilanasa o de la enolasa.

30 Son conocidos dos métodos principales para el control de la expresión, a saber una sobreexpresión y una infraexpresión. Una sobreexpresión se puede conseguir mediante inserción de una o varias copias suplementarias del gen escogido. Para la infraexpresión existen dos métodos principales, que se designan usualmente en el sector especializado como "regulación descendente antisentido (en inglés antisense downregulation)" y "regulación descendente en el mismo sentido (en inglés antisense downregulation)". Por lo general, estos procedimientos se designan como "silenciamiento de genes (en inglés gene silencing)". Ambos de estos métodos conducen a una inhibición de la expresión del gen diana.

Adicionalmente a la utilización de un promotor especial, todavía otros tipos de elementos pueden influir sobre la expresión de transgenes. En particular, se mostró que unos intrones poseen un potencial para el refuerzo de la expresión de transgenes.

El casete de expresión puede comprender todavía otros elementos, por ejemplo los que pueden ser regulados por unos elementos endógenos o exógenos tales como proteínas de dedo de zinc, inclusive unas proteínas de dedo de zinc que se presentan en la naturaleza o unas proteínas de dedo de zinc quiméricas.

El casete de expresión utilizado conforme al invento puede contener adicionalmente unos elementos intensificadores o elementos promotores situados corriente arriba.

50 Los vectores destinados a la utilización conforme al invento se pueden construir de tal manera que ellos contengan un elemento intensificador. Las construcciones artificiales conformes al invento comprenden por consiguiente el gen que interesa en común con una secuencia de ADN en 3', que actúa como una señal, a fin de terminar la transcripción y permitir la poliadenilación del ARNm así obtenido. Se pueden utilizar cualesquiera secuencias de señal, que hacen posible la secreción a partir del organismo anfitrión escogido. Una secuencia de señal preferida es la secuencia de señal de la fitasa procedente de *Aspergillus niger* o unas secuencias de señal derivadas de ésta para la secreción a partir de hongos filamentosos.

También se puede utilizar una secuencia directora especial, puesto que la secuencia de ADN situada entre el sitio de iniciación de la transcripción y el comienzo de la secuencia codificadora, es decir de la secuencia directora no traducida, puede influir sobre la expresión génica. Unas secuencias directoras preferidas comprenden unas secuencias, que controlan la expresión óptima del gen adosado, es decir que comprenden una secuencia preferida directora de consenso, que aumenta o conserva la estabilidad del ARNm, y que impide una iniciación inadecuada de la traducción. La elección de tales secuencias es bien conocida para un experto en la especialidad en este sector.

65 Con el fin de mejorar la posibilidad de identificar a los transformantes, un gen marcador seleccionable o escrutable se puede recoger en el casete de expresión. Tales genes marcadores son bien conocidos para un experto en la especialidad en este sector.

El casete de expresión o una construcción de vector, que contiene el casete de expresión, se introduce en una célula anfitriona. Están disponibles un gran número de técnicas y éstas son bien conocidas para un experto en la especialidad en el sector para la introducción de construcciones artificiales en una célula anfitriona. La transformación de células microbianas se puede llevar a cabo mediante utilización de un poli(etilenglicol), cloruro de calcio, una infección vírica, DEAE-dextrano, unas infecciones por fagos, una electroporación y otros métodos conocidos para un experto en la especialidad. La transformación de hongos se puede llevar a cabo según Penttilä y colaboradores, Gene 61:155-164, 1987. La introducción de un vector recombinante en levaduras se puede llevar a cabo según unos procedimientos en sí conocidos inclusive la electroporación, la utilización de esferoplastos, acetato de litio y similares.

Tan pronto como se haya obtenido el casete de expresión conforme al invento o respectivamente la secuencia de ADN conforme al invento, él/ella se puede introducir en unos vectores según unos procedimientos en sí conocidos, con el fin de sobreexpresar el polipéptido codificado en adecuados sistemas de anfitriones. Sin embargo, también se pueden utilizar unas secuencias de ADN como tales, con el fin de transformar a unos adecuados sistemas de anfitriones, y para conseguir una sobreexpresión del polipéptido codificado.

Tan pronto como una secuencia de ADN conforme al invento hubo sido expresada en una célula hospedante adecuada en un medio adecuado, la fitasa codificada puede ser concentrada y/o aislada según unos procedimientos en sí conocidos o bien a partir del medio, en el caso de que la fitasa sea segregada en el medio, o a partir del organismo anfitrión, en el caso de que la fitasa esté presente intracelularmente p.ej. en el espacio periplasmático. Unos procedimientos conocidos para la separación de los componentes insolubles del medio de cultivo y de la biomasa, seguidos por unos procedimientos para el aumento de la concentración de la fitasa, se pueden usar para la producción de unas soluciones concentradas de la fitasa, o como una preparación previa para la desecación de la fitasa. Por ejemplo, se pueden utilizar unos procedimientos de filtración o unos procedimientos de centrifugación para la separación de los componentes insolubles, seguidos por unos procedimientos de ultrafiltración para el aumento de la concentración o se usan unos procedimientos de filtración en flujo cruzado (en inglés cross-flow). La desecación se puede efectuar mediante una liofilización y una desecación por atomización, unos procedimientos de granulación, una extrusión u otros procedimientos. Se pueden utilizar unos procedimientos conocidos de purificación de proteínas, con el fin de aislar a las fitasas conformes al invento. Por ejemplo, se pueden utilizar diferentes procedimientos de cromatografía o de cromatografía en gel individualmente o en combinación. En dependencia de la célula anfitriona utilizada en el caso de un procedimiento de producción por vía recombinante, la enzima conforme al invento puede ser modificada covalentemente mediante glicosilación, o no. En las células eucarióticas la glicosilación de las proteínas segregadas sirve para modular el plegamiento de las proteínas, la estabilidad de la conformación, la estabilidad térmica y la resistencia frente a una proteólisis. En lo que se refiere a un uso específico de la fitasa, una variante glicosilada de la enzima se puede preferir con respecto a una variante no glicosilada. Por ejemplo, la utilización de una fitasa glicosilada en un pienso para animales sirve para la protección de la enzima contra una desnaturalización térmica durante la granulación del pienso y contra una desactivación proteolítica al efectuar el paso por el estómago del animal, con lo que se favorece la distribución de la enzima activa en el tracto gastrointestinal y en el sitio de acción. Para unos usos en la elaboración de alimentos, en los que la actividad enzimática es deseada sólo durante la elaboración y no en el producto final, se puede preferir una fitasa inestable térmicamente, es decir no glicosilada, y que es sensible frente a una degradación proteolítica.

El invento se refiere también a unas composiciones de fitasa, que contienen el polipéptido conforme al invento. Por lo general, las composiciones de fitasa son líquidas o secas. Unas composiciones líquidas contienen la enzima fitasa de manera preferida en una forma purificada o enriquecida. Sin embargo, también se pueden añadir unas sustancias auxiliares tales como, por ejemplo, un estabilizador con glicerol, sorbitol o mono(propilenglicol), unos aditivos tales como sales, azúcares, sustancias conservantes, agentes para el ajuste del valor del pH, proteínas y un fitato o sales de fosfatos de mioinositol (un substrato de fitasa). Unas típicas composiciones líquidas son suspensiones acuosas u oleosas. Las composiciones líquidas se pueden añadir a un alimento o pienso antes o después de una posible granulación o respectivamente etapa de elaboración. Las composiciones secas pueden ser unas composiciones liofilizadas, secadas por atomización o extrudidas, que pueden contener exclusivamente la enzima. Las composiciones secas pueden ser unos granulados, que se pueden mezclar fácilmente, por ejemplo, con alimentos o componentes de piensos, o que de manera más preferida forman un componente de una mezcla previa. El tamaño de partículas del granulado de enzima es de manera preferida compatible con el de los otros componentes de la mezcla. Esto hace posible unos medios seguros y convenientes, con el fin de incorporar enzimas, por ejemplo, en alimentos procesados, mezclas previas o piensos.

Por ejemplo, se puede preparar una formulación estable de la enzima fitasa conforme al invento mediante el recurso de que una mezcla a base de una solución líquida de enzima se atomiza sobre un agente de relleno tal como una harina de soja molida, y luego la mezcla se seca. La disminución de la humedad y las interacciones de fijación de la fitasa con el agente de relleno protegen a la enzima contra unas influencias del medio ambiente tales como unas temperaturas extremadas, que pueden aparecer durante la producción del pienso. Unas formulaciones secas y líquidas se pueden estabilizar adicionalmente, cuando se disminuye la actividad de unas potenciales enzimas proteolíticas, que pueden estar presentes como productos secundarios en la mezcla líquida de fermentación, que se utiliza para la producción de la enzima conforme al invento. La mezcla seca de enzimas, así obtenida, se puede

utilizar como un complemento de pienso para la utilización en la cría de aves de corral y de cerdos. Por ejemplo, la adición de 250 unidades enzimáticas de la enzima conforme al invento a 1 kg de una dieta de trigo patrón muestra unos efectos similares a los de 500 unidades enzimáticas de la fitasa de *Aspergillus*. Además, una disminución de la suplementación con fosfato conduce a una disminución de la impurificación con fosfato, que, por su parte, disminuye significativamente la carga para el medio ambiente causada por una cría intensiva de animales.

Tan pronto como se haya obtenido un preparado seco de enzimas, se puede producir un granulado por aglomeración. Para esto, se utiliza un mezclador con altas fuerzas de cizalladura, con el cual el material de relleno y la enzima se aglomeran concomitantemente y se forma un granulado. Los granulados por absorción se producen revistiendo unos núcleos a base de un material de soporte por medio de la enzima conforme al invento. Unos típicos materiales de relleno son ciertas sales tales como sulfato de disodio. Otros materiales de relleno comprenden caolín, talco, un silicato de magnesio y aluminio y fibras de celulosa. Eventualmente, unos agentes aglutinantes tales como dextrinas se recogen también en el granulado por aglomeración.

Unos típicos materiales de soporte comprenden un almidón, p.ej. en forma de mandioca, patatas y cereales, en particular maíz, arroz y trigo, o unos productos que contienen proteínas, tales como p.ej. una proteína de soja. También se pueden utilizar ciertas sales. El granulado se envuelve eventualmente con una mezcla de revestimiento. Una tal mezcla comprende unos agentes de revestimiento, de manera preferida unos agentes de revestimiento hidrófobos, un aceite de palma deshidratado y talco, y eventualmente otros aditivos tales como un carbonato de calcio o caolín con el fin de mejorar la biodisponibilidad en el sitio de acción conforme a las estipulaciones.

Adicionalmente, las mezclas con una fitasa pueden contener otras sustancias tales como agentes conferidores de color, compuestos aromatizantes, agentes estabilizadores, vitaminas, minerales, otras enzimas para alimentos o piensos, y similares. Esto es válido en particular para las denominadas mezclas previas.

Un aditivo para alimentos o piensos es un compuesto esencialmente puro o una composición de varios compuestos, que está destinado/a o es adecuado/a para ser añadido/a a alimentos o piensos. En particular, es una sustancia, que conforme a su finalidad de utilización es un componente de un alimento o pienso, o que influye sobre las propiedades de un producto de alimento o pienso. Así, un aditivo de fitasa debe de designar a una fitasa, que no constituye ningún componente natural de las sustancias que se utilizan predominantemente para alimentos y piensos, o que no están presentes en ellos en su concentración natural. Por ejemplo, la fitasa se añade al pienso por separado de las sustancias del pienso, a solas o en combinación con otros aditivos para piensos. Una típica mezcla previa comprende usualmente uno o varios compuestos tales como vitaminas, minerales o enzimas reforzadoras de piensos y unos adecuados vehículos y/o excipientes.

Una aditivo de fitasa presto para el uso es un aditivo, que no es producido in situ en piensos para animales o en alimentos elaborados. Un aditivo de fitasa presto para el uso se puede administrar a seres humanos o animales directamente o de manera preferida directamente después de la mezcladura con otros componentes del pienso o del alimento. Por ejemplo, un aditivo para piensos de acuerdo con este aspecto del presente invento se reúne con otros piensos y aditivos para piensos mediando obtención de una mezcla previa o de un pienso de complemento. Tales otros componentes de piensos comprenden uno o varios otros suplementos enzimáticos (de manera preferida termoestables), otros aditivos para piensos, piensos minerales y aminoácidos. Los aditivos para piensos (combinados) obtenidos de esta manera, pueden comprender varios tipos diferentes de compuestos y se pueden mezclar luego en su cantidad adecuada con los piensos, tales como soportes y vehículos de cereales y proteínas, mediando formación de un pienso compuesto para animales. La elaboración de estos componentes para dar un pienso para animales se puede llevar a cabo con unos dispositivos de elaboración en sí conocidos tales como una máquina de granulación doble, un granulador con vapor, un expansor o una extrusora.

De manera similar, un aditivo para alimentos de acuerdo con esta forma de realización del presente invento se puede reunir con otros componentes de alimentos, con lo que se producen unos productos alimenticios elaborados. Tales otros componentes de alimentos abarcan uno o varios suplementos enzimáticos, vitaminas, minerales y elementos traza. El agente de complemento nutritivo combinado, obtenido de esta manera, se puede mezclar luego en una cantidad adecuada con otros componentes de alimentos tales como cereales y proteínas vegetales, con el fin de proporcionar un alimento elaborado. La elaboración de estos componentes para dar un alimento elaborado se puede llevar a cabo mediando utilización de unos dispositivos de elaboración en sí conocidos.

En una forma preferida de realización, las composiciones de fitasa conformes al invento comprenden adicionalmente una cantidad eficaz de una o varias enzimas para alimentos o piensos, de manera preferida escogidas entre alfa-galactosidasas, beta-galactosidasas, laccasas, otras fitasas, fosfatasa, endoglucanasas, en particular endo-beta-1,4-glucanasas, endo-beta-1,3(4)-glucanasas, endo-1,2-beta-glucanasas y endo-1,3-alfa-glucanasas, celulasas, xilosidasas, galactanasas, en particular arabinogalactano-endo-1,4-beta-galactosidasas y arabinogalactano-endo-1,3-beta-galactosidasas, enzimas que degradan a pectinas, en particular pectinasas, pectina esterases, pectina liasas, poligalacturonasas, arabananasas, ramnogalacturonasas, ramnogalacturonacetil esterases, ramnogalacturonan-alfa-ramnosidasas, pectato liasas, y alfa-galacturonidasas, mananasas, beta-manosidasas, mananacetil esterases, xilanacetil esterases, proteasas, xilanasas, arabinoxilanasas y enzimas lipolíticas tales como lipasas, fosfolipasas y cutinasas.

El aditivo de piensos para animales conforme al invento se administra al animal antes de o al mismo tiempo que el pienso. De manera preferida, el aditivo de piensos para animales conforme al invento se administra al animal al mismo tiempo que el pienso.

5 Una cantidad eficaz de la fitasa en alimentos o piensos es de aproximadamente 10 - 20.000 PPU/kg, de manera preferida de 10 - 15.000 PPU/kg, de manera más preferida de 10 - 10.000 PPU/kg, en particular de aproximadamente 50 - 50.000 PPU/kg, en particular de 50 - 2.000 PPU/kg del pienso o de alimento.

10 El invento se refiere también a la utilización de una fitasa para la elaboración y producción de alimentos y piensos. Los cereales y las harinas para alimentos se pueden tratar enzimáticamente con una fitasa, con el fin de disminuir el contenido de fitina de las materias primas. Unos contenidos disminuidos de fitina mejoran la calidad de los alimentos, aumentando la disponibilidad de minerales esenciales tales como hierro, calcio y zinc. Adicionalmente al aumento de la calidad de los alimentos, la utilización de una fitasa durante la elaboración puede mejorar la eficiencia global de la producción de alimentos. Por ejemplo, la adición de una fitasa a copos blancos de soja durante la producción de un material aislado de proteínas de soja puede aumentar significativamente el rendimiento y la calidad de la proteína extraíble. En este caso, la fitasa es activa sólo durante la producción y la elaboración, y ya no es activa en el producto final. Este aspecto es importante en particular en el caso de la producción de una masa de panificación y al cocer pan, y en el caso de la producción de otros productos prestos para ser consumidos, constituidos sobre la base de cereales. De un modo similar, se pueden tratar previamente unos componentes de piensos tales como una harina de soja tostada o una harina de canola con una fitasa antes del proceso de producción propiamente dicho. La eliminación de factores anti-nutritivos en unos componentes de piensos antes de la producción conduce a una calidad fisiológicamente más alta y a unas más valiosas sustancias constitutivas de piensos para animales. En el caso de estos procedimientos de elaboración, la fitasa es activa durante la producción, y por regla general ya no es activa en el tracto digestivo del animal después de una asimilación del pienso tratado.

Adicionalmente a la utilización de una fitasa como un agente auxiliar para la elaboración de piensos, el presente invento se refiere a la utilización de la fitasa conforme al invento como un medio auxiliar de la digestión. Una fitasa en forma de tabletas puede ser ingerida conjuntamente con la ingestión de un alimento, con el fin de distribuir la enzima en el tracto gastrointestinal.

La fitasa conforme al invento puede pasar a emplearse asimismo de manera ventajosa en los casos de animales tanto monogástricos como también poligástricos, en particular en el caso de terneros jóvenes. Los piensos para peces y crustáceos se pueden suplementar asimismo con una fitasa, con el fin de mejorar el aprovechamiento del pienso y disminuir el contenido de fósforo segregado en el caso de una cría intensiva de animales. El pienso conforme al invento se puede administrar también a unos animales tales como aves de corral, p.ej. pollos de engorde, pavos, gansos, patos, así como cerdos, caballos, reses de vacuno, reses de bovino, cabras, perros y gatos, así como peces y crustáceos. Sin embargo, es especialmente preferido que el pienso conforme al invento sea administrado a cerdos o aves de corral.

Unas formulaciones de fitasa conformes al invento se pueden combinar también con otras sustancias constitutivas, con lo cual resultan unas composiciones de piensos nuevas y especialmente ventajosas. Puesto que, como se ha expuesto precedentemente, la disponibilidad de fosfato vegetal, que es baja en la harina de soja y en los cereales como consecuencia de la fijación al ácido fítico, se añade al pienso un fosfato inorgánico, con el fin de garantizar un abastecimiento adecuado con fósforo de los animales. Sin embargo, estos piensos contienen demasiada cantidad de fosfato total y conducen de esta manera a una contaminación del medio ambiente con fosfato. Especialmente, el pienso para animales conforme al invento comprende la combinación de una fitasa conforme al invento con unas sustancias constitutivas de piensos para animales, con el fin de proporcionar un pienso que tenga unos contenidos esencialmente reducidos de fósforo inorgánico añadido. En una forma de realización preferida, el pienso conforme al invento comprende unas/os típicas/os sustancias constitutivas de piensos, micronutrientes, elementos traza, vitaminas, etc., así como una cantidad eficaz de una fitasa y de fósforo inorgánico, estando comprendidas las cantidades de la fitasa y del fósforo entre 50 y 20.000 unidades de fitasa/kg de pienso y menos que 0,45 % de fósforo inorgánico, de manera preferida con unos contenidos situados entre 100 y 10.000 unidades de fitasa/kg de pienso y menos que 0,225 % de fósforo inorgánico, en particular unos contenidos de 150 - 10.000 unidades de fitasa/kg de pienso y menos que 0,15 % de fósforo inorgánico, en particular unos contenidos de 200 - 20.000 unidades de fitasa/kg de pienso y ninguna adición adicional de fósforo inorgánico.

El invento se refiere también a unos procedimientos para el mejoramiento del aumento del peso y de la capacidad de aprovechamiento del pienso (en inglés Feed Conversion Ratio, FCR = relación de conversión de alimento) en la nutrición de animales así como a la utilización de las fitasas conformes al invento en estos procedimientos. Una fitasa conforme al invento permite unos aumentos mejorados del peso y una mejorada capacidad de aprovechamiento del pienso, en particular en conexión con un pienso, que contiene poca cantidad de fosfato inorgánico. De acuerdo con el procedimiento conforme al invento, el contenido de fosfato inorgánico en el pienso puede ser reducido por debajo de unos contenidos de 0,45 %, de manera preferida por debajo de 0,225 %. De manera preferida, no se añade nada de fosfato inorgánico. Mediante una aumentada disponibilidad de fosfato como consecuencia de la adición de la enzima conforme al invento, se puede mejorar significativamente la mineralización

de los huesos de los animales, lo que tiene una gran importancia en particular en el caso de los animales que crecen rápidamente.

De acuerdo con todavía otra forma de realización, el invento se refiere a la utilización de la enzima conforme al invento al cocer pan (es decir panificar), con lo cual se mejoran la evolución, la elasticidad y/o la estabilidad de la masa de panificación y/o el volumen, la estructura de la miga y/o la resistencia del material panificado frente el fenómeno del asentamiento. A pesar de que el preparado enzimático conforme al invento se puede utilizar para la producción de una masa de panificación o de productos panificados a partir de cualesquiera tipos de harina, p.ej. sobre la base de centeno, cebada, avena o maíz, el preparado enzimático conforme al invento se acreditó como especialmente útil en el caso de la producción de masas de panificación o de productos panificados a base de trigo o de una proporción esencial de trigo. Los productos panificados, que se pueden producir con un preparado enzimático conforme al invento comprenden pan, panecillos, baguettes y similares. Para la panificación, el preparado enzimático conforme al invento se puede utilizar con una actividad enzimática adicional tal como p.ej. de xilanasas, lipasas, amilasas, oxidasas o laccasas, junto a la de fitasa, o se puede utilizar en combinaciones con otras enzimas tales como una lipasa, una amilasa, una oxidasa (p.ej. una glucosaoxidasa o una peroxidasa).

Los siguientes Ejemplos ilustran el invento más detalladamente.

Ejemplo 1: Determinación de la actividad de fitasa

La actividad de fitasa se midió en una mezcla de ensayo a base de 0,5 % de ácido fítico (aproximadamente 5 mM), citrato de sodio 200 mM, de pH 5,0. Después de una incubación durante 15 minutos a 37°C se interrumpió la reacción mediante la adición de un volumen igual de ácido tricloroacético al 15 %. Los iones de fosfato liberados se determinaron cuantitativamente a 820 nm por mezcladura de 100 µl de la mezcla de ensayo con 900 µl de H₂O y 1 ml de H₂SO₄ 0,6 M, 2 % de ácido ascórbico y 0,5 % de molibdato de amonio, después de haber incubado a 50°C con una duración de 20 min. Como referencia se utilizaron unas soluciones patrón de fosfato de potasio.

Ejemplo 2: Construcción de los plásmidos pKDa2 y pKDa4

La secuencia que codifica la fitasa de *E. coli* (Dassa y colaboradores 1990, J. Bacteriol. 172:5497-5500, n° de acceso M58704) fue revelada, desarrollada y sintetizada mediante utilización del uso de codones de *T. reesei* (<http://kazusa.or.jp/codon>). Todos los fragmentos sintetizados fueron secuenciados y los fragmentos con y sin mutaciones fueron asociados, con lo cual se produjeron nuevas variantes de fitasa. En una de las variantes obtenidas finalmente, el aminoácido Val²⁰⁰ (GTG) del gen de fitasa se modificó a Tyr²⁰⁰ (TAC). Esta variante se designó como Da2. El polinucleótido original no mutado se designó como Da4. Los clones maduros del gen de la fitasa de *E. coli* se amplificaron mediante una PCR. La secuencia de ADN con el codón CAG (Gln) en la posición 1 comprende un marco de lectura abierto de 1.230 pb (pares de bases) y codifica una enzima con 410 aminoácidos (SEQ ID NO: 1/2).

El péptido de señal (con 18 aminoácidos) de la fitasa de *A. niger* (SEQ ID NO: 3/4) se utilizó con el fin de segregar la fitasa de *E. coli* a partir de *Trichoderma reesei*. El gen sintético con la secuencia de señal modificada de la fitasa de *A. niger* y con la secuencia madura de la fitasa de *E. coli*, que contiene la mutación V200Y, fue clonado en el plásmido pUC18. El vector resultante se designó como Da2pUC3 y se depositó como DSM 16396 de acuerdo con las condiciones antes mencionadas. El plásmido presentado contiene el ADN con el uso de codones del hongo con unas pequeñas modificaciones correspondientes a los sitios de corte requeridos para las enzimas de restricción tal como se desprende de la siguiente Tabla 1:

Tabla 1:

<i>T. reesei</i>			Gen sintético de fitasa	
Uso del hongo	Codón	Frecuencia por mil	Número de tripletes en el gen sintético de la fitasa de <i>E. coli</i>	Frecuencia por mil en el gen sintético de la fitasa de <i>E. coli</i>
Ala	GCC	43,3	20	48,8
Ala	GCT	19,1	10	24,4
Ala	GCG	16,0	4	9,8
Ala	GCA	10,3	3	7,3
Arg	CGC	14,3	12	29,3
Arg	CGT	7,0	6	14,6
Arg	CGA	6,4	0	0,0
Arg	AGG	5,5	1	2,4
Arg	CGG	5,1	3	7,3
Arg	AGA	2,5	0	0,0
Asn	AAC	43,3	13	31,7
Asn	AAT	10,3	3	7,3
Asp	GAC	37,5	14	34,1

<i>T. reesei</i>			Gen sintético de fitasa	
Uso del hongo	Codón	Frecuencia por mil	Número de tripletes en el gen sintético de la fitasa de <i>E. coli</i>	Frecuencia por mil en el gen sintético de la fitasa de <i>E. coli</i>
Asp	GAT	15,7	5	12,2
Cys	TGC	12,8	5	12,2
Cys	TGT	4,0	3	7,3
Gln	CAG	37,1	24	58,5
Gln	CAA	8,6	5	12,2
Glu	GAG	31,1	17	41,5
Glu	GAA	6,9	4	9,8
Gly	GGC	54,4	16	39,0
Gly	GGT	16,9	6	14,6
Gly	GGA	13,0	6	14,6
Gly	GGG	8,2	1	2,4
His	CAC	18,3	7	17,1
His	CAT	4,0	1	2,4
Ile	ATC	29,9	11	26,8
Ile	ATT	15,1	3	7,3
Ile	ATA	1,5	0	0,0
Leu	CTG	26,1	27	65,9
Leu	CTC	25,1	21	51,2
Leu	CTT	9,9	5	12,2
Leu	TTG	6,7	0	0,0
Leu	CTA	1,8	0	0,0
Leu	TTA	0,3	0	0,0
Lys	AAG	38,5	13	31,7
Lys	AAA	3,4	1	2,4
Met	ATG	18,8	5	12,2
Phe	TTC	21,3	7	17,1
Phe	TTT	13,5	4	9,8
Pro	CCC	23,3	14	34,1
Pro	CCT	15,0	9	22,0
Pro	CCG	13,4	6	14,6
Pro	CCA	7,1	0	0,0
Ser	TCC	21,6	8	19,5
Ser	AGC	21,3	9	22,0
Ser	TCG	19,3	5	12,2
Ser	TCT	14,0	4	9,8
Ser	TCA	6,4	0	0,0
Ser	AGT	4,1	0	0,0
Thr	ACC	29,0	18	43,9
Thr	ACG	20,6	10	24,4
Thr	ACT	14,0	5	12,2
Thr	ACA	6,3	0	0,0
Trp	TGG	17,6	8	19,5
Tyr	TAC	27,1	4	9,8
Tyr	TAT	9,0	1	2,4
Val	GTC	36,3	14	34,1
Val	GTG	14,8	5	12,2
Val	GTT	11,7	4	9,8
Val	GTA	2,2	0	0,0

En el plásmido pKDa2 (mutante con Tyr²⁰⁰), el gen sintético está flanqueado por un sitio de disociación por restricción con *SacII* situado a 16 pares de bases corriente arriba del codón de iniciación y por un sitio de disociación por restricción para *BamHI* situado inmediatamente corriente abajo del codón de detención. Los 16 pares de bases situados corriente arriba del codón de iniciación pertenecen al promotor de *cbhl* de *T. reesei* (Shoemaker y colaboradores, 1983, Bio/Technology 1, 691-696). El gen sintético fue disociado con *SacII* y *BamHI* e insertado en los sitios de disociación con *SacII* y *BamHI* detrás del promotor de la *celobiohidrolasa I* de *T. reesei* en el plásmido pALK487 (documento WO 94/28117). Esta construcción artificial de plásmido se designó como pKDa1. Un fragmento de *EcoRI/Spel* con una longitud de 4,78 kb, de extremos lisos, del plásmido PALK424 (documento WO 93/24621), que contenía el marcador de *amdS* y las secuencias flanqueadoras en 3' de *cbhl*, se clonó en el sitio de disociación con *StuI* de pKDa1, con lo que se obtuvo el vector de expresión de fitasa pKDa2. El vector fue cartografiado mediante unas endonucleasas de restricción y la secuencia completa del fragmento sintetizado fue confirmada mediante secuenciación.

De una manera análoga se llevó a cabo la construcción del vector de expresión pKDa4 (de tipo silvestre).

5 Los casetes de expresión aislados a partir de los plásmidos pKDa2 o respectivamente pKDa4 contienen el siguiente material genético:

10 El promotor de *cbhl* (celobiohidrolasa I): El fragmento de *EcoRI/SacII* con una longitud de 2,2 kb, que contiene el promotor de *cbhl*, procede de *Trichoderma reesei* QM6a. La región de promotor funciona también como un ADN homólogo (en común con el fragmento de 3' de *cbhl*; véase a continuación), con el fin de controlar la integración del ADN en fase de transformación en el sitio (locus) de *cbhl*.

Secuencia de señal: Se utilizó el péptido de señal de la fitasa de *A. niger* (SEQ ID NO: 3/4), con el fin de segregar la fitasa de *E. coli* procedente de *Trichoderma reesei*.

15 Gen de la fitasa de *E. coli*: El gen sintético de la fitasa de *E. coli* (SEQ ID NO: 1) inclusive la secuencia de señal de fitasa de *A. niger* modificada para la expresión en *T. reesei* se fusionó entre el promotor de *cbhl* y el terminador de *cbhl*.

20 Terminador de *cbhl*: El fragmento de *BamHI/StuI* con una longitud de 0,75 kb, que contiene el terminador de *cbhl*, se adosó directamente a continuación de la fitasa de *E. coli*, con el fin de garantizar la terminación de la transcripción.

25 Gen *amdS*: El gen, inclusive su promotor y su terminador, se aisló a partir de *Aspergillus nidulans* VH1-TRSX6 y codifica acetamidasa (Hynes y colaboradores, 1983, Mol. Cell. Biol. 3: 1430-1439; Kelly y Hynes, 1985, EMBO J. 4:475-47). La acetamidasa permite a la cepa crecer mediante utilización de acetamida como única fuente de nitrógeno y esta característica se utilizó para la selección de los transformantes. El fragmento con un tamaño de 3,1 kb (de extremos lisos, de *SpeI/BamHI*) contiene 1.007 pbs (pares de bases) de la región de promotor, 1.897 bps de la región codificadora (inclusive los intrones) y 183 bps de la región de terminador del gen *amdS*.

30 Fragmento 3' de *cbhl*: El fragmento (de 1,7 kb, de *BamHI/EcoRI*, que comienza 1,4 kb detrás del codón de detención del gen) se aisló a partir de *T. reesei* ALKO2466. La cepa ALKO2466 procede de la cepa ALKO233 (Harkki y colaboradores, 1991, Enzyme Microb. Technol. 13: 227-233). El fragmento de 3' se utiliza en común con la región de promotor, con el fin de integrar de un modo dirigido al objetivo el casete de expresión de la fitasa en el sitio de *cbhl* mediante una recombinación homóloga.

35 La construcción artificial se escogió con el fin encontrar de un modo dirigido al objetivo y reemplazar el gen de una sola copia *cbhl*, que está presente en *T. reesei* RH3780d, con el fin de estudiar el efecto de la mutación mediante una copia del gen.

40 **Ejemplo 3: Transformación de *Trichoderma reesei* con pKDa2 y pKDa4, con el fin de obtener unos transformantes de una sola copia**

45 El *T. reesei* RH 3780d fue transformado por separado con los casetes de expresión linealizados y aislados a partir de los plásmidos pKDa2 y pKDa4. Las técnicas utilizadas para la transformación y la manipulación de *T. reesei* eran las que están de acuerdo con Penttilä y colaboradores (1987, Gene 61: 155-164). Los transformantes fueron seleccionados y purificados dos veces mediante aislamiento de una espora individual. Entre todos los transformantes se escogieron los que tienen el rendimiento más alto de secreción. Entre éstos, unos transformantes con un ADN procedente del plásmido pKDa2 se designaron como RH 31068 y RH 31069, unos transformantes con un ADN procedente del pKDa4 se designaron como RH 31071-31075, y se utilizaron para la caracterización ulterior.

50 **Ejemplo 4: Secreción de una fitasa en matraces de sacudimiento**

55 Unos transformantes, que llevan los casetes de expresión de pKDa2 o respectivamente pKDa4, fueron cultivados en matraces de sacudimiento sobre un medio que induce a la celulasa, que tiene la siguiente composición: un concentrado de proteínas de leche Nutrica 2 %, lactosa 1 %, DSG 1,5 %, KH₂PO₄ 5 %, (NH₄)₂SO₄ 0,5 %, polvo de maceración de maíz al 0,5 %, y el resto agua del grifo, y un ajuste del valor del pH a 5,3 antes de realizar la esterilización. Los materiales filtrados del cultivo, obtenidos después de una cultivación durante 6 días, se utilizaron para el análisis por SDS-PAGE y para la determinación de la actividad de fitasa. Los resultados mostraron, que las más altas actividades de fitasa se observaron en el medio de cultivo con unos transformantes, que contenían el casete de expresión de pKDa2. Las actividades expuestas en la siguiente Tabla 2 son las actividades máximas, que se consiguieron en el caso de la fermentación de los mejores transformantes en el periodo de tiempo de 6 días.

60

Tabla 2: Producción de la fitasa de *E. coli* por medio de unos transformantes, que contienen el casete de expresión procedente o bien de pKDa2 o de pKDa4.

Cepa	SDS-PAGE	Análisis por transferencia de borrar Southern suceso de integración	Casete de la fitasa número de copias	Fitasa PPU g ⁻¹	Casete de expresión
RH31068	CBHI ⁻	sitio de <i>cbhl</i>	una copia	417	pKDa2
RH31069	CBHI ⁻	sitio de <i>cbhl</i>	una copia	411	pKDa2
RH31071	CBHI ⁻	sitio de <i>cbhl</i>	una copia	188	pKDa4
RH31072	CBHI ⁻	sitio de <i>cbhl</i>	una copia	182	pKDa4
RH31073	CBHI ⁻	sitio de <i>cbhl</i>	una copia	171	pKDa4
RH31074	CBHI ⁻	sitio de <i>cbhl</i>	una copia	167	pKDa4
RH31075	CBHI ⁻	sitio de <i>cbhl</i>	una copia	158	pKDa4
RH3780d	CBHI ⁺			0,7	

- 5 Los precedentes resultados muestran que las cepas transformadas con el casete de expresión pKDa2, que contiene el mutante con Tyr²⁰⁰, tienen una secreción de la fitasa aproximadamente doble de alta que la de las cepas transformadas con la secuencia de tipo silvestre de *E. coli*, pKDa4.

10 Ejemplo 5: Transferencia de borrar Southern

El análisis por transferencia de borrar Southern se llevó a cabo con unos ADN's genómicos, que habían sido aislados a partir de la cepa anfitriona RH3780d y de unos transformantes de ambas construcciones artificiales, con el fin de valorar el suceso de integración del casete de expresión en el genoma. Después de una disociación del ADN genómico con *EcoRI* y de un examen minucioso con un fragmento de *EcoRI* que tiene un tamaño de 9,0 kb, en todos los transformantes estaba presente una banda en fase de hibridación con un tamaño de 9,0 kb. El tamaño de esta banda correspondió al del fragmento de 9,0 kb del casete de expresión, lo que sugiere una integración intacta del casete completo en el genoma.

15 La disociación del ADN con *XbaI* mostró dos bandas en fase de hibridación con unos tamaños de 1,7 y 9,0 kb en la cepa anfitriona, frente a lo cual en todos los transformantes estaban presentes tres bandas en fase de hibridación con unos tamaños de 1,7, 4,0 y 7,0 kb. Como se espera a partir del suceso de doble cruce, una integración de una copia del casete de expresión en el sitio *cbHI* conducía a tres bandas con unos tamaños de 1,7, 4,0 y 7,0 kb y a la ausencia de la banda de tipo silvestre con un tamaño de 9,0 kb. Tanto las bandas de 4,0 kb así como también las bandas de 7,0 kb reemplazaron a la banda de 9,0 kb del sitio de *cbHI* del anfitrión, y la banda de 1,7 kb estaba inalterada.

Las intensidades de las señales hibridadas entre los transformantes y ambas construcciones artificiales no se diferencian.

- 30 Los resultados del análisis por transferencia de borrar Southern, de la SDS-PAGE y de la determinación de las actividades de la fitasa se han mostrado en la precedente Tabla 2. El análisis por transferencia de borrar Southern mostró que todos los transformantes seleccionados contenían el gen de la fitasa de *E. coli*, o respectivamente el gen mutado, como una copia individual en el sitio diana *cbhl*.

35 Ejemplo 6: Caracterización bioquímica de las variantes de fitasa

Los materiales sobrenadantes del cultivo procedentes de unas cepas recombinantes fueron separados sobre un gel de SDS-PAGE NuPage BisTris al 10 % y teñidos con Coomassie (Fig. 1). Como consecuencia de la glicosilación por medio de la cepa anfitriona, la fitasa apareció como tres bandas situadas entre 44,2 y 53,2 kDa. Todas las muestras fueron aplicadas con iguales actividades de fitasa. Los geles fueron secados y explorados con el programa lógico Phoretix ID Advanced en un escáner de lecho plano de Agfa. Las áreas de superficie de las tres bandas fueron integradas y los datos están recopilados en la siguiente Tabla 3. La suma de las áreas de superficie de las tres bandas de la fitasa es igual para las cuatro cepas ensayadas dentro del marco de la exactitud de medición de este método. Este hecho pone de manifiesto que la mutación en Da2 no provoca ninguna modificación en la actividad específica de la enzima y confirma, por consiguiente, que la mutación es responsable de la secreción aumentada de la proteína fitasa.

Tabla 3: Integración de las áreas de superficie de las bandas de fitasa en el gel de SDS-PAGE mediante utilización del programa lógico Phoretix ID Advanced

Banda	PM	RH 31074	RH 31071	RH 31069	RH 31068
		(pKDa4)	(pKDa4)	(pKDa2)	(pKDa2)
1	aproximadamente 50, 52,3 kDa	56676016	52581584	42442918	41508017
2	aproximadamente 46,7, 48,8 kDa	35235004	34577257	47107624	43668804
3	aproximadamente 44,2 45,6 kDa	18121276	16714340	15716570	13439975
Suma		110032296	103873181	105267112	98616796
Proteína total/ banda [µg]		2,04	1,49	0,85	0,78

5 Ejemplo 7: Mejoramiento de la disponibilidad de fosfato por medio de la fitasa conforme al invento (mutante con Tyr²⁰⁰) en cerdos

Un ensayo de digestión se llevó a cabo con unos cerdos en dos períodos de recogida consecutivos durante 5 días después de un período de tiempo de adaptación de en cada caso 9 días. Se utilizó como testigo negativo una ración con un contenido reducido de fosfato digerible, constituida sobre la base de un material molido de extracción de maíz y de soja y se suplementó con la fitasa conforme al invento (mutante con Tyr²⁰⁰ de la fitasa de *E. coli*) en unas cantidades de 125, 250, 500 y 750 PPU/kg de pienso. La fitasa se añadió a través de una mezcla previa al pienso total. Se emplearon en total 40 cerdos machos castrados en 5 conjuntos de tratamiento. Todos los conjuntos de tratamiento se componían de 8 cerdos (4 cerdos en 2 períodos de recogida consecutivos). Los tratamientos fueron como sigue:

Testigo negativo¹ (NC)
 NC + fitasa (125 PPU kg⁻¹)
 NC + fitasa (250 PPU kg⁻¹)
 NC + fitasa (500 PPU kg⁻¹)
 NC + fitasa (750 PPU kg⁻¹)

¹Pienso: 71,5 % de harina de maíz, 28,8 % de un material molido de extracción de soja
 4,4 g kg⁻¹ de P total; 1,9 g kg⁻¹ de P que no es de fitato; 5,5 g kg⁻¹ de Ca; fitasa natural: 90 PPU kg⁻¹

Los parámetros medidos comprenden la digeribilidad de fosfato y de calcio así como la retención de fosfato y de calcio.

Retención y excreción de fosfato:

Los resultados muestran que en el caso de todas las cantidades añadidas de fitasa (125; 250; 500 y 750 PPU kg⁻¹ de pienso), la digeribilidad de fosfato había aumentado significativamente desde 42,5 % en el testigo negativo hasta 59,3, 65,3, 65,0 o respectivamente 66,3 % (p<0,05). Esto conducía a una disminución significativa de la secreción fecal de fosfato desde 203 mg kg⁻¹ 0,75 d⁻¹, medida en el conjunto testigo negativo, hasta 142, 120, 121 y 116 mg kg⁻¹ 0,75 d⁻¹ en los casos de los conjuntos de tratamiento con un pienso enriquecido en fitasa (p<0,05). Las diferencias entre los tratamientos con la fitasa eran significativas entre la dosificación más baja (125 PPU kg⁻¹ de pienso) y todas las otras administraciones (p<0,05).

Retención y excreción de calcio

La adición de la fitasa conforme al invento aumentó, en comparación con el conjunto testigo, significativamente (p<0,05) el aprovechamiento de calcio en 12,1, 14,3, 15,2 y 14,6 %. La segregación de calcio a través de la orina era relativamente alta (114 mg kg⁻¹ 0,75 d⁻¹) en el testigo negativo, lo que se había de atribuir presuntamente al bajo contenido de P en el pienso. En los conjuntos de tratamiento con fitasa, la segregación de calcio a través de la orina disminuyó a 108, 118, 95 y 88 mg kg⁻¹ 0,75 d⁻¹, lo que era significativo en comparación con el testigo negativo para la más alta cantidad administrada (750 PPU kg⁻¹, p<0,05). La retención de calcio, medida en el testigo negativo, fue mejorada significativamente (p<0,05) por todos los tratamientos con fitasa desde 181 mg kg⁻¹ 0,75 d⁻¹ hasta 240, 245, 266 y 270 mg kg⁻¹ 0,75 d⁻¹. Las diferencias entre las cantidades añadidas de fitasa eran significativas (p<0,05) entre las dosificaciones más altas (500 y 750 PPU kg⁻¹ de pienso) en comparación con las dosificaciones más bajas (125 y 250 PPU kg⁻¹).

Los resultados ponen de manifiesto que la fitasa conforme al invento tenía un buen efecto sobre la degradación del fitato en el tracto digestivo de cerdos. Ya unas bajas cantidades de la fitasa conforme al invento pueden fomentar la

digeribilidad y la retención de calcio y de fosfato en una extensión similar a la de unas cantidades añadidas más altas.

Ejemplo 8: Mejoramiento de la disponibilidad de fosfato por medio de la fitasa conforme al invento (mutante con Tyr²⁰⁰) en pollos de engorde

Se llevó a cabo un ensayo de digestión con unos pollos de engorde en 2 períodos de recogida. Se llevó a cabo un período de recogida de 4 días después de un período de tiempo de adaptación a las jaulas de asimismo 4 días. Los períodos de recogida se llevaron a cabo al final de la fase de iniciación y al final de la fase de crecimiento. Se utilizó como testigo negativo una ración con un contenido reducido de fosfato digerible constituido sobre la base de un material molido de extracción de maíz y soja, y se suplementó con la fitasa conforme al invento en unas cantidades de 125 y 250 PPU kg⁻¹ de pienso. Adicionalmente, se ensayó otro tratamiento con un contenido recomendado de fosfato sin ninguna adición de fitasa. En total, 24 pollos de engorde machos se distribuyeron en 4 conjuntos de tratamiento. Los conjuntos de tratamiento se componían de 6 pollos de engorde por cada período de tiempo de recogida. Los tratamientos fueron como sigue:

Testigo negativo¹ (NC)
 NC + fitasa (125 PPU kg⁻¹)
 NC + fitasa (250 PPU kg⁻¹)
 Testigo positivo²

¹Pienso: 53,3-56,5 % de harina de maíz; 37,9 %-34,5 % de un material molido de extracción de soja; 4,4-4,7 g kg⁻¹ de P total; 2,0 g kg⁻¹ de P que no es de fitato; 6,4-5,9 g kg⁻¹ de Ca

²Pienso: 50,4-54,3 % de harina de maíz; 35,9 %-35,0 % de un material molido de extracción de soja; 7,3-6,4 g kg⁻¹ de P total; 4,5-3,5 g kg⁻¹ de P que no es de fitato; 9,8-7,8 g kg⁻¹ de Ca

Los parámetros medidos abarcan la segregación y la retención de fosfato. Los resultados ponen de manifiesto que ambas cantidades añadidas de fitasa P (125 y 250 PPU kg⁻¹ de pienso) aumentaban la retención de fosfato y disminuían la excreción de fosfato. Las mediciones al final de la fase de iniciación mostraron un aumento significativo de la retención de fosfato desde 58,7 % en el testigo negativo hasta 64,2 y 63,9 % para los tratamientos con fitasa (p<0,05). Esto condujo a una disminución de la segregación de fosfato en los casos de unos pollos de engorde, que habían recibido la fitasa, que, en comparación con el testigo negativo, había disminuido en 11,4 y 12,7 % (tendencia). Las mediciones al final de la fase de crecimiento mostraron asimismo un aumento de la retención de fosfato desde 54,7 % en el testigo negativo hasta 58,2 y 58,9 % para los tratamientos con fitasa (tendencia). Esto conducía a una disminución de la excreción de fosfato en el caso de unos pollos de engorde, que habían recibido la fitasa, que, en comparación con el testigo negativo, había disminuido significativamente (p<0,05) en 11 % y 12,7 %.

Ejemplo 9: Ensayo de panificación: Pan de Viena

Un pan de Viena se coció a partir de 320 g de trozos de masa de panificación, obtenidos por mezcladura de 1.000 g de harina de trigo (de Pfälzer Mühlenwerke, Mannheim, tipo 550), 30 g de una levadura comprimida (de Fala GmbH, Alemania), 20 g de sal común, 50 mg de ácido ascórbico y 580 g de agua. Después de haber mezclado todas las sustancias constituyentes durante 2 minutos con una velocidad lenta y de haber mezclado durante 6 minutos con una velocidad alta (en el mezclador Diosna SP12), la masa de panificación tenía una temperatura de 27°C y se dejó reposar durante 10 minutos a la temperatura del entorno (22°C) mediando cubrimiento con un paño. Después del primer reposo de la masa de panificación, ésta se dividió en trozos de en cada caso 320 g (± 1 g de tolerancia) y se moldeó para dar una forma redonda. Después de esto, siguió un segundo reposo de la masa de panificación durante 20 minutos. Después del segundo reposo de la masa de panificación, ésta se moldeó en un dispositivo mecánico y se colocó sobre unas bandejas de fermentación cubiertas con paños. La masa de panificación se fermentó luego a 32°C bajo una humedad relativa de 85 % (con una maduración final) y se coció después de un período de tiempo de maduración de 70 minutos. La masa de panificación/el pan se coció durante 35 minutos a 235°C en un horno de múltiples carriles (de Winkler & Wachtel, Alemania) con una inyección de vapor durante 5 segundos.

Los diferentes efectos de la fitasa conforme al invento (el mutante con Tyr²⁰⁰ de la fitasa de *E. coli*) en los experimentos de cocción se compararon paralelamente con una masa testigo sin adición de la fitasa. El volumen de los panes testigos se tomó como valor de 100 %.

El volumen de las hogazas de pan se determinó mediante el procedimiento de desplazamiento de semillas de colza. La reología de la masa de panificación y las propiedades del pan fueron valoradas sensorialmente por un especialista cualificado en el uso/un panadero de ensayo y se midió el volumen promedio de las tres hogazas por cada ensayo.

Los resultados del ensayo de panificación están recopilados en la siguiente Tabla 4:

Tabla 4

Ensayo	Unidades por cada kg de harina										
	0	110	220	430	870	1.730	3.460	6.930	13.860	27.716	55.430
Masa después de empastar y amasar											
Firmeza	4	4,5	4,5	5	5	5	5	5	6	6	6
Masa después de la cocción final											
Volumen	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Estabilidad	4	4	4	5	5	5	5	5	5,5	5,5	5,5

Criterios de evaluación:

5

Criterios de evaluación	1	2	3	4	5	6	7
Masa después de empastar y amasar							
Firmeza	mucho más blanda	más blanda	algo más blanda	como la referencia	algo más firme	más firme	mucho más firme
Masa después de la cocción final							
Volumen	mucho más pequeño	más pequeño	algo más pequeño	como la referencia	algo más grande	más grande	mucho más grande
Estabilidad	muy inestable	inestable	algo inestable	como la referencia	algo más estable	más estable	mucho más estable

Explicación de los criterios de evaluación:

10

Firmeza: La rigidez de la masa de panificación es valorada por un panadero experimentado.

Volumen: Evaluación visual del volumen de una pieza de masa de panificación después de la cocción final.

15

Estabilidad: Ensayo de la capacidad de retención de gases mediante una carga por presión de la pieza de masa de panificación después de la cocción final y evaluación de la disminución del volumen que se ha establecido.

20

Los resultados precedentes muestran que la fitasa conforme al invento tenía un efecto estabilizador sobre la masa de panificación.

La fitasa conforme al invento tenía un efecto estabilizador sobre la masa de panificación.

25

Los ensayos de acuerdo con los Ejemplos 7 hasta 9 muestran que el mutante con Tyr²⁰⁰ de la fitasa de *E. coli* conforme al invento no se diferencia en su efecto con respecto del de la fitasa de tipo silvestre. El mutante con Tyr²⁰⁰ de la fitasa de *E. coli* conforme al invento se distingue, sin embargo, por la ventaja de una actividad más alta en el material sobrenadante del cultivo en la suma o respectivamente por una eficiencia de secreción más alta comparada con la del tipo silvestre.

Ejemplo 10: Construcción del plásmido pKDa41

30

El plásmido pKDa41 contiene el gen de la fitasa de *E. coli* (WT = acrónimo de Wild Type = Tipo silvestre) bajo el control del promotor de *cbhl* de *T. reesei* y del terminador de *cbhl*. La construcción es comparable con la construcción del plásmido pKDa4, con la excepción de que se habían modificado los 16 pares de bases situados corriente arriba del codón de iniciación de la fitasa, CCGCGGACTGCGCATC ATG, para dar CCGCGGACTAGGCATC ATG y se había localizado un sitio de disociación por restricción con PacI inmediatamente corriente abajo del codón de detención.

35

Para la construcción del plásmido pKDa41 el gen de la fitasa de *E. coli* (WT) a partir del plásmido pKDa4 se amplificó mediante una PCR. El producto de la PCR fue disociado con AvrII y PacI e insertado en los sitios de disociación con SpeI y PacI detrás del promotor de *cbhl* de *T. reesei* en el plásmido pAB489. El plásmido resultante tiene la denominación pKDa41 y fue cartografiado mediante unas endonucleasas de restricción, y la secuencia de la fitasa fue confirmada por secuenciación. El casete de expresión (fragmento de NotI) aislado a partir del plásmido pKDa41 contiene unos materiales genéticos idénticos a los procedentes del plásmido pKDa4. El plásmido pKDa41 se utilizó como material de partida para la producción de diversas variantes de fitasa así como en calidad de material de referencia en el caso de la investigación de la expresión de la fitasa en *T. reesei* RH3780d.

El plásmido pAB489 procede del plásmido pALK487 (véase el documento WO 94/28117) mediante inserción de otros sitios de corte (con SpeI y PacI) en el sitio de SacII entre el promotor de *cbhl* contenido en el pALK487, y el terminador de *cbhl*, así como del fragmento de *EcoRI/SpeI* con una longitud de 4,78 kb del plásmido pALK424, que se expone en el Ejemplo 2 (documento WO 93/24621), que contiene el marcador de *amdS* y las secuencias flanqueadoras en 3' de *cbhl*. La disposición de los elementos es como en el pKDa4 y permite la clonación directa de las variantes del gen en los sitios de disociación con SpeI y PacI del sitio de clonación múltiple detrás del promotor de *cbhl* de *T. reesei*.

Ejemplo 11: Construcción de los plásmidos para las variantes de fitasa

Se construyeron las siguientes variantes de fitasa:

pPhy-V200L, pPhy-V200P, pPhy-L207F

Para la producción de las variantes de fitasa se llevaron a cabo las mutaciones del gen de la fitasa mediante el método de la PCR de una manera análoga al principio, que se ha descrito en Nucleic acids Research 1989, 17(2), 723-733 y Nucleic Acids Research 1990, 18(6), 1656. La construcción así como la clonación de los plásmidos para las variantes de fitasa son idénticas a la producción del plásmido pKDa41 que se ha descrito en el Ejemplo 10. Las secuencias de las variantes de fitasa fueron confirmadas mediante secuenciación.

Ejemplo 12: Transformación de *T. reesei* RH3780d con pKDa41 o respectivamente con ciertas variantes

La transformación de *T. reesei* RH3780d con los casetes de expresión aislados a partir del plásmido pKDa41 del Ejemplo 10 y de los plásmidos para las variantes de fitasas del Ejemplo 11, se llevó a cabo de una manera análoga a la transformación con los casetes de expresión aislados a partir de los plásmidos pKDa2 y pKDa4 (Ejemplo 3). Los casetes de expresión procedentes de los plásmidos pKDa2, pKDa4, pKDa41 y los plásmidos para las variantes de fitasa se aislaron como fragmentos de NotI.

Ejemplo 13: Producción de la fitasa de *E. coli* mediante unos casetes de expresión de pKDa41 y de las variantes de fitasa en matraces de sacudimiento

Los transformantes se cultivaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 4 y la fitasa se cultivó en los materiales filtrados del cultivo para otras investigaciones ulteriores.

Tabla 5: Producción de la fitasa de *E. coli* mediante unos transformantes, que contienen los casetes de expresión procedentes o bien de pKDa41 o de las variantes de fitasa.

Cepa	SDS-PAGE	Casete de la fitasa número de copias	Fitasa PPU g ⁻¹	Casete de expresión
RH31551	CBHI ⁻	una copia	82	pKDa41
RH31549	CBHI ⁻	una copia	76	pKDa41
RH31565	CBHI ⁻	una copia	225	pPhy-V200L
RH31567	CBHI ⁻	una copia	230	pPhy-V200L
RH31570	CBHI ⁻	una copia	291	pPhy-V200P
RH31571	CBHI ⁻	una copia	295	pPhy-V200P
RH31559	CBHI ⁻	una copia	114	pPhy-L207F
RH31563	CBHI ⁻	una copia	112	pPhy-L207F
RH315780d	CBHI ⁺		0,7	

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> AB ENZYMES GMBH
 <120> POLIPÉPTIDO CON UNA ACTIVIDAD DE FITASA Y SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS QUE CODIFICA ÉSTE
 <130> 14052WO
 <140>
 10 <141>
 <160> 4
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 15 <210> 1
 <211> 1230
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: mutante con Tyr²⁰⁰ del tipo silvestre de la fitasa madura de *E. coli*
 <220>
 25 <221> CDS
 <222> (1) .. (1230)
 <400> 1

cag agc gag ccc gag ctg aag ctg gag tgc gtc atc gtc agc cgc	48
Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser Arg	
1 5 10 15	
cac ggc gtg cgt gct cct acc aag gcc acg cag ctg atg cag gac gtc	96
His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met Gln Asp Val	
20 25 30	
acc cct gac gcc tgg ccc acc tgg ccc gtc aag ctt ggc tgg ctg act	144
Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Trp Leu Thr	
35 40 45	
cct cgc ggc ggt gag ctc atc gcc tac ctc gga cac tac caa cgc cag	192
Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Gln Arg Gln	
50 55 60	
cgt ctg gtt gcc gac gga ctc ctg gct aag aag gga tgc ccg cag tct	240
Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys Lys Gly Cys Pro Gln Ser	
65 70 75 80	
ggc cag gtc gcg att atc gcc gat gtc gac gag cgt acc cgt aag acc	288
Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys Thr	
85 90 95	
ggc gaa gcc ttc gct gcc ggc ctc gct cct gac tgt gcc atc acg gtc	336
Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr Val	
100 105 110	

30

cac acc cag gca gac acg tcc agc ccc gat ccg ctg ttt aac cct ctc	384
His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro Leu	
115 120 125	
aag act ggc gtc tgc caa ctg gat aac gcc aac gtg acc gac gcc atc	432
Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala Asn Val Thr Asp Ala Ile	
130 135 140	
ctc agc agg gct gga ggt tcc atc gcc gac ttc acc ggc cat cgg cag	480
Leu Ser Arg Ala Gly Gln Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Arg Gln	
145 150 155 160	
acg gcg ttc cgc gag ctg gag cgg gtc ctt aat ttt ccc cag tcg aac	528
Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser Asn	
165 170 175	
ctg tgc ctc aag cgt gag aag cag gac gag agc tgt tcc ctg acc cag	576
Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr Gln	
180 185 190	
gca ctc ccg tcg gaa ctc aag tac agc gcc gac aac gtc tcc ctt acc	624
Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Tyr Ser Ala Asp Asn Val Ser Leu Thr	
195 200 205	
ggt gcc gtt agc ctc gct tcc atg ctg acg gag atc ttc ctc ctg cag	672
Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu Gln	
210 215 220	
caa gcg cag gga atg ccc gag cct ggg tgg ggc cgc att acc gat tct	720
Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp Ser	
225 230 235 240	
cac cag tgg aac acc ctg ctc tcg ctt cac aac gcc cag ttc tat ctg	768
His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe Tyr Leu	
245 250 255	
ctc caa cgc acg ccc gag gtt gcc cgc agc cgc gcc acc ccg ctg ctc	816
Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu Leu	
260 265 270	
gac ctc atc aag act gcg ctg acg ccc cac cct ccg cag aag cag gct	864
Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln Ala	
275 280 285	
tac ggt gtc acc ctc ccc act tcc gtc ctg ttt atc gcc ggt cac gac	912
Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His Asp	
290 295 300	
acc aac ctg gcc aat ctc ggc ggc gct ctg gag ctc aac tgg acg ctt	960
Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Asn Trp Thr Leu	
305 310 315 320	
ccc gga cag ccg gat aac act ccc cct ggc ggt gag ctg gtg ttc gaa	1008
Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe Glu	
325 330 335	

```

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

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

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

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

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

```

<210> 2

<211> 410

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<223> Descripción de la secuencia artificial: mutante con Tyr²⁰⁰ de la fitasa madura del tipo silvestre de *E. coli*

<400> 2

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 401 432 T3

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

<210> 3

<211> 54

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

ES 2 401 432 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de señal modificada de la fitasa de *A. niger* (sin el intrón)

5

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (54)

<400> 3

<400> 3

atg ggc gtc tct gct gtt cta ctt oct ttg tat ctc ctg tct gga gtc 48

Met Gly Val Ser Ala Val Leu Leu Pro Leu Tyr Leu Leu Ser Gly Val

1

5

10

15

acc tcc

54

Thr Ser

10

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de señal modificada de la fitasa de *A. niger* (sin el intrón)

15

<400> 4

Met Gly Val Ser Ala Val Leu Leu Pro Leu Tyr Leu Leu Ser Gly Val

1

5

10

15

Thr Ser

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula de ADN recombinante, que, después de su expresión en una célula anfitriona procariótica o eucariótica, codifica un polipéptido con una actividad de fitasa, conteniendo la molécula de ADN recombinante una secuencia de ADN, que se escoge entre
- 10 a) unas secuencias de ADN, que se han obtenido mediante variaciones de la secuencia de la fitasa madura de *E. coli* de tipo silvestre, teniendo las secuencias de ADN por lo menos una mutación, que se escoge entre el conjunto formado por Val 200 → Leu, Val 200 → Ile, Val 200 → Pro, Val 200 → Tyr, Leu 207 → Tyr y Leu 207 → Phe,
- 15 b) unas secuencias de ADN que, debido a la degeneración del código genético, están emparentadas con las secuencias de acuerdo con a),
- 15 realizándose que la molécula de ADN recombinante, en el caso de su expresión en una adecuada célula anfitriona, va acompañada por una actividad aumentada de la proteína codificada de esta manera en el material sobrenadante del cultivo.
- 20 2. Molécula de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque ella posee la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 25 3. Molécula de ADN recombinante de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 2, caracterizada porque ella comprende además una secuencia de señal derivada del gen de la fitasa de *Aspergillus niger* con la secuencia SEQ ID NO: 3.
- 30 4. Polipéptido, que posee una actividad de fitasa y que es codificado por una molécula de ADN recombinante de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 3 o que se obtiene mediante expresión de una célula anfitriona transformada con ésta.
- 35 5. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque él posee la secuencia SEQ ID NO: 2.
- 35 6. Construcción artificial de ADN con la capacidad para, después la introducción en una célula anfitriona adecuada, regular la expresión de un gen de fitasa mutado en un anfitrión, caracterizada porque ella contiene eventualmente un promotor, eventualmente unas secuencias de señal y de marcación, una secuencia de ADN de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 2, un terminador y eventualmente unas secuencias flanqueadoras en 5' y 3'.
- 40 7. Construcción artificial de ADN de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque en el caso del promotor se trata del promotor de la celobiohidrolasa I, de la celobiohidrolasa II, de la amilasa, de la glucoamilasa, de la xilanasa o de la enolasa.
- 45 8. Construcción artificial de ADN de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque en el caso de la secuencia de señal se trata de una secuencia de señal de fitasa eventualmente modificada procedente de *Aspergillus niger*, de manera preferida de la secuencia SEQ ID NO: 3.
- 50 9. Vector con la capacidad de transformar a una célula anfitriona, caracterizado porque él contiene una construcción artificial de acuerdo con la reivindicación 6.
- 50 10. Vector de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque él es el plásmido Da2pUC3, presentado bajo el número de presentación DSM 16396.
- 55 11. Célula anfitriona transformada, escogida entre hongos, levaduras, bacterias y células de mamíferos, que contiene una molécula de ADN recombinante de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 3, y que está dotada de la capacidad de expresar un polipéptido con una actividad de fitasa.
- 60 12. Célula anfitriona transformada de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizada porque ella pertenece al género *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Mucor* o *Penicillium*.
- 60 13. Procedimiento para la producción de una fitasa, caracterizado porque se cultiva una célula anfitriona transformada de acuerdo con la reivindicación 11 o 12 en unas condiciones, que son favorables para la formación de la fitasa, y se aísla la fitasa producida de esta manera.
14. Composición, que comprende un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, eventualmente en común con otras sustancias auxiliares y/o activas.

15. Composición de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizada porque ella es una composición de alimento o pienso.
- 5 16. Composición de acuerdo con la reivindicación 14, estando caracterizada esta composición porque es un agente de panificación.
17. Utilización de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 para la producción de un preparado destinado al mejoramiento del aprovechamiento de fosfato a partir de la nutrición en los casos de animales y seres humanos.
- 10 18. Utilización de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 para el mejoramiento de las propiedades reológicas de unas masas de panificación destinadas a la producción de productos de panificación.

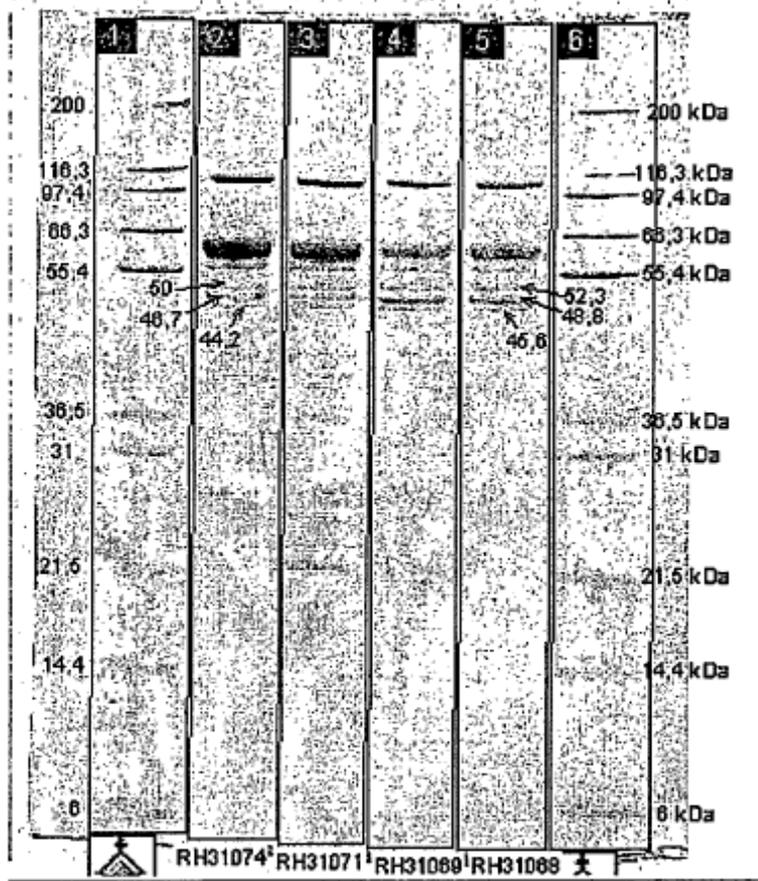


Fig. 1

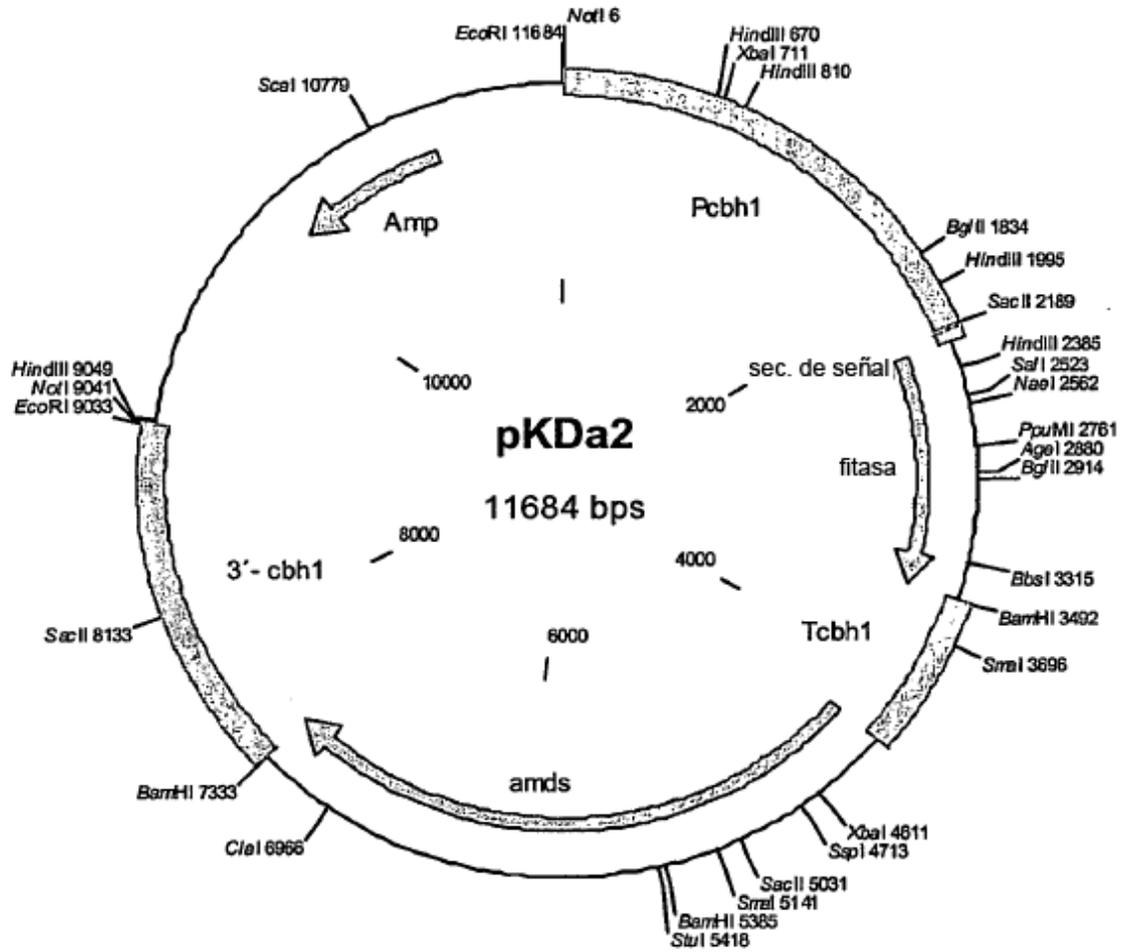


Fig. 2

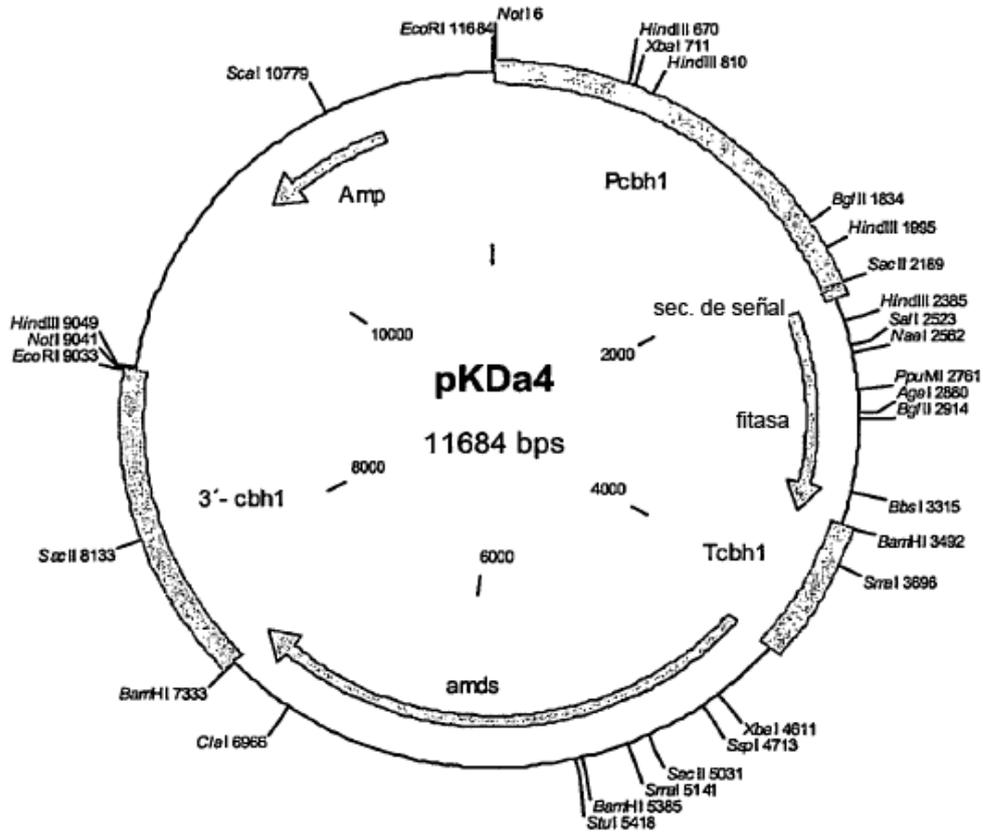


Fig. 3

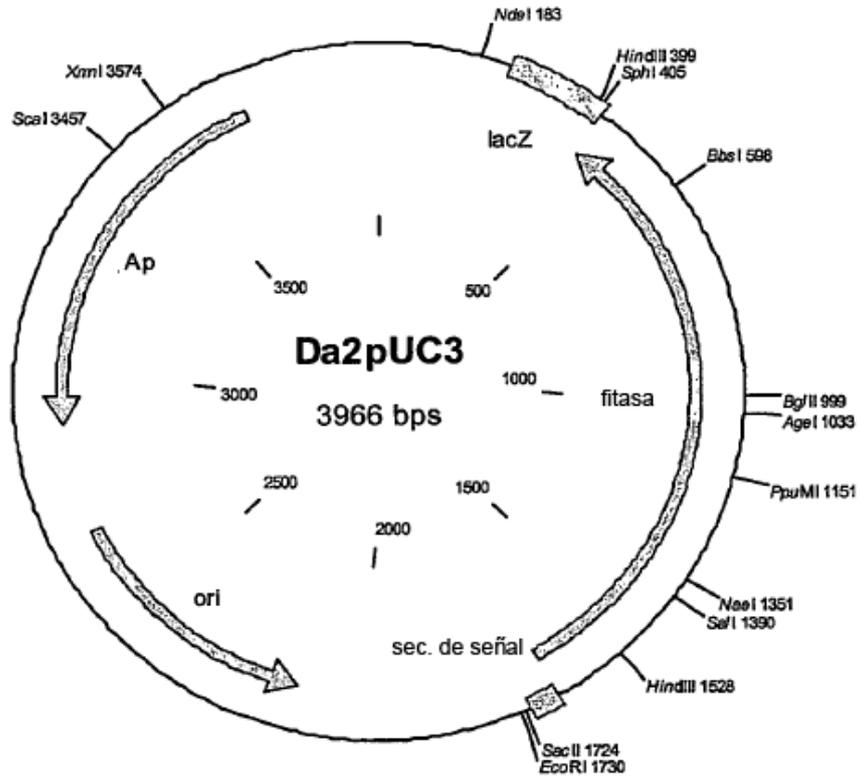


Fig. 4

```

1   cagagtgagc cggagctgaa gctggaaagt gtggtgattg tcagtcgtca
51  tgggtgtgct gtcceaacca aggccacgca actgatgcag gatgtcacc
101 cagacgcatg gccaacctgg cgggtaaac tgggttggct gacaccgagg
151 ggtggtgagc taatcgcta tctcggacat taccaacgcc agcgtctggt
201 agccgacgga ttgctggcga aaaagggctg cccgcagtct ggtcaggtcg
251 cgattattgc tgatgtcgac gagcgtaccc gtaaacagc cgaagcctc
301 gccgccgggc tggcacctga ctgtgcaata accgtacata cccaggcaga
351 tacgtccagt cccgatccgt tatttaatcc tctaaaaact ggcgtttgcc
401 aactggataa cgcgaacgtg actgacgca tcctcagcag ggcaggaggg
451 tcaattgctg actttaccgg gcatcggcaa acggcgtttc gcgaactgga
501 acgggtgctt aattttccgc aatcaaactt gtgccttaa cgtgagaaac
551 aggacgaaag ctgttcatta acgcaggcat taccatcgga actcaaggtg
601 agcgcggaca atgtctcatt aaccggtgcg gtaagcctcg catcaatgct
651 gacggagata tttctcctgc aacaagcaca gggaatgccg gagccggggg
701 ggggaaggat caccgattca caccagtgga acaccttgct aagtttgc
751 aacgcgcaat tttatttgct acaacgcacg ccagaggttg cccgcagccg
801 cgccaccccg ttattagatt tgatcaagac agcgttgacg ccccatccac
851 cgcaaaaaca ggcgtatggt gtgacattac ccacttcagt gctgtttatc
901 gccggacacg atactaatct ggcaaatctc ggcgccgac tggagctcaa
951 ctggacgctt cccggtcagc cggataacac gccgccaggg ggtgaactgg
1001 tgtttgaacg ctggcgtcgg ctaagcgata acagccagtg gattcaggtt
1051 tcgctggtct tccagacttt acagcagatg cgtgataaaa cgccgctg
1101 attaaatagc ccgccggag aggtgaaact gaccctggca ggatgtgaag
1151 agcgaatgc gcagggcatg tgttcggttg caggttttac gcaaatcgtg
1201 aatgaagcac gcataccggc gtgcagtttg

```

Fig. 5