

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 328**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/16**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2007 E 11192294 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 2428565**

54 Título: **Polipéptido con actividad de fitasa y estabilidad térmica incrementada de la actividad enzimática, así como secuencia de nucleótidos que codifica a este polipéptido**

30 Prioridad:

**10.11.2006 DE 102006053059**

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

**16.12.2013**

73 Titular/es:

**AB ENZYMES GMBH (100.0%)  
Feldbergstrasse 78  
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**NGUYEN, KHANH Q. y  
WINTER, BRUNO**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 434 328 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 actividad de fitasa y estabilidad térmica incrementada de la actividad enzimática, así como secuencia de nucleótidos que codifica a este polipéptido

5 La invención se refiere a una molécula de ADN recombinante que codifica un polipéptido con actividad de fitasa y estabilidad térmica incrementada y estabilidad proteolítica incrementada de la actividad enzimática, así como al polipéptido codificado como tal. En particular, la invención se refiere a una molécula de ADN recombinante que codifica un polipéptido con actividad de fitasa y estabilidad térmica incrementada y estabilidad proteolítica incrementada de la actividad enzimática, habiendo sido obtenida la secuencia de ADN mediante una variación de la fitasa de *E. coli* de tipo salvaje madura, en donde posiciones de aminoácidos definidas están modificadas en comparación con la secuencia de tipo salvaje o bien están presentes extensiones N- y/o C-terminales. La invención se refiere, además, a un procedimiento para la expresión de la fitasa recombinante, así como a su uso en la tecnología alimentaria y de alimentos para animales.

15 Ácido fítico o mioinositol-1,2,3,4,5,6-hexaquisdihidrogenofosfato (abreviado mioinositol-hexaquisfosfato) es la fuente principal de inositol y la forma de almacenamiento primaria de fosfato en semillas de vegetales. En las semillas de leguminosas, aproximadamente el 70% del contenido en fosfato se presenta en forma de una sal de potasio, magnesio y calcio mixta del ácido fítico. Semillas, granos de cereales y leguminosas son componentes importantes de preparados alimentarios y de alimentos para animales, en particular de preparados de piensos para animales; pero también en la alimentación humana los cereales y las leguminosas adquieren importancia de forma creciente.

25 Las unidades fosfato del ácido fítico ligan en forma de complejo cationes divalentes y trivalentes tales como iones de metales, es decir, iones importantes para la fisiología nutricional tales como calcio, hierro, zinc y magnesio, así como los oligoelementos manganeso, cobre y molibdeno. Junto a ello, en cierta medida, el ácido fítico liga también proteínas mediante interacción electrostática.

30 El ácido fítico y sus sales, los fitatos, no son a menudo metabolizados, dado que no son absorbidos por el tracto gastrointestinal, es decir, ni el fósforo contenido en ellos ni los iones de metales quelados ni las proteínas fijadas están disponibles desde un punto de vista fisiológico nutricional.

35 Dado que el fósforo es un elemento esencial para el desarrollo de todos los organismos, los alimentos y alimentos para animales deben ser suplementados con fosfato inorgánico. Muy a menudo, también deben ser suplementados los iones esenciales para la fisiología nutricional tales como hierro y calcio. Además, el valor fisiológico nutricional de cada dieta disminuye, dado que las proteínas son fijadas por parte del ácido fítico. Como consecuencia, el ácido fítico se designa a menudo como factor anti-nutricional.

40 Además, en virtud de un metabolismo carente del ácido fítico, el fósforo del fitato es segregado a través del tracto gastrointestinal de los animales, lo cual conduce a una contaminación indeseada con fosfatos del medio ambiente, como consecuencia de la cual se puede producir, por ejemplo, la eutrofización de las aguas y un desarrollo excesivo de algas.

45 Ácido fítico o fitatos (estas expresiones se utilizan en lo que sigue de manera sinónima, a no ser que se indique de otro modo) pueden ser degradados por parte de fitasas. Las fitasas catalizan la hidrólisis de fitato en mio-inositol y/o mono-, di-, tri-, tetra- y/o penta-fosfatos así como fosfato inorgánico. Se diferencian dos tipos distintos de fitasas microbianas: 1) 3-fitasa/mio-inositolhexafosfato-3-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.8; 2) 6-fitasa/mio-inositolhexafosfato-6-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.26. La 3-fitasa hidroliza preferiblemente primero el enlace éster en la posición 3, la 6-fitasa hidroliza preferiblemente primero el enlace éster en la posición 6. Semillas de vegetales con contenido en ácido fítico contienen enzimas fitasa endógenas. En su absorción, los fitatos en alimentos o bien alimentos para animales pueden ser hidrolizados teóricamente por parte de las fitasas de vegetales endógenas, por parte de fitasas de la flora intestinal y por parte de fitasas de la mucosa intestinal. En la práctica, sin embargo, el potencial de hidrólisis de las fitasas vegetales endógenas y de las fitasas que se presentan en el intestino, en la medida en que estén presentes, no son con mucho suficientes como para garantizar de manera significativa la biodisponibilidad del fósforo ligado en los fitatos. Por lo tanto, a los alimentos o a alimentos para animales se les añade a menudo fitasas exógenas.

60 Las fitasas pueden ser producidas por plantas así como por microorganismos. Entre los microorganismos se conocen bacterias productoras de fitasa, así como hongos y levaduras productores de fitasa.

Los productores de fitasa que se presentan de forma natural tienen, sin embargo, el inconveniente de que la fitasa sólo puede ser formada en determinadas cantidades y con propiedades definidas. Tal como se expone precedentemente, existe, sin embargo, una demanda incrementada de fitasa, en particular para la industria alimentaria y de alimentos para animales.

5 A pesar de en que la industria alimentaria y de alimentos para animales existe una demanda incrementada de fitasa y el uso de fitasa puede ser ventajoso, sólo unas pocas de las fitasas conocidas han encontrado una amplia aceptación en la industria alimentaria y de alimentos para animales. Consideraciones típicas se refieren a los costes de preparación relativamente elevados y/o a la mala estabilidad o bien actividad de la enzima en el entorno de aplicación deseado. Además de ello, una enzima de este tipo debe cumplir una serie de criterios con el fin de poder ser empleada en la industria. Éstos comprenden una elevada actividad total específica, un óptimo de pH bajo, resistencia frente a proteasas gastrointestinales, así como estabilidad térmica o bien termoestabilidad. La estabilidad térmica es una premisa importante para una aplicación industrial exitosa, dado que, por ejemplo en procesos de granulación, las enzimas son expuestas a temperaturas entre 60°C y 95°C.

15 Todas las fitasas microbianas conocidas se despliegan a temperaturas entre 56°C y 78°C (Lehman et al., 2000), con lo cual pierden su actividad. Por lo tanto, existe en particular una demanda de fitasas que, también a temperaturas elevadas, posean una actividad tecnológicamente suficiente o bien no sean inactivadas.

20 Por consiguiente, la presente invención se basa en el cometido de habilitar un polipéptido con actividad de fitasa que presente una termoestabilidad incrementada o bien que posea una actividad tecnológicamente suficiente a temperaturas elevadas. Además, el polipéptido con actividad de fitasa debe poseer también una estabilidad proteolítica incrementada.

25 El polipéptido ha de poder ser producido de forma rentable. En particular, la fitasa debe ser más termoestable que la enzima de tipo salvaje. Además, la fitasa debe conservar las propiedades esenciales de la fitasa de tipo salvaje de *E. coli* natural, pero debe distinguirse por una termoestabilidad mejorada. A las propiedades esenciales de la fitasa de tipo salvaje natural pertenecen, en particular, la capacidad de mejorar la disponibilidad de fosfato in-vivo e in-vitro mediante su actividad como fitasa, al igual que como fosfatasa, su óptimo del pH en el intervalo ácido con una actividad residual en el intervalo fuertemente ácido, así como su idoneidad como coadyuvante de panificación.

30 La presente invención se basa, además, en la misión de poner a disposición un gen para un polipéptido con actividad de fitasa con termoestabilidad incrementada así como estabilidad proteolítica incrementada. El polipéptido ha de poder ser producido de forma rentable y económica. En particular, la expresión del polipéptido en microorganismos eucarióticos ha de conducir a un polipéptido con termoestabilidad incrementada en comparación con la fitasa de tipo salvaje producida de manera similar. Se han de proporcionar, además, las secuencias de ADN codificadoras del polipéptido, construcciones de ADN y vectores correspondientes, así como una fuente para la enzima recombinante que sea adecuada para el uso comercial para alimentos y alimentos para animales y en procesos industriales, y composiciones que contengan a la enzima de acuerdo con la invención.

35 Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que mutaciones en determinadas posiciones de la secuencia de fitasa de tipo salvaje de *E. coli* conducen a un aumento intrínseco de la termoestabilidad o bien estabilidad térmica, así como a un aumento de la estabilidad proteolítica de la proteína fitasa, sin afectar de manera desventajosa a los demás efectos y propiedades esenciales de la fitasa de *E. coli* de tipo salvaje.

40 Sorprendentemente, se encontró que una mutación en la posición 74 (K74D) de la secuencia de aminoácidos, y/o una combinación de mutaciones en las posiciones 139 (N139R) y 142 (D142E), y/o una combinación de mutaciones en las posiciones 145 (L145I) y 198 (L198I) y/o una mutación en la posición 200 (V200P) de la fitasa de tipo salvaje de *E. coli* así como combinaciones de estas mutaciones conducen a una termoestabilidad mejorada de la proteína fitasa sin perjudicar a los efectos favorables ni a las propiedades esenciales de la fitasa de tipo salvaje de *E. coli*. Además, se encontró que la complementación de la fitasa de *E. coli* mediante secuencias de la fosfatasa ácida procedente de *Aspergillus niger* var. *awamori* en el extremo N-terminal o C-terminal o bien en los extremos N- y C-terminales, también en unión con las mutaciones antes mencionadas, conduce a una mejora de la termoestabilidad y de la estabilidad proteolítica de la enzima.

45 Por consiguiente, la invención se refiere a una molécula de ADN recombinante que, después de la expresión en una célula hospedadora procariótica o eucariótica, codifica un polipéptido con actividad de fitasa, comprendiendo la molécula de ADN recombinante una secuencia de ADN elegida de

50 a) secuencias de ADN que codifican un polipéptido con actividad de fitasa que ha sido obtenido mediante variación de la secuencia de fitasa de tipo salvaje madura de *E. coli*, comprendiendo la variación

la mutación lisina → ácido aspártico en la posición 74 (K74D) y, eventualmente, una combinación de las mutaciones leucina → isoleucina en la posición 145 (L145I) y leucina → isoleucina en la posición 198 (L198I), y/o

una mutación valina → prolina en la posición 200 (V200P),

5 adición de un segmento de la secuencia de la fosfatasa ácida de *Aspergillus niger* var. *awamori*, o de la fitasa de *Aspergillus niger* y

b) secuencias de ADN que, en virtud de la degeneración del código genético, están emparentadas con las secuencias conforme a a) y b),

10 en donde la molécula de ADN recombinante, en el caso de una expresión en una célula hospedadora adecuada, va acompañada de una estabilidad térmica y frente a proteasas incrementada de la actividad enzimática de la proteína así codificada.

En la bibliografía se describen varias fitasas de *E. coli*, p. ej. el gen *appA* que codifica una fitasa de *E. coli* K-12 (Dassa et al., J. Bacteriol. 172: 5497-5500 (1990)). Este gen codifica una enzima periplasmática que presenta tanto actividad de fosfatasa ácida como actividad de fitasa (véase Greiner et al., Arch. Biochim. Biophys. 303: 107-113 (1993)). Se conocen mutantes naturales de esta enzima (véase, p. ej., Rodríguez et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 257: 117-123 (1999)). Asimismo, se describieron mutantes genéticamente modificados de la fitasa de *E. coli* que conducían a una estabilidad térmica incrementada y/o a una actividad específica más elevada. Rodríguez et al. (Arch. Biochem. Biophys. 382: 105-112 (2000)) expresaron AppA de tipo salvaje y varios mutantes generados mediante mutagénesis específica del lugar en *Pichia pastoris*, con el fin de examinar el efecto de la N-glicosilación sobre la estabilidad térmica de la proteína AppA. A pesar de que la glicosilación no fue reforzada, un mutante era más activo a pH 3,5 hasta 5,5 y, después de tratamiento térmico, presentaba una mayor actividad que la proteína de tipo salvaje producida en *P. pastoris*,

15 La familia de patentes basada en el documento WO 03/057248 contiene las solicitudes de patente US 2003/0170293 A1 y US 2003/0157646 A1. En ellas se describe la preparación microbiana de una fitasa termotolerante para piensos. La mutante (Nov9X) de la cepa de B fitasa (*appA*) de *E. coli* se lleva a expresión en *E. coli*, *Pichia pastoris* y *Schizosaccharomyces pombe*. El mutante Nov9X contiene 8 mutaciones de aminoácidos con respecto a la enzima de tipo salvaje. El mutante tiene en líquido a 70°C, con respecto a la enzima de tipo salvaje, una termoestabilidad mejorada. El hospedador en el que se produce la enzima tiene también influencia sobre su termoestabilidad tal como lo implica el mismo grupo de trabajo en la solicitud de patente de EE.UU. US 2003/0157646 A1. El modo de recuento de las posiciones de aminoácidos es en el caso de NOV9X 2 posiciones mayor que en la presente invención (W48 NOV9X corresponde a W46 en la presente invención).

25 En las solicitudes de patente WO 02/095003 y WO 2004/015084 se describe una serie de mutaciones puntuales de la fitasa de *E. coli*, pero que ninguna de ellas conducía a un aumento de la termoestabilidad. La numeración en el documento WO 2004/015084 es mayor en 30 posiciones de aminoácidos en comparación con la presente invención.

35 También la memoria de publicación DE 10 2004 050 410 describe mutantes de fitasa de *E. coli*, pero con la finalidad de aumentar la eficacia de secreción en la producción de hongos filamentosos. En la mencionada memoria impresa no existen declaraciones respecto al aumento de la termoestabilidad de los mutantes.

45 Además, la memoria impresa de Garrett et al.; Applied Environ, Microbiol., 2004, 70 (5), 3041-3046, describe mutantes de la fitasa de *E. coli* con una estabilidad térmica y gastrointestinal incrementada.

Prácticamente no es posible predecir el efecto de una o bien de varias mutaciones sobre el comportamiento de la actividad enzimática bajo condiciones de temperatura elevada. En general, a temperaturas elevadas tiene lugar una desnaturalización o bien despliegue de las estructuras secundaria y terciaria de la proteína.

50 La estabilidad térmica o bien termoestabilidad de proteínas depende de una pluralidad de interacciones. La conformación de proteínas es mantenida por un gran número de interacciones débiles. La estabilización puede comprender todos los planos jerárquicos de la estructura de la proteína: empaquetamiento local de la cadena polipeptídica, elementos estructurales secundarios y super-secundarios, dominios y sub-unidades de una proteína multímera. Existen numerosos motivos que informan en relación con la estabilidad térmica incrementada de una proteína, siendo los más frecuentes (a) el almacenamiento conjunto de pares de iones dentro y/o entre las sub-unidades; (b) empaquetamiento mejorado del núcleo hidrófobo (interacciones de

55 van-der-Waals); (c) redes adicionales a base de puentes de hidrógeno; (d) tendencia reforzada a la formación de estructuras secundarias; (e) estabilización dipolar incrementada dentro de la hélice; (f) una superficie polar aumentada; (g) un número reducido y un volumen total reducido de cavidades; (h) la reducción de la tensión conformacional (estabilización de bucle) e (i) resistencia frente a la modificación química (oxidación de restos

60

metionina y/o desaminación de restos asparagina y glutamina).

En el estado de la técnica, no se conocen indicios sobre cómo y de qué modo se ha de modificar de manera preestablecida la secuencia de fitasa de tipo salvaje de *E. coli* con el fin de alcanzar un aumento de la termostabilidad. El estado conocido de la técnica no contiene, además, indicios sobre las mutaciones precedentemente mencionadas en la secuencia de fitasa de *E. coli*.

El estado conocido de la técnica no contiene, en particular, indicios en el sentido de que una mutación en la posición 74 (K74D) de la secuencia de aminoácidos o una combinación de mutaciones en las posiciones 139 (N139R) y 142 (D142E) o una combinación de mutaciones en las posiciones 145 (L145I) y 198 (L198I) o una mutación en la posición 200 (V200P) de la fitasa de tipo salvaje de *E. coli* o combinaciones de estas mutaciones conduzca a una termostabilidad mejorada de la proteína fitasa sin perjudicar a los efectos favorables y las propiedades esenciales de la fitasa de *E. coli* de tipo salvaje. Además, el estado conocido de la técnica no contiene indicios de que la complementación de la secuencia de la fitasa de *E. coli* por parte de secuencias de la fosfatasa ácida de *Aspergillus niger* var. *awamori* en el extremo N-terminal o C-terminal o bien en los extremos N- y C-terminales, tampoco en unión con las mutaciones antes mencionadas, conduzca a una mejora de la termostabilidad de la enzima.

Moléculas de ADN recombinante preferidas de acuerdo con la invención con las variaciones de acuerdo con la invención de la secuencia de la fitasa de tipo salvaje madura de *E. coli* son las construcciones PhyM7 y PhyM10. Éstas y otras construcciones están representadas en la siguiente Tabla 1. La construcción PhyM1 se tomó como producto comparativo.

Tabla 1: Genotipos de las mutaciones PhyM1, PhyM2, PhyM3, PhyM7, PhyM9 y PhyM10

Genotipo	Posición de AA	Secuencia de tipo salvaje	Mutaciones
<i>PhyM1</i>	200	E-L-K Val <sup>200</sup> S-A-D	E-L-K Tyr <sup>200</sup> S-A-D
<i>PhyM2</i>	139	D-N-A-Asn <sup>139</sup> -V-T-D <sup>142</sup> -A	D-N-A-Arg <sup>139</sup> -V-T-E <sup>142</sup> -A
	142	D-N-A-N <sup>139</sup> -V-T-Asp <sup>142</sup> -A	D-N-A-R <sup>139</sup> -V-T-Glu <sup>142</sup> -A
<i>PhyM3</i>	200	E-L-K Val <sup>200</sup> S-A-D	E-L-K Pro <sup>200</sup> S-A-D
<i>PhyM7</i>	74	L-L-A-Lys <sup>74</sup> -K-G	L-L-A-Asp <sup>74</sup> -K-G
<i>PhyM9</i>	145	D-A-I Leu <sup>145</sup> S-R-A	D-A-I Ile <sup>145</sup> S-R-A
	198	P-S-E Leu <sup>198</sup> K-V-S	P-S-E Ile <sup>198</sup> K-V-S
<i>PhyM10</i>	74	L-L-A-Lys <sup>74</sup> -K-G	L-L-A-Asp <sup>74</sup> -K-G
	139	N-A-Asn <sup>139</sup> -V-T-D <sup>142</sup> -A	D-N-A-Arg <sup>139</sup> -V-T-E <sup>142</sup> -A
	142	N-A-N <sup>139</sup> -V-T-Asp <sup>142</sup> -A	D-N-A-R <sup>139</sup> -V-T-Glu <sup>142</sup> -A
	200	E-L-K Val <sup>200</sup> S-A-D	E-L-K Pro <sup>200</sup> S-A-D

Los siguientes plásmidos han sido depositados el 18.10.2006 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig de acuerdo con las condiciones del Tratado de Budapest.

Plásmido	Número de depósito
pET-PhyM2	DSM 18715
pUC-PhyM3	DSM 18717
pET-PhyM7	DSM 18716
pUC-PhyM9	DSM 18718
pUC-PhyM10	DSM 18719
pPhy2005	DSM 18720
pPhy2006	DSM 18721

Era sorprendente que mutaciones que afectan a la superficie hidrófoba de la proteína (PhyM3, PhyM7 y PhyM9), así como mutaciones que incorporan un enlace iónico en la hélice D (PhyM2) o bien estabilizan el bucle B4 a través de un puente iónico (PhyM7) cooperen de manera significativa en el aumento de la termostabilidad de la fitasa de *E. coli*.

También la adición de partes de secuencias de la fosfatasa ácida de *Aspergillus niger* var. *awamori*, que en el caso de la fosfatasa ácida conducen a una formación de dímeros y tetrámeros, tenía efectos estabilizantes en el caso de la fitasa de *E. coli*. Lo correspondiente se cumple para la adición de partes de secuencia de la fitasa de *Aspergillus*

*niger*.

Los polipéptidos de acuerdo con la invención con actividad de fitasa muestran, en comparación con la enzima de tipo salvaje de *E. coli*, una temperatura o bien termoestabilidad incrementada de su actividad enzimática. Esta mejora de la termoestabilidad puede medirse en líquidos mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC – siglas en inglés). En particular, la mejora de la termoestabilidad se manifiesta en la actividad residual fuertemente incrementada de los mutantes enzimáticos frente a la enzima de tipo salvaje cuando son expuestos a la carga térmica tal como se utiliza en la granulación de piensos. Además, los polipéptidos de acuerdo con la invención poseen también una estabilidad incrementada frente a la degradación proteolítica tal como se manifiesta especialmente en el estómago de aves de corral y animales monogástricos. Dado que la fitasa en el caso de la alimentación animal debe liberar especialmente durante el paso por el estómago el fosfato a partir de ácido fítico y sus productos de degradación, esta estabilidad es de interés particular con el fin de mantener lo más baja posible la dosificación de la enzima. En virtud de la estabilidad térmica y/o proteolítica incrementada, las fitasas de acuerdo con la invención se adecúan especialmente para aplicaciones en las que se manifiestan condiciones de temperatura elevada o bien en las que se ha de contar con una degradación proteolítica incrementada. Ejemplos de aplicación para ello son la preparación de la enzima en la que ésta debe ser protegida frente a proteasas de la cepa hospedadora, la preparación de pienso en forma de gránulos, pero también la aplicación como enzima líquida en la aplicación post-granulación sobre el pienso granulado. Una estabilidad térmica incrementada permite la aplicación temprana sobre los gránulos todavía no enfriados demasiado, con lo que se acorta el tiempo de evaporación del líquido aplicado. Esto conlleva también ventajas desde un punto de vista microbiológico, dado que entonces el elevado contenido en agua sólo se presenta brevemente a altas temperaturas a las que no pueden desarrollarse la mayoría de los gérmenes patógenos.

La secuencia de ADN de acuerdo con la invención que codifica una fitasa comprende la mutación lisina → ácido aspártico en la posición 74 (K74D) y eventualmente una combinación de las mutaciones leucina → isoleucina en la posición 145 (L145I) y leucina → isoleucina en la posición 198 (L198I) y/o una mutación valina → prolina en la posición 200 (V200P).

Una posibilidad de combinación preferida la representa la combinación que se designa en lo que sigue como genotipo PhyM10.

Además, adicionalmente a las mutaciones descritas puede estar adicionalmente presente una adición N-terminal o C-terminal o una adición N- y C-terminal de un segmento de la secuencia de la fosfatasa ácida de *Aspergillus niger* var. *awamori*. También, la sola presencia de estos segmentos de secuencia conduce ya a un aumento de la termoestabilidad. En el caso del segmento N-terminal de la fosfatasa ácida de *A. niger* var. *awamori* se trata de los primeros 51 aminoácidos de la proteína madura (FSYGAAIPQS TQEKQFSQEF RDGYSILKHY GGNGPYSERV SYGIARDPPTS). Los 4 últimos aminoácidos de este polipéptido reemplazan en este caso a los primeros 4 aminoácidos (QSEP) de la fitasa madura de *E. coli*. También es posible la adición de partes de este segmento de la fosfatasa ácida. Alternativamente, también puede utilizarse la parte o partes N-terminales de la misma de los primeros 40 aminoácidos de la proteína madura de la fitasa de *Aspergillus niger* (SCDVTVDQGYQ CFSETSHLWG QYAPFFSLAN ESVISPEVPA). La adición a la fitasa de *E. coli* puede tener lugar también en otros lugares distintos a la posición 4 descrita, siempre que se conserve la actividad de la enzima. Para la prolongación C-terminal, los últimos 29 aminoácidos (LSFWWNYNTT TELNYRSSPI ACQEGDAMD) de la fosfatasa ácida de *A. niger* var. *awamori* se fusionaron directamente al extremo C-terminal de la fitasa de *E. coli*. Esta fusión o bien fusiones pueden ir también acompañadas de otras mutaciones en la fitasa de *E. coli* y no se limitan a las mutaciones adicionales recogidas en esta solicitud. Mediante la mutación Lys43Cys sería posible una formación de puentes disulfuro entre la nueva parte C-terminal y el núcleo de la fitasa de *E. coli* y, con ello, una dimerización mejorada. Son posibles otras mutaciones que favorezcan o estabilicen los puentes intermoleculares de van der Waals, hidrófobos o iónicos y, con ello, aumenten la termoestabilidad o puedan continuar mejorándola. Ejemplos de prolongaciones de la secuencia N- o bien C-terminales son las formas de realización Phy2005 y Phy2006 descritas más adelante.

La termoestabilidad de la fitasa de acuerdo con la invención puede continuar aumentándose en productos comerciales, p. ej. mediante la adición de sustancias al concentrado de ultrafiltración antes del secado o la granulación. Por ejemplo, puede prepararse una formulación estable de la enzima fitasa de acuerdo con la invención debido a que se pulveriza una mezcla a base de una disolución enzimática líquida sobre un agente de relleno tal como maltodextrina y luego la mezcla se seca, o a la disolución enzimática líquida se añade, antes del secado, leche desnatada en polvo al 20%-60% (p/p referido a la proteína total de la disolución enzimática) y/o propionato de calcio al 1%-5% (p/p referido a la proteína total de la disolución enzimática) y el valor del pH se

ajusta a valor definido, en particular a pH  $5,2 \pm 0,5$ . La disminución de la humedad y las interacciones de unión de la fitasa con el agente de relleno protegen a la enzima, adicionalmente a su estabilidad definida en su estructura, frente a influencias del entorno tales como valores extremos de temperatura que pueden manifestarse durante la preparación del alimento para animales. Formulaciones secas y líquidas pueden estabilizarse ulteriormente si se reduce la actividad de enzimas proteolíticas potenciales que puedan estar presentes como productos secundarios en la mezcla de fermentación líquida que se utiliza para la preparación de la enzima de acuerdo con la invención.

La secuencia de ADN correspondiente a la secuencia de fitasa mutada de acuerdo con la invención puede realizarse utilizando usos de codones arbitrarios. Así, por ejemplo, puede utilizarse el uso de codón del microorganismo utilizado para la expresión, pero también puede utilizarse el uso de codón de *E. coli* o bien una variante del mismo. Además, la secuencia de fitasa de *E. coli* mutada de acuerdo con la invención puede contener otras variaciones en la secuencia. En este caso, pueden efectuarse variaciones arbitrarias adicionalmente a las mutaciones precedentemente descritas, siempre que no se perjudique de forma desventajosa a la propiedad de la estabilidad incrementada frente a la temperatura y siempre que se conserve la actividad enzimática y otras propiedades esenciales de la fitasa de tipo salvaje de *E. coli*.

Variaciones correspondientes son bien conocidas por un experto en la materia en el sector de la técnica de ADN recombinante y comprenden las mutaciones precedentes así como las variaciones expuestas más adelante a modo de ejemplo.

De acuerdo con la invención, pueden utilizarse moléculas de adición y/o deleción del polipéptido modificado de acuerdo con la invención. Así, el polipéptido modificado de acuerdo con la invención con actividad de fitasa puede prolongarse mediante adición de otras secuencias en el extremo N-terminal y/o C-terminal. Con ello, pueden crearse moléculas híbridas que poseen otras propiedades ventajosas. Por ejemplo, pueden añadirse proteínas de fusión o bien proteínas secretadas de forma nativa en gran medida, con lo que se mejora la eficacia de la secreción. Preferiblemente, para ello se utiliza una parte de la proteína CBH2 de *Trichoderma reesei* de los aminoácidos Met 1 a Ser 86.

De acuerdo con la invención, también pueden suprimirse segmentos de secuencias del polipéptido con actividad de fitasa, siempre que no se perjudique la propiedad de la estabilidad incrementada frente a la temperatura manteniendo la actividad de fitasa.

Las mutaciones, elongaciones y acortamientos pueden llevarse a cabo de manera en sí conocida según procedimientos bien conocidos en el sector especializado.

Las variaciones del polipéptido con actividad de fitasa, consideradas precedentemente, corresponden a mutaciones o bien modificaciones correspondientes de la molécula de ADN respectiva.

También se describen secuencias que se hibridan bajo condiciones relajantes o rigurosas con las secuencias de acuerdo con la invención. Como condiciones rigurosas se consideran: hibridación a 65°C, 18 h en disolución de sulfato de dextrano (GenescreenPlus, DuPont), después lavado de los filtros en cada caso durante 30 min, primero con 6 x SSC, dos veces con 2 x SSC, dos veces con 2 x SSC con SDS al 0,1% y, a continuación, con 0,2 x SSC a 65°C (métodos de transferencia y detección de membrana, Amersham).

También se describen secuencias que con la secuencia de nucleótidos reivindicada o bien las partes reivindicadas de la misma, presentan una homología de al menos el 70%, preferiblemente de al menos el 80%, todavía más preferiblemente de al menos el 90% y, en particular, de al menos el 95%, siempre que las secuencias respectivas conduzcan al aumento de la estabilidad de la temperatura del polipéptido con actividad de fitasa codificado por las mismas. Preferiblemente, la homología asciende a 70 hasta 100 por ciento. En este caso, la homología se define como el grado de identidad. El grado de identidad se determina preferiblemente en este caso de manera que se determina el número de los restos de la secuencia más corta que participan en la comparación y que poseen en la otra secuencia un trozo antagonista "correspondiente". La homología se determina en este caso preferiblemente de manera habitual utilizando los algoritmos habituales. Para comparación se recurre sólo a los ADNcs de las respectivas proteínas maduras. Como secuencias homólogas se determinan trozos opuestos de secuencia similares, preferiblemente idénticos, con ayuda de programas de ordenador conocidos. 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 comercializado por Scientific & Educational Software, Durham, NC, EE.UU. En este caso, se lleva a cabo una comparación de dos secuencias de ADN definidas como antecede, bajo la opción "alineación local", ya sea según el método FastScan – MaxScore, o según el método Needleman – Wunsch conservando los valores por defecto. Especialmente, de acuerdo con la invención, para el cálculo de la homología se utilizó la versión de programa

5 “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, Commun Assoc Comput Mach 18: 341-343; Myers, E.W. y W. Miller. (1988) Optimal alignments in linear space, CABIOS 4: 1, 11-17; Chao, K-M, W.R. Pearson y W. Miller. (1992) Aligning two sequences within a specified diagonal band, CABIOS 8:5, 481-487.

10 La invención se refiere, además, también a secuencias de ADN que, en virtud de la degeneración del código genético, están emparentadas con las secuencias de acuerdo con la invención. La degeneración del código genético puede resultar en este caso en virtud de una degeneración natural o en virtud de un uso de codones elegidos especialmente. Variantes alélicas que se presentan de forma natural pueden identificarse utilizando técnicas bien conocidas de la biología molecular tales como, p. ej. la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación.

15 Puede utilizarse una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención con el fin de transformar células hospedadoras arbitrarias tales como, por ejemplo, células de hongos, levaduras, bacterias, vegetales o mamíferos. Células transformadas de este modo se distinguen por una producción y eventual secreción de fitasa con termoestabilidad incrementada. La enzima fitasa con termoestabilidad incrementada, así producida, conduce también a una liberación eficaz de fosfato a partir de fitatos.

20 Las expresiones proteína, péptido y polipéptido deben utilizarse de manera indistinta. Un polipéptido o enzima con actividad de fitasa o una fitasa debe designar a toda enzima que pueda determinar la liberación de fosfato inorgánico a partir de diferentes mioinositol-fosfatos. Ejemplos de sustratos de mioinositol-fosfato (fitasa) de este tipo son el ácido fítico y sales arbitrarias del mismo, por ejemplo fitato sódico o fitato potásico, o sales mixtas. También pueden servir como sustrato de fitasa isómeros de posición arbitrarios de los di-, tri-, tetra- o penta-fosfatos de mioinositol. La actividad de fitasa puede determinarse utilizando cualquier ensayo arbitrario en el que se utilice uno de estos sustratos. Una variante de fitasa comprende variantes de polipéptidos que se derivan de una fitasa especial por delección o adición de uno o varios aminoácidos en el extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína nativa, delección o adición de uno o varios aminoácidos en uno o varios lugares en la proteína nativa o sustitución de uno o varios aminoácidos en uno o varios lugares en la fitasa. La creación de variantes de este tipo es generalmente conocida en el sector técnico. Por ejemplo, variantes de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos pueden prepararse mediante mutación en el ADN. Procedimientos para la mutagénesis y modificación de la secuencia de nucleótidos son bien conocidos en el sector técnico (véase, por ejemplo, Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 488 (1985), Kunkel et al., Methods in Enzymol., 154:367 (1987), nº de patente de EE.UU. 4.873.192, Walker y Gaastra, comps., Techniques in Molecular Biology, Mac Millan Publishing Company, Nueva York (1983)). Indicios sobre sustituciones de aminoácidos adecuadas que no perjudican a la actividad biológica de la proteína de interés, se encuentran en modelo de Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, Natl. Biomed. Res. Found. Washington, D.C. (1978). Se prefieren sustituciones conservativas tales como el intercambio de un aminoácido por otro con propiedades similares.

40 Aminoácidos de este tipo, intercambiables dentro de un grupo, se recogen a modo de ejemplo en la siguiente Tabla sin que se limiten a ellos.

Alifático	No polar	GAP
		ILV
	Polar y descargado	CSTMNQ
		DE
Polar y cargado	KR	
	Aromático	HFWY

45 La invención se refiere también a composiciones de ácidos nucleicos o proteínas aisladas o esencialmente purificadas. En este caso, un polinucleótido/polipéptido o bien segmento del mismo aislado y purificado designa a un polinucleótido o bien polipéptido o bien segmento del mismo que se presenta aislado de su entorno nativo. Un segmento de ácido polinucleico o polipéptido aislado puede presentarse en forma purificada o puede presentarse en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, en una célula hospedadora transgénica. Por ejemplo, un segmento de polinucleótido o proteína aislado o purificado o una parte biológicamente activa del mismo está esencialmente exento de otro material celular o medio de cultivo en la producción según técnicas recombinantes o está esencialmente exento de precursores químicos o de otros compuestos químicos. Preferiblemente, un polinucleótido aislado está exento de secuencias (preferiblemente secuencias codificadoras de proteínas) que flanquean de modo

natural al ácido nucleico (es decir, secuencias que están localizadas en 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 de ácido nucleico aislada puede contener secuencias de nucleótidos de menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb que flanquean de forma 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 material celular, comprende composiciones de proteína o polipéptido con menos de aproximadamente 70%, 50%, 30%, 20%, 10%, 5% (referido al peso en seco) de proteína impurificadora. Si la proteína de acuerdo con la invención o un fragmento biológicamente activo de la misma se produce de forma recombinante, el medio de cultivo comprende preferiblemente menos de aproximadamente 70%, 50%, 30%, 20%, 10% o 5% (referido al peso en seco) de los precursores químicos o de sustancias químicas no proteicas. Fragmentos y variantes de las secuencias de nucleótidos o proteínas o segmentos de proteínas de acuerdo con la invención, que son codificadas con los mismos, están asimismo comprendidos de acuerdo con la invención. Fragmento designa una parte de la secuencia de nucleótidos o una parte de la secuencia de aminoácidos y, por lo tanto, una parte del polipéptido o proteína que es codificado por el mismo.

La invención se refiere también a casetes de expresión que pueden utilizarse para la transfección del marco de lectura abierto, codificador de una fitasa de acuerdo con la invención, en una célula hospedadora. Estas casetes comprenden preferiblemente una región de inicio de la transcripción que está enlazada con el marco de lectura abierto. Una casete de expresión de este tipo puede contener una pluralidad de sitios de escisión por restricción para la inserción del marco de lectura abierto y/u otros ADNs, p. ej. una región reguladora de la transcripción y/o genes marcadores seleccionables. La casete de transcripción comprende en la dirección 5' → 3' de la transcripción una región de inicio de la transcripción y de la traducción, la secuencia de ADN de interés y una región de detención de la transcripción y de la traducción que es funcional en una célula microbiana. La región de terminación puede ser nativa en relación con la región de inicio de la transcripción, puede ser nativa en relación con la secuencia de ADN de interés o puede derivarse de otra fuente arbitraria.

La expresión "marco de lectura abierto" (ORF – siglas en inglés) designa la secuencia de aminoácidos que es codificada entre el codón de inicio y de terminación de la traducción de una secuencia codificadora. Las expresiones "codón de inicio" y "codón de terminación" designan una unidad a base de tres nucleótidos contiguos (codones) en una secuencia codificadora que especifica el comienzo y la detención de la cadena de la síntesis de proteínas (traducción de ARNm).

"Enlace funcional" designa, en relación con un ácido nucleico, una unión como parte de la misma molécula de ácido nucleico en posición y orientación adecuadas con respecto al comienzo de la transcripción del promotor. ADN en unión funcional a un promotor se encuentra bajo la regulación del inicio de la transcripción del promotor. Secuencias codificadoras pueden estar enlazadas funcionalmente con la secuencia reguladora en una orientación sentido o antisentido. Haciendo referencia a polipéptidos, enlace funcional significa la unión como parte del mismo polipéptido, es decir, a través de enlaces peptídico.

De acuerdo con la invención, pueden utilizarse promotores arbitrarios. Promotor designa la secuencia de nucleótidos habitualmente situada aguas arriba (5') en relación con la secuencia codificadora y controla la expresión de la secuencia codificadora, poniendo a disposición el reconocimiento de la ARN-polimerasa y de otros factores que son necesarios para una transcripción correcta. El promotor utilizado de acuerdo con la invención puede comprender un promotor mínimo, es decir, una secuencia de ADN corta a base de una caja TATA y otras secuencias que especifican el lugar de inicio de la transcripción al que están agregados los elementos reguladores para el control de la expresión.

El promotor de acuerdo con la invención puede comprender también una secuencia de nucleótidos que comprende un promotor mínimo y elementos reguladores, promotor que puede controlar la expresión de una secuencia codificadora o ARN funcional. Este tipo de secuencia del promotor se compone de elementos proximales y distales situados aguas arriba, designándose a menudo a los mencionados en último lugar como potenciadores. Por consiguiente, un potenciador es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad del promotor y puede ser un elemento inherente al promotor o un elemento heterólogo insertado con el fin de reforzar el nivel de expresión o la especificidad para el tejido de un promotor. Puede funcionar en ambas orientaciones y puede funcionar incluso en el caso de una disposición aguas arriba o aguas abajo del promotor. Tanto el potenciador como también otros elementos promotores situados aguas arriba fijan proteínas de unión a ADN específicas para la secuencia, las cuales transmiten sus efectos. Los promotores pueden derivarse en su conjunto de un gen nativo o pueden estar compuestos de diferentes elementos que se derivan de diferentes promotores que se presentan de forma natural, o pueden estar incluso compuestos de segmentos de ADN sintéticos. Un promotor puede contener también secuencias de ADN que participan en la unión de factores proteicos, que controlan la eficacia del inicio de la

transcripción como respuesta a condiciones fisiológicas o condicionadas por el desarrollo.

5 Elementos promotores, en particular elementos TATA, que son inactivos o que poseen una actividad del promotor fuertemente disminuida en ausencia de una activación de aguas arriba, se designan promotores mínimos o promotores del núcleo. En presencia de un factor de la transcripción adecuado o bien de factores de la transcripción adecuados, la función del promotor mínimo estriba en la posibilidad de la transcripción. Un promotor mínimo o del núcleo se compone, por consiguiente, sólo de todos aquellos elementos básicos que son necesarios para el inicio de la transcripción, p. ej. una caja TATA y/o un iniciador.

10 La invención se refiere también a vectores que contienen el ADN de acuerdo con la invención. Estos vectores comprenden plásmidos, cósmidos, fagos y otros vectores arbitrarios en una forma de doble hebra o de hebra sencilla, lineal o circular, que eventualmente pueden ser transmitidos o movilizados por sí mismos y que pueden transformarse a un hospedante procariótico o eucariótico ya sea por integración en el genoma celular o pueden presentarse de manera extracromosómica (p. ej. plásmidos de replicación autónoma con un origen de la replicación).

15 Vectores, plásmidos, cósmidos, cromosomas de levadura artificiales (YACs – siglas en inglés), cromosomas de bacterias artificiales (BACs – siglas en inglés) y segmentos de ADN para uso para la transformación de células comprenden, en general, el ADN codificador de fitasa de acuerdo con la invención, así como otro ADN tal como ADNc, un gen o genes que deben ser transfectados en las células. Estas construcciones de ADN pueden comprender otras estructuras tales como promotores, potenciadores, poli-enlazadores o también genes reguladores, en la medida en que sea necesario. Uno de los segmentos de ADN o genes que fue o fueron elegidos para la transfección celular, codifica/codifican de manera oportuna una proteína que es expresada en las células transformadas (recombinantes) así obtenidas, lo cual conduce a una característica rastreadable o seleccionable y/o confiere un fenotipo mejorado a la célula transformada.

20 La construcción de vectores que pueden utilizarse de acuerdo con la invención es conocida por un experto en el sector a la vista de la divulgación precedente (véase, p. ej. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y. (1989)). La casete de expresión de acuerdo con la invención puede contener uno o varios puntos de corte por restricción con el fin de disponer al nucleótido codificador de fitasa bajo la regulación de una secuencia reguladora. La casete de expresión puede contener también una señal de terminación en enlace funcional con el polinucleótido, así como secuencias reguladoras que se requieren para la traducción reglamentaria del polinucleótido. La casete de expresión que contiene al polinucleótido de acuerdo con la invención puede ser quimérica, es decir, al menos uno de sus componentes es heterólogo en relación con al menos uno de los otros componentes. La expresión del polinucleótido en la casete de expresión puede encontrarse bajo el control de un promotor constitutivo, de un promotor inducible, de un promotor regulado, de un promotor viral o de un promotor sintético.

30 Los vectores pueden contener ya elementos reguladores, p. ej. promotores, o las secuencias de ADN de acuerdo con la invención pueden ser manipuladas de manera que contengan elementos de este tipo. Elementos promotores adecuados que pueden utilizarse son conocidos en el sector especializado y, por ejemplo, para *Trichoderma reesei*, son el promotor cbh 1 o el promotor cbh-2, para *Aspergillus oryzae* es el promotor amy, para *Aspergillus niger* son el promotor xyl, glaA, alcA, aphA, tpiA, gpdA, sucl y el promotor pkiA. Elementos promotores adecuados que pueden utilizarse para la expresión en levaduras son conocidos en el sector especializado y son, por ejemplo, el promotor pho5 o el promotor gap para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*, y para *Pichia pastoris*, p. ej., el promotor aoxl o el promotor fmd, o el promotor mox para *H. polymorpha*.

35 ADN que es adecuado para la transfección en células puede comprender junto al ADN de acuerdo con la invención, también ADN que se derivó de una fuente arbitraria o que se aisló de la misma. Un ejemplo de un ADN derivado es una secuencia de ADN que fue identificada como fragmento útil en un organismo dado y que luego fue sintetizado químicamente en forma esencialmente pura. Un ejemplo de un ADN de este tipo es una secuencia de ADN adecuada que se obtuvo, por ejemplo, utilizando endonucleasas de restricción, de modo que pueda continuar siendo manipulado de acuerdo con la invención, por ejemplo, pueda ser amplificado. Un ADN de este tipo se designa habitualmente como ADN recombinante. Por lo tanto, un ADN adecuado comprende ADN totalmente sintético, ADN semi-sintético, ADN aislado de fuentes biológicas y ADN derivado de ARN transfectado. Por lo general, el ADN transfectado no es ningún componente original del genotipo del ADN receptor, pero de acuerdo con la invención, también un gen puede ser aislado de un genotipo dado y eventualmente modificado y, a continuación, múltiples copias del gen pueden ser transfectadas en el mismo genotipo, p. ej. con el fin de reforzar la producción de un producto génico dado.

60

El ADN transfectado comprende, sin limitación, ADN de genes tales como, por ejemplo, de bacterias, levaduras, hongos o virus. El ADN transfectado puede comprender genes modificados o sintéticos, partes de genes o genes quiméricos, incluidos genes del mismo o de un genotipo diferente.

5 El ADN utilizado de acuerdo con la invención para la transformación puede ser circular o lineal, de doble hebra o de una sola hebra. Por lo general, el ADN se presenta en forma de un ADN quimérico tal como un ADN de plásmido, que contiene también regiones codificadoras que son flanqueadas por secuencias reguladoras que sustentan la expresión del ADN recombinante presente en la célula transformada. Por ejemplo, el propio ADN puede contener un promotor o puede consistir en el mismo, que es activo en una célula, que se deriva de una  
10 fuente que se diferencia de la célula, o puede utilizarse un promotor que ya esté presente en la célula, es decir, la célula diana de la transformación.

15 Por lo general, el ADN transfectado es relativamente pequeño, menor que aproximadamente 30 kb, con el fin de minimizar la sensibilidad frente a la degradación, física, química o enzimática, la cual aumenta con el tamaño del ADN.

La selección de un vector de expresión adecuado depende de las células hospedadoras. Vectores de expresión en levaduras u hongos pueden comprender un origen de la replicación, un promotor y un potenciador adecuado, y también puntos de unión a ribosomas, puntos de poliadenilación, puntos de corte y empalme con el donante y el  
20 aceptor, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias 5'-flanqueantes no transcritas, arbitrarios necesarios.

Ejemplos de células hospedadoras adecuadas son: células de hongos del género *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Mucor*, *Penicillium*, etc. tales como, por ejemplo, levaduras de los géneros  
25 *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Trichosporon*, *Schwanniomyces*, *Hansenula*, *Pichia* y similares. Sistemas hospedadores adecuados son, por ejemplo, hongos tales como *Aspergilli*, p. ej. *Aspergillus niger* (ATCC 9142) o *Aspergillus ficuum* (NRL 3135) o *Trichoderma* (p. ej. *Trichoderma reesei* QM6a) y levaduras tales como *Saccharomyces*, p. ej. *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia* tal como, p. ej., *Pichia pastoris*, o *Hansenula*, p. ej. *H. polymorpha* (DSMZ 70277). Microorganismos de este tipo pueden obtenerse de lugares de  
30 depósito reconocidos, p. ej. de American Type Culture Collection (ATCC), de Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) o de Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) o de otros lugares de depósito arbitrarios.

La casete de expresión puede contener en la dirección de transcripción 5'-3' una región de transcripción y de traducción del polinucleótido de acuerdo con la invención y una región de transcripción y de terminación que es funcional in vivo o in vitro. La región de terminación puede ser nativa en relación con la región de inicio de la transcripción o puede ser nativa en relación con el polinucleótido o puede ser de otro origen. Las secuencias reguladoras pueden estar localizadas aguas arriba (secuencias 5' no codificadoras), en el interior (intrón) o aguas  
40 abajo (secuencias 3' no codificadoras) de una secuencia codificadora y pueden afectar a la transcripción, al procesamiento de ARN o a la estabilidad y/o a la traducción de la secuencia codificadora asociada. Secuencias reguladoras pueden comprender, sin limitación, potenciadores, promotores, sitios de unión al represor, secuencias conductoras de la traducción, intrones o secuencias señal de la poliadenilación. Pueden comprender secuencias naturales y sintéticas así como secuencias que son una combinación a base de secuencias sintéticas y naturales.

45 El vector utilizado de acuerdo con la invención puede también comprender secuencias adecuadas para la amplificación de la expresión.

Ejemplos de promotores que pueden utilizarse de acuerdo con la invención son promotores de los que se sabe que controlan la expresión en las células eucarióticas. Pueden utilizarse promotores arbitrarios con la capacidad de  
50 expresión en ficomicetos. Ejemplos son un promotor que es inducido fuertemente por el almidón o la celulosa, p. ej. un promotor para glucoamilasa o  $\alpha$ -amilasa del género *Aspergillus*, o celulasa (celobiohidrolasa) del género *Trichoderma*, un promotor para enzimas en la vía metabólica glicolítica tal como, por ejemplo, fosfogliceratoquinasa (PGK) y glicerinaldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GPD), etc. Se prefiere el promotor de celobiohidrolasa-I, de celobiohidrolasa-II, de amilasa, de glucoamilasa, de xilanasas o de enolasa.

55 Se conocen dos métodos principales para el control de la expresión, es decir, la sobre-expresión y la sub-expresión. La sobre-expresión puede conseguirse mediante la inserción de una o de varias copias extra del gen elegido. Para la sub-expresión existen dos métodos principales que habitualmente se designan en el sector especializado como "sub-regulación antisentido" y "sub-regulación sentido". Por lo general, estos procedimientos  
60 se designan como de "silenciamiento de genes". Estos dos métodos conducen a una inhibición de la expresión del

gen diana.

Adicionalmente al uso de un promotor especial, otros tipos de elementos pueden afectar a la expresión de transgenes. En particular, se demostró que los intrones poseen el potencial para reforzar la expresión del transgen.

5 La casete de expresión puede comprender además otros elementos, por ejemplo aquellos que pueden ser regulados por elementos endógenos o exógenos tales como proteínas dedo de zinc, incluidas proteínas dedo de zinc que se presentan de forma natural o proteínas dedo de zinc quiméricas.

10 La casete de expresión utilizada de acuerdo con la invención puede contener, además, elementos potenciadores o elementos de promotor situados aguas arriba.

15 Vectores para el uso de acuerdo con la invención pueden construirse de manera que contengan un elemento potenciador. Las construcciones de acuerdo con la invención comprenden, por consiguiente, al gen de interés junto con una secuencia de ADN 3' que actúa como señal con el fin de terminar la transcripción y permitir la poliadenilación de ARNm así obtenido. Pueden utilizarse secuencias señal arbitrarias que posibiliten la secreción a partir del organismo hospedante elegido. Una secuencia señal preferida es la secuencia señal de fitasa de *Aspergillus niger* o secuencias señal derivadas de la misma para la secreción a partir de hongos filamentosos.

20 También puede utilizarse una secuencia conductora especial dado que la secuencia de ADN entre el sitio de inicio de la transcripción y el comienzo de la secuencia codificadora, es decir, de la secuencia conductora no traducida, puede afectar a la expresión del gen. Secuencias conductoras preferidas comprenden secuencias que controlan la expresión óptima del gen adherido, es decir, comprenden una secuencia consenso conductora preferida que aumenta o adquiere la estabilidad de ARNm e impide un inicio de la traducción inadecuado. La elección de secuencias de este tipo es bien conocida por un experto en el sector.

25 Con el fin de mejorar la posibilidad de identificar a los transformantes, puede incorporarse en la casete de expresión un gen marcador seleccionable o rastreado. Genes marcadores de este tipo son bien conocidos por un experto en el sector.

30 La casete de expresión o una construcción de vector que contiene la casete de expresión se introduce en una célula hospedadora. Está disponible una pluralidad de técnicas y son bien conocidas por un experto en el sector para la transfección de construcciones en una célula hospedadora. La transformación de células microbianas puede llevarse a cabo utilizando polietilenglicol, cloruro de calcio, infección viral, DEAE-dextrano, infecciones por fagos, electroporación y otros métodos conocidos en el sector especializado. La transformación de hongos puede llevarse a cabo según Penttilä et al., Gene 61: 155-164, 1987. La transfección de un vector recombinante en levaduras puede llevarse a cabo según procedimientos en sí conocidos, incluida la electroporación, uso de esferoplastos, acetato de litio y similares.

40 Tan pronto como se haya obtenido la casete de expresión o bien la secuencia de ADN de acuerdo con la invención, puede introducirse en vectores según procedimientos en sí conocidos con el fin de sobre-exresar el polipéptido codificado en sistemas hospedadores adecuados. Sin embargo, también pueden utilizarse secuencias de ADN como tales con el fin de transformar sistemas hospedadores adecuados de la invención, con el fin de conseguir una sobre-expresión del polipéptido codificado.

45 Tan pronto como fue expresada una secuencia de ADN de acuerdo con la invención en una célula hospedadora adecuada en un medio adecuado, la fitasa codificada puede concentrarse y/o aislarse según procedimientos en sí conocidos a partir del medio, en el caso de que la fitasa sea segregada al medio, o a partir del organismo hospedador, en el caso de que la fitasa esté presente intracelularmente, p. ej. en el espacio periplasmático.

50 Procedimientos conocidos para la separación de los componentes insolubles del medio de cultivo y de la biomasa, seguidos de procedimientos para la concentración de la fitasa, pueden aplicarse para la preparación de las disoluciones concentradas de fitasa o como preparación para el secado de la fitasa. Por ejemplo, pueden utilizarse procedimientos de filtración o procedimientos de centrifugación para la separación de los componentes insolubles, seguidos de procedimientos de ultrafiltración para la concentración, o se emplean procedimientos de filtración de flujo cruzado. El secado puede tener lugar mediante liofilización y secado por pulverización, procedimientos de granulación, extrusión u otros procedimientos. Pueden utilizarse procedimientos conocidos para la purificación de proteínas con el fin de aislar a las fitasas de acuerdo con la invención. Por ejemplo, pueden utilizarse diferentes procedimientos cromatográficos o cromatográficos en gel, individualmente o en combinación. En función de la célula hospedadora utilizada en el caso de un procedimiento de producción recombinante, la enzima de acuerdo

60 con la invención puede ser modificada o no de forma covalente mediante glicosilación. En 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 la proteólisis. En relación con una aplicación específica de la fitasa, se puede preferir una variante glicosilada de la enzima frente a una variante no glicosilada. Por ejemplo, el uso de una fitasa glicosilada en piensos sirve para la protección de la enzima frente a una

5 desnaturalización térmica durante la formación de gránulos de pienso y frente a una inactivación proteolítica en el paso a través del estómago del animal, con lo cual se fomenta la distribución de la enzima activa en el tracto intestinal y en el lugar de acción. Para aplicaciones en la elaboración de alimentos, en la que la actividad enzimática sólo es deseada durante el tratamiento y no en el producto final, se puede preferir una fitasa sensible a una degradación termolábil, es decir, no glicosilada y más sensible a frente a una degradación proteolítica.

10 La invención se refiere también a composiciones de fitasa que contienen al polipéptido de acuerdo con la invención. En general, las composiciones de fitasa son líquidas o secas. Composiciones líquidas contienen la enzima fitasa preferiblemente en una forma purificada o enriquecida. Sin embargo, también pueden añadirse coadyuvantes tales como, por ejemplo, un estabilizador tal como glicerol, sorbita o monopropilenglicol, aditivos

15 tales como sales, azúcares, sustancias conservantes, agentes para el ajuste del valor del pH, proteínas y fitato o sales de mioinositolfosfato (un sustrato de fitasa). Composiciones líquidas típicas son suspensiones acuosas u oleosas. A las composiciones líquidas pueden agregarse un alimento o pienso antes o después de una posible granulación o bien etapa de elaboración.

20 Composiciones secas pueden ser composiciones liofilizadas, secadas por pulverización, granuladas o extrudidas que pueden contener exclusivamente a la enzima. Sin embargo, antes del secado pueden añadirse también sustancias con el fin de regular el valor del pH, así como otros aditivos y sustancias de relleno tales como maltodextrina, lactosa, leche desnatada en polvo, sales de cationes bivalentes como las de Mg, Ca, Zn, etc. Las composiciones secas pueden ser granuladas que pueden mezclarse fácilmente, por ejemplo con alimentos o

25 componentes para piensos o, preferiblemente pueden formar un componente de una pre-mezcla. El tamaño de partículas del granulado enzimático es preferiblemente compatible con el de los otros componentes de la mezcla. Esto posibilita medios seguros y convenientes con el fin de incorporar enzimas, por ejemplo, en alimentos procesados, pre-mezclas o piensos.

30 Por ejemplo, una formulación estable de la enzima fitasa de acuerdo con la invención se puede preparar pulverizando una mezcla a base de una disolución enzimática líquida sobre un agente de relleno tal como maltodextrina y luego secando la mezcla, o a la disolución enzimática líquida se añade, antes del secado, leche desnatada en polvo al 20%-60% (p/p referido a la proteína total de la disolución enzimática) y/o propionato de calcio al 1%-5% (p/p referido a la proteína total de la disolución enzimática) y ajustando el valor del pH a un valor

35 definido, en particular a  $\text{pH } 5,2 \pm 0,5$ . La disminución de la humedad y las interacciones de unión de la fitasa con el agente de relleno protegen a la enzima, adicionalmente a su estabilidad definida en su estructura, frente a influencias del entorno tales como temperaturas que pueden manifestarse durante la preparación del alimento para animales. Formulaciones secas y líquidas pueden estabilizarse ulteriormente si se reduce la actividad de enzimas proteolíticas potenciales que pueden estar presentes como productos secundarios en la mezcla de fermentación

40 líquida que se utiliza para la preparación de la enzima de acuerdo con la invención. La mezcla de enzimas seca, así obtenida, puede utilizarse como suplemento para piensos para uso en la crianza de aves de corral y de cerdos. Además, una reducción de la suplementación de fosfato conduce a una disminución de las impurezas de fosfato que, a su vez, reduce significativamente la contaminación medioambiental a través de la crianza intensiva de animales.

45 Tan pronto como se haya obtenido un preparado de enzimas seco, a partir del mismo puede prepararse, en etapas adicionales, un granulado de aglomeración. Para ello, se utiliza un mezclador con fuerzas de cizalla elevadas, con lo que el material de relleno y la enzima se co-aglomeran y se forma un granulado. Los granulados de absorción se preparan revistiendo núcleos a base de un material de soporte mediante la enzima de acuerdo con la invención.

50 Materiales de carga típicos son sales tales como sulfato disódico. Otros materiales de carga comprenden caolín, talco, silicato de magnesio y aluminio y fibras de celulosa. Eventualmente también en el granulado de aglomeración se recogen aglutinantes tales como dextrina.

55 Materiales de soporte típicos comprenden almidón, p. ej. en forma de mandioca, patata y cereales, en particular maíz, arroz y trigo, o productos proteicos tales como, p. ej., proteína de soja. También pueden utilizarse sales. El granulado se recubre eventualmente con una mezcla de revestimiento. Una mezcla de este tipo comprende agente de revestimiento, preferiblemente agente de revestimiento hidrófobo, aceite de palma deshidratado y talco y, eventualmente, otros aditivos tales como carbonato de calcio o caolín con el fin de mejorar la biodisponibilidad en el lugar de acción determinado.

60

Adicionalmente, las mezclas con fitasa pueden contener otras sustancias tales como agentes colorantes, compuestos aromatizantes, estabilizadores, vitaminas, minerales, otras enzimas para alimentos o piensos, y similares. Esto concierne, en particular, a las denominadas pre-mezclas.

5 Un aditivo para alimentos o alimentos para animales es un compuesto esencialmente puro o una composición a base de varios compuestos que está destinado o es adecuado para ser añadido a alimentos o alimentos para animales. En particular, es una sustancia que, de acuerdo con su finalidad de uso, se convierte en un componente de un alimento o alimento para animales o afecta a propiedades de un producto alimenticio o de alimento para animales. Así, un aditivo de fitasa debe designar una fitasa que no es ningún componente natural de las sustancias utilizadas principalmente para alimentos o alimentos para animales o que no está presente en ellos en su concentración natural. Por ejemplo, la fitasa es añadida al alimento para animales por separado de las sustancias para alimentos para animales solas o en combinación con otros aditivos de alimentos para animales. Una pre-mezcla típica comprende habitualmente uno o varios compuestos tales como vitaminas, minerales o enzimas potenciadoras de los alimentos para animales y soportes y/o excipientes adecuados.

15 Un aditivo de fitasa listo para ser utilizado es un aditivo que no se produce in situ en alimentos para animales o en alimentos elaborados. Un aditivo de fitasa listo para ser utilizado puede ser administrado al hombre o a los animales directamente o, de preferencia, directamente después de la mezclado con otros componentes de los alimentos para animales o de los alimentos. Por ejemplo, un aditivo de alimento para animales de acuerdo con este aspecto de la presente invención es reunido con otros alimentos y aditivos para animales, manteniendo una pre-mezcla o un alimento para animales complementario. Componentes de otros alimentos para animales de este tipo comprenden uno o varios de otros suplementos enzimáticos (preferiblemente termoestables), otros aditivos de alimentos para animales, alimentos para animales minerales y aminoácidos. Los aditivos de alimentos para animales (combinados), así obtenidos, pueden comprender varios tipos de compuestos diferentes y pueden entonces mezclarse en su cantidad adecuada con los alimentos para animales tales como portadores de cereales y proteínas bajo la formación de un alimento para animales compuesto. La elaboración de estos componentes para formar un alimento para animales puede llevarse a cabo después de la mezclado con dispositivos de tratamiento en sí conocidos, tales como una máquina de doble granulación, un granulador de vapor, un expandidor o una extrusora.

30 De manera similar, un aditivo para alimentos de acuerdo con esta forma de realización de la presente invención puede reunirse con otros componentes de los alimentos, con lo cual se crean productos alimenticios elaborados. Otros componentes para alimentos de este tipo comprenden uno o varios suplementos enzimáticos, vitaminas, minerales y oligoelementos. El suplemento nutricional combinado, así obtenido, puede entonces mezclarse en una cantidad adecuada con otros componentes de los alimentos tales como cereales y proteínas vegetales, con el fin de proporcionar un alimento elaborado. La elaboración de estos componentes para formar un alimento elaborado puede llevarse a cabo utilizando dispositivos de elaboración en sí conocidos.

40 En una forma de realización preferida, las composiciones de fitasa de acuerdo con la invención comprenden adicionalmente una cantidad eficaz de una o varias enzimas para alimentos o alimentos para animales, preferiblemente elegidas de alfa-galactosidasas, beta-galactosidasas, lacasas, otras fitasas, fosfatasas, 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 arabinogalactan-endo-1,4-beta-galactosidasas y arabinogalactan-endo-1,3-beta-galactosidasas, enzimas degradadoras de pectinas, en particular pectinasas, pectinesterasas, pectinliasas, poligalacturonasas, arabananasas, ramnogalacturonasas, ramnogalacturonanacetilesterasas, ramnogalacturonan-alfa-ramnosidasas, pectatliasas y alfa-galacturonidasas, mananasas, beta-mannosidasas, manananacetilesterasas, xilanacetilesterasas, proteasas, xilanasas, arabinoxilanasas y enzimas lipolíticas tales como lipasas, fosfolipasas y cutinasas.

50 El aditivo de alimentos para animales de acuerdo con la invención es administrado al animal antes o al mismo tiempo con el pienso. Preferiblemente, el aditivo de alimento para animales de acuerdo con la invención es administrado al animal al mismo tiempo con el pienso.

55 Una cantidad eficaz de fitasa en los alimentos o alimentos para animales asciende a aproximadamente 10-20.000 PPU/kg, de preferencia a aproximadamente 10-15.000 PPU/kg, más preferiblemente a aproximadamente 10-10.000 PPU/kg, todavía más preferiblemente a aproximadamente 50-5.000 PPU/kg, en particular a 50-2.000 PPU/kg de alimento para animales o alimento.

60 La invención se refiere también al uso de fitasa para la elaboración y la preparación de alimentos y alimentos para animales. Cereales y harinas para alimentos pueden ser tratados enzimáticamente con fitasa, con el fin de reducir

el contenido en fitina de las materias primas. Contenidos en fitina reducidos mejoran la calidad del alimento aumentando la disponibilidad de minerales esenciales tales como hierro, calcio y zinc. Adicionalmente al aumento de la calidad de los alimentos, el uso de fitasa durante la elaboración puede mejorar la eficacia total de la preparación de los alimentos. Por ejemplo, la adición de fitasa a copos de soja blancos durante la preparación de un aislado de proteínas de soja, puede aumentar significativamente el rendimiento y la calidad de la proteína extraíble. En este caso, la fitasa sólo es activa durante la preparación y la elaboración y ya no es activa en el producto final. Este aspecto es de importancia en particular en la preparación de la masa de panificación y durante la panificación y en la producción de otros productos digeribles a base de cereales. De manera similar, componentes de alimentos para animales tales como harina de soja tostada o harina de canola pueden ser tratados previamente con fitasa antes del proceso de preparación propiamente dicho. La separación de factores anti-nutritivos en componentes de alimentos para animales antes de la preparación conduce a una calidad fisiológicamente superior y a sustancias constitutivas de los alimentos para animales más valiosas. En el caso de estos procedimientos de elaboración, la fitasa es activa durante la preparación y ya no es activa, por norma general, en el tracto digestivo del animal después de la ingesta del pienso tratado.

Adicionalmente al uso de fitasa como coadyuvante en la elaboración de alimentos para animales, la presente invención se refiere al uso de la fitasa de acuerdo con la invención como auxiliar de la digestión. Fitasa, en forma de comprimido, puede ser ingerida junto con la ingesta del alimento, con el fin distribuir la enzima activa en el tracto gastrointestinal.

La fitasa de acuerdo con la invención puede pasar a emplearse asimismo de una manera ventajosa tanto en animales monogástricos como poligástricos, en particular en terneros jóvenes. Alimentos para peces y crustáceos pueden ser suplementados asimismo con fitasa, con el fin de mejorar el aprovechamiento del alimento y reducir el contenido en fósforo segregado en el caso de una crianza intensiva de animales. El alimento para animales de acuerdo con la invención puede administrarse también a animales tales como aves de corral, p. ej. pollos de engorde, pavos, gansos, patos así como cerdos, caballos, ganado vacuno, ovejas, cabras, perros y gatos, así como peces y crustáceos. Sin embargo, se prefiere particularmente que el alimento para animales de acuerdo con la invención sea administrado a cerdos o a aves de corral.

Formulaciones de fitasa de acuerdo con la invención pueden combinarse también con otras sustancias constitutivas, con lo cual se forman composiciones de alimentos para animales nuevas y particularmente ventajosas. Dado que, como se ha señalado precedentemente, la disponibilidad de fosfato vegetal en la harina de soja y en cereales es baja como consecuencia de la fijación al ácido fítico, se añade al pienso fosfato inorgánico con el fin de garantizar un suministro adecuado de fósforo a los animales. Sin embargo, estos alimentos para animales contienen demasiado fosfato total y conducen, con ello, a una contaminación del medio ambiente con fosfato. Especialmente, el alimento para animales de acuerdo con la invención comprende la combinación de una fitasa de acuerdo con la invención con sustancias constitutivas de alimentos para animales, con el fin de proporcionar un alimento para animales que tenga contenidos esencialmente más bajos de fósforo inorgánico añadido. En una forma de realización preferida, el alimento para animales de acuerdo con la invención comprende sustancias constitutivas para alimentos para animales típicas, sustancias nutricias, oligoelementos, vitaminas, etc., así como una cantidad eficaz de fitasa y fósforo inorgánico, oscilando las cantidades de la fitasa y del fósforo entre 50 y 20.000 unidades de fitasa/kg de alimento para animales y menos de 0,45% de fósforo inorgánico, preferiblemente entre contenidos de 100-10.000 unidades de fitasa/kg de alimento para animales y menos de 0,225% de fósforo inorgánico, preferiblemente contenidos de 150-10.000 unidades de fitasa/kg de alimentos para animales y menos de 0,15% de fósforo inorgánico, todavía más preferiblemente, contenidos de 200-20.000 unidades de fitasa/kg de alimento para animales y ningún aditivo adicional de fósforo inorgánico.

La invención se refiere también a un procedimiento para mejorar el aumento de peso y la capacidad de aprovechamiento del alimento para animales (relación de conversión de alimentos, FCR) en la alimentación de animales, así como al uso de las fitasas de acuerdo con la invención en estos procedimientos. Una fitasa de acuerdo con la invención permite aumentos mejorados en el peso y una capacidad mejorada de aprovechamiento de los alimentos para animales, en particular en relación con el alimento para animales que contiene poco fosfato inorgánico. Conforme al procedimiento de acuerdo con la invención, el contenido en fosfato inorgánico en el alimento para animales puede reducirse a contenidos de 0,45%, preferiblemente inferiores a 0,225%. Preferiblemente, no se añade fosfato inorgánico alguno. Mediante una disponibilidad incrementada de fosfato como consecuencia de la adición de la enzima de acuerdo con la invención, la mineralización de los huesos de los animales se puede mejorar significativamente, lo cual es de gran importancia, en particular en el caso de animales de rápido crecimiento.

De acuerdo con todavía otra forma de realización, la invención se refiere al uso de la enzima de acuerdo con la

invención en la panificación, con lo cual se mejora el desarrollo, la elasticidad y/o estabilidad de la masa de panificación y/o el volumen, la estructura de la corteza y/o la resistencia del artículo panificado frente a las prácticas de panificar antiguas. A pesar de que el preparado enzimático de acuerdo con la invención puede ser utilizado para la preparación de masa de panificación o productos panificados de tipos arbitrarios de harina, p. ej. a base de centeno, cebada, avena o maíz, el preparado enzimático de acuerdo con la invención se manifestó particularmente útil en la preparación de masas de panificación o productos panificados de trigo o de una parte esencial de trigo. Los productos panificados que se pueden preparar con el preparado enzimático de acuerdo con la invención, comprenden pan, panecillos, baguetes y similares. Para la panificación, el preparado enzimático de acuerdo con la invención puede utilizarse con otra actividad enzimática tal como, p. ej. xilanasas, lipasa, amilasa, oxidasa o lacasa, junto a la fitasa o puede utilizarse en combinaciones con otras enzimas tales como lipasa, amilasa, oxidasa (p. ej. glucosaoxidasa, peroxidasa).

Además de ello, se describen los siguientes objetos:

- 15 1. Molécula de ADN recombinante que, después de la expresión en una célula hospedadora procariótica o eucariótica, codifica un polipéptido con actividad de fitasa, comprendiendo la molécula de ADN recombinante una secuencia de ADN elegida de
  - 20 a) secuencias de ADN que codifican un polipéptido con actividad de fitasa que ha sido obtenido mediante variación de la secuencia de fitasa de tipo salvaje madura de *E. coli*, en donde la variación se elige de
    - i) la mutación lisina → ácido aspártico en la posición 74 (K74D) y/o
    - ii) una combinación de las mutaciones asparagina → arginina en la posición 139 (N139R) y ácido aspártico → ácido glutámico en la posición 142 (D142E), y/o
    - 25 iii) una combinación de las mutaciones leucina → isoleucina en la posición 145 (L145I) y leucina → isoleucina en la posición 198 (L198I), y/o
    - iv) una mutación valina → prolina en la posición 200 (V200P) y/o
    - v) una adición N- o C-terminal o una adición N- y C-terminal de un segmento de la secuencia de la fosfatasa ácida de *Aspergillus niger* var. *awamori*, o de la fitasa de *Aspergillus niger*,
  - 30 b) secuencias de ADN que presentan una homología de 70% a 100% con respecto a las secuencias conforme a a),
  - c) secuencias de ADN que, en virtud de la degeneración del código genético, están emparentadas con las secuencias conforme a a) y b),

en donde la molécula de ADN recombinante, en el caso de una expresión en una célula hospedadora adecuada, va acompañada de una estabilidad térmica y frente a proteasas incrementada de la actividad enzimática de la proteína así codificada, presentándose las variaciones iii) y iv) sólo en combinación con una variación i), ii) y/o v), o presentándose conjuntamente con una variación i), ii) y/o v).
- 40 2. Molécula de ADN recombinante según el objeto 1, caracterizada por que la secuencia de ADN comprende la variación N139R y D142E del polipéptido codificado.
3. Molécula de ADN recombinante según el objeto 1, caracterizada por que la secuencia de ADN comprende al menos la variación V200P del polipéptido codificado.
- 45 4. Molécula de ADN recombinante según el objeto 1, caracterizada por que la secuencia de ADN comprende la variación K74D del polipéptido codificado.
5. Molécula de ADN recombinante según el objeto 1, caracterizada por que la secuencia de ADN comprende al menos las variaciones L145I y L198I del polipéptido codificado.
- 50 6. Molécula de ADN recombinante según el objeto 1, caracterizada por que la secuencia de ADN comprende al menos las variaciones K74D, N139R, D142E y V200P del polipéptido codificado.
7. Molécula de ADN recombinante según el objeto 1, caracterizada por que la adición N-terminal del polipéptido codificado comprende la secuencia FSYGAAIPQS TQEQFSQEF RDGYSILKHY GGNGPYSERV SYGIARDPPTS.
- 55 8. Molécula de ADN recombinante según el objeto 1, caracterizada por que la adición C-terminal del polipéptido codificado comprende la secuencia LSFWWNYNTT TELNYRSSPI ACQEGDAMD.
- 60

- 5
9. Molécula de ADN recombinante según el objeto 1, caracterizada por que la adición N-terminal del polipéptido codificado comprende la secuencia FSYGAAIPQS TQEKQFSQEF RDGYSILKHY GGNGPYSERV SYGIARDPPTS y la adición C-terminal del polipéptido codificado comprende la secuencia LSFWWNYNTT TELNYRSSPI ACQEGDAMD.
10. Molécula de ADN recombinante según uno de los objetos 1 a 8, caracterizada por que comprende una secuencia elegida de las secuencias SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21.
- 10 11. Polipéptido que posee actividad de fitasa y que es codificado por una molécula de ADN recombinante según uno de los objetos 1 a 10 o que se obtiene mediante la expresión de una célula hospedadora transformada con el mismo.
- 15 12. Polipéptido según el objeto 11, caracterizado por que comprende una secuencia elegida de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22.
- 20 13. Construcción de ADN con la capacidad de, después de la introducción en una célula hospedadora adecuada, controlar la expresión de un gen fitasa mutado en un hospedador, caracterizada por que contiene eventualmente un promotor, eventualmente secuencias señal y marcadoras, una secuencia de ADN según una de las reivindicaciones 1 a 10, un terminador y, eventualmente, secuencias flanqueantes en 5' y 3'.
- 25 14. Construcción de ADN según el objeto 13, caracterizada por que en el caso del promotor se trata del promotor de celobiohidrolasa-I, de celobiohidrolasa-II, de amilasa, de glucoamilasa, de xilanasas o de enolasa.
- 30 15. Construcción de ADN según el objeto 14, caracterizada por que en el caso de la secuencia señal y/o de las secuencias flanqueantes en 5' y 3' se trata de secuencias señal de fitasa eventualmente modificadas de *Aspergillus niger*.
- 35 16. Vector con capacidad de transformar una célula hospedadora, caracterizado por que el vector contiene una construcción según el objeto 13.
- 40 17. Vector según el objeto 16, caracterizado por que se elige del plásmido pET-PhyM2, depositado bajo el número de depósito DSM 18715, el plásmido pUC-PhyM3, depositado bajo el número de depósito DSM 18717, el plásmido pET-PhyM7, depositado bajo el número de depósito DSM 18716, el plásmido pUC-PhyM9, depositado bajo el número de depósito DSM 18718, el plásmido pUC-PhyM10, depositado bajo el número de depósito DSM 18719, el plásmido pPhy2005, depositado bajo el número de depósito DSM18720, el plásmido pPhy2006, depositado bajo el número de depósito DSM 18721.
- 45 18. Célula hospedadora transformada, elegida de hongos, levaduras, bacterias y células de mamíferos, que contiene una molécula de ADN recombinante según uno de los objetos 1 a 10 y provista de la capacidad de expresar un polipéptido con actividad de fitasa.
- 50 19. Célula hospedadora transformada según el objeto 18, caracterizada por que pertenece al género *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Mucor* o *Penicilium*.
- 55 20. Procedimiento para la producción de fitasa, caracterizado por que se cría una célula hospedadora transformada según el objeto 18 ó 19 bajo condiciones que fomentan la formación de fitasa y se aísla la fitasa así producida.
- 60 21. Composición que comprende un polipéptido según el objeto 11 ó 12, eventualmente junto con otros coadyuvantes y/o sustancias activas.
22. Composición según el objeto 21, caracterizada por que contiene leche desnatada en polvo y/o propionato de calcio.
23. Composición según el objeto 21, caracterizada por que la composición es una composición de alimentos o alimentos para animales.

24. Composición según el objeto 21, 22 ó 23, caracterizada por que la composición es un producto panificado.
- 5 25. Uso de un polipéptido según el objeto 11 ó 12 para la preparación de un preparado para mejorar el aprovechamiento del fosfato de la alimentación en animales y hombres.
26. Uso de un polipéptido según el objeto 11 ó 12 para mejorar las propiedades reológicas de masas de panificación para la preparación de artículos de panadería.
- 10 27. Uso de una variación de la secuencia de fitasa de tipo salvaje madura de *E. coli*, elegida de
- i) la mutación lisina → ácido aspártico en la posición 74 (K74D) y/o
  - ii) una combinación de las mutaciones asparagina → arginina en la posición 139 (N139R) y ácido aspártico → ácido glutámico en la posición 142 (D142E), y/o
  - 15 iii) una combinación de las mutaciones leucina → isoleucina en la posición 145 (L145I) y leucina → isoleucina en la posición 198 (L198I), y/o
  - iv) una mutación valina → prolina en la posición 200 (V200P) y/o
  - v) una adición N- o C-terminal o una adición N- y C-terminal de un segmento de la secuencia de la fosfatasa ácida de *Aspergillus niger* var. *awamori*, o de la fitasa de *Aspergillus niger*,
- 20 para la preparación de una molécula de ADN recombinante que, después de la expresión en una célula hospedadora procariótica o eucariótica codifica un polipéptido con actividad de fitasa que posee una estabilidad térmica y frente a proteasas incrementada.
28. Uso según el objeto 27, caracterizado porque la variación es K74D.
- 25 29. Uso según el objeto 27, caracterizado porque la variación es N139R y D142E.
30. Uso según el objeto 27, caracterizado porque la variación es L145I y L198I.
- 30 31. Uso según el objeto 27, caracterizado porque la variación es V200P.
32. Uso según el objeto 27, caracterizado porque la variación es K74D, N139R, D142E, V200P.
- 35 33. Uso según el objeto 27, caracterizado porque la variación es la adición N-terminal de la secuencia FSYGAAIPQS TQEKQFSQEF RDGYSILKHY GGNGPYSERV SYGIARDPPTS.
34. Uso según el objeto 27, caracterizado porque la variación es la adición C-terminal de la secuencia LSFWWNYNTT TELNYRSSPI ACQEGDAMD.
- 40 35. Uso según el objeto 27, caracterizado porque la variación es la adición N-terminal de la secuencia FSYGAAIPQS TQEKQFSQEF RDGYSILKHY GGNGPYSERV SYGIARDPPTS y la adición C-terminal de la secuencia LSFWWNYNTT TELNYRSSPI ACQEGDAMD.

Las Figuras adjuntas muestran:

- 45 Fig. 1: mapa de plásmidos de PET-PhyM2
- Fig. 2: mapa de plásmidos de pAB490-PhyM2
- 50 Fig. 3: mapa de plásmidos de pUC-PhyM3
- Fig. 4: mapa de plásmidos de pAB489-PhyM3
- Fig. 5: mapa de plásmidos de pUC-PhyM10
- 55 Fig. 6: mapa de plásmidos de pAB600-PhyM10
- Fig. 7: mapa de plásmidos de pPhy2005
- 60 Fig. 8: mapa de plásmidos de pAB-Phy2005

Fig. 9: mapa de plásmidos de pPhy2006

Fig. 10: mapa de plásmidos de pAB-Phy2006

Fig. 11: comparación de las secuencias de mutantes individuales y variantes a base de la secuencia de tipo salvaje (Dassa). Están destacadas las mutaciones o bien variaciones.

Los siguientes ejemplos explican con mayor detalle la invención.

## **Ejemplos**

### **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, pH 5,0. Después de incubación durante 15 minutos a 37°C, se detuvo la reacción mediante la adición de un volumen igual de ácido tricloroacético al 15%. Los iones fosfato liberados se determinaron cuantitativamente a 820 nm por mezclado de 100 µl de la mezcla de ensayo con 900 µl de H<sub>2</sub>O y 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,6 M, 2% de ácido ascórbico y 0,5% de molibdato de amonio, después de incubación a 50°C y de un tiempo de 20 min. Como referencia se utilizaron unas disoluciones patrón de fosfato de potasio.

### **Ejemplo 2 - Construcción de los plásmidos pET-PhyM2 y pAB490-PhyM2 (genotipo PhyM2)**

La construcción del plásmido pAB490-PhyM2 se efectuó mediante las siguientes etapas:

#### 1. Construcción del pET-PhyM2

El plásmido pET-PhyM2 contiene la secuencia de la fitasa de *E. coli* (Dassa et al. 1990, n° de acceso M58740) con las modificaciones de los aminoácidos N139R y D142E.

La secuencia de ADN, que con el codón CAG (Gln) en la posición 1 comprende un marco de lectura abierto de 1230 pb y que codifica una enzima con 410 aminoácidos, fue introducida utilizando el uso de codones de *T. reesei* (<http://www.kazusa.or.jp/codon>) en el plásmido pET26b(+) (Novagen, Alemania, modificado por Brain, Alemania). Para la realización de las mutagénesis se utilizó un método orientado a oligonucleótidos basado en una PCR. Partiendo del plásmido que contiene el gen que codifica la secuencia de aminoácidos de Dassa de tipo salvaje, para cada triplete a intercambiar se sintetizaron dos cebadores complementarios con las respectivas mutaciones, estando localizada la mutación en cada caso en el centro del cebador. Con ayuda de los dos cebadores se amplificó entonces el plásmido total. El plásmido obtenido con las mutaciones para el genotipo M2 tiene la denominación pET-PhyM2.

Para la construcción se utilizaron los siguientes cebadores.

a) Para las mutaciones en la posición 139:

ccaactggataacgccgggtgaccgacgcat (SEQ ID NO:1)

atggcgctcggtcaccgggcttatccagttgg (SEQ ID NO:2)

b) Para las mutaciones adicionales incorporadas seguidamente en la posición 142:

gcccggtgaccgaggccatcctcagc (SEQ ID NO:3)

gctgaggatggcctcggtcaccgggc (SEQ ID NO:4)

El plásmido está representado en la Fig. 1 y fue depositado bajo el número de depósito DSM 18715 el 18.10.2006.

#### 2. Construcción de pAB490-PhyM2

Para la construcción del plásmido pAB490-PhyM2 se amplificó el gen PhyM2 que codifica la fitasa de *E. coli*, a partir del plásmido pET-PhyM2 mediante una PCR. El producto de la PCR fue cortado con las enzimas de

restricción SpeI y PaeI y fue insertado en los sitios de corte con SpeI y PaeI detrás del fragmento del gen *cbhII* de *T. reesei* en el plásmido pAB490. Con ello resultó un marco de lectura abierto, que codifica la fusión CBHII-KexII-PhyM2.

- 5 El plásmido resultante tiene la denominación pAB490-PhyM2 (Fig. 2) y fue representado en mapa mediante endonucleasas de restricción. La secuencia de la fitasa fue confirmada mediante secuenciación.

10 El plásmido pAB490 se basa en pUC18 y contiene el fragmento del gen *cbhII* (los nucleótidos 1-307 corresponden a los aminoácidos M1 hasta S86, Teeri et al., 1987, Gene 51: 43-52, n° de acceso 16190) bajo el control del promotor de *cbhI* y del terminador de *cbhI* procedentes del plásmido pALK487 (documento WO 94/28117). Un fragmento de EcoRI/SpeI del plásmido PALK424 con una longitud de 4,78 kb, de extremos lisos (documento WO 93/24621), que contenía el marcador de *amdS* y las secuencias flanqueantes en 3' de *cbhI*, se incorporó en el sitio de corte con *StuI* en el extremo 3' del terminador de *cbhI*. Además de ello, se introdujeron otros sitios de corte (con SpeI y PaeI) aguas abajo del fragmento del gen *cbhII*. Estos sitios de corte se utilizaron para la clonación directa de las variantes de la fitasa.

15 La casete de expresión aislada a partir del plásmido pAB490-PhyM2 contiene el siguiente material genético:

20 Promotor de *cbhI* (celobiohidrolasa I): el fragmento de EcoRI/SacII de 2,2 kb, que contiene el promotor de *cbhI*, procede de *Trichoderma reesei* QM6a. La región de promotor funciona también como un ADN homólogo (junto con el fragmento de 3' de *cbhI*; véase más adelante), con el fin de controlar la integración del ADN transformante en el locus de *cbhI*.

25 Fragmento del gen *cbhII*: el fragmento del gen *cbhII* de 307 pb con su secuencia de señal se encuentra directamente bajo el control del promotor de *cbhI*.

30 La secuencia de la fitasa de *E. coli*, que contiene la mutación de los aminoácidos N139R y D142E, se ha fusionado mediante un sitio de corte con KexII en el extremo de 3' del fragmento del gen *cbhII*. La secuencia Kex contiene los siguientes aminoácidos: RTLVKR.

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

35 Gen *amdS*: el gen, inclusive su promotor y su terminador, se aisló a partir de *Aspergillus nidulans* VH1-TRSX6 y codifica la acetamidasa (Hynes et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3: 1430-1439; Kelly y Hynes, 1985, EMBO J. 4:475-479). La acetamidasa permite a la cepa crecer utilizando acetamida como única fuente de nitrógeno y esta característica se utilizó para la selección de los transformantes

40 Fragmento de 3' de *cbhI*: el fragmento (1,7 kb, 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 et al., 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 la casete de expresión de la fitasa en el locus de *cbhI* mediante recombinación homóloga.

45 La secuencia del plásmido pAB490-PhyM2 fue confirmada mediante representación en mapa con enzimas de restricción y secuenciación.

### **Ejemplo 3 - Construcción de los plásmidos pET-PhyM7 y pAB490-PhyM7 (genotipo PhyM7)**

50 El plásmido pET-PhyM7 contiene la secuencia de la fitasa de *E. coli* (Dassa et al., 1990, n° de acceso M58740) utilizando el uso de codones de *T. reesei* (<http://www.kazusa.or.jp/codon>) con la mutación K74D. La construcción así como la clonación del plásmido pET-PhyM7 tuvieron lugar de una manera análoga a la producción descrita en el Ejemplo 2 del plásmido pET-PhyM2. Los cebadores utilizados para la introducción de las mutaciones en la posición de aminoácido 74 son:

55

cggactcctggctgacaagggatgccgc (SEQ ID NO:5)

gcgggcatcccttgtcagccaggagtcgc (SEQ ID NO:6)

El plásmido pET-PhyM7 ha sido depositado bajo el número de depósito DSM 18716 el 18.10.2006.

La construcción así como la clonación del plásmido pAB490-PhyM7 tuvieron lugar de una manera análoga a la producción descrita en el Ejemplo 2 del plásmido pAB490-PhyM2. La secuencia del plásmido pAB490-PhyM7 fue confirmada mediante secuenciación. La casete de expresión aislada a partir del plásmido pAB490-PhyM7 contiene, por lo tanto, con la excepción de la nueva secuencia específica de la fitasa del genotipo PhyM7, los mismos elementos que se han descrito en el Ejemplo 2.

#### **Ejemplo 4 - Construcción de los plásmidos pUC-PhyM3 y pAB489-PhyM3 (genotipo PhyM3)**

La variante de fitasa PhyM3 contiene la secuencia de la fitasa de *E. coli* (Dassa et al., n° de acceso M58740) utilizando el uso de codones de *T. reesei* (<http://www.kazusa.or.jp/codon>) con la mutación V200P. La secuencia de ADN con el codón CAG (Gln) en la posición 1 abarca un marco de lectura abierto de 1230 pb y codifica una enzima con 410 aminoácidos. Se utilizó el péptido de señal con una longitud de 18 aminoácidos de la fitasa de *A. niger*, con el fin de segregar el mutante de la fitasa de *E. coli* a partir de *Trichoderma reesei*.

Partiendo del plásmido que contiene el gen que codifica la secuencia de aminoácidos de Dassa de tipo salvaje, se llevó a cabo la mutación V200P mediante el método de PCR de una manera análoga al principio de Tomic et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18(6), 1656) y de Valette et al. (1989, Nucleic Acids Research, 17(2), 723-733). El producto de la PCR fue cortado con AvrII y PaeI e insertado en los sitios de disociación con SpeI y PaeI detrás del promotor de cbhI de *T. reesei* en el plásmido pAB489. En el plásmido pAB489-PhyM3 resultante de nuevas, el gen para la variante de la fitasa de *E. coli* PhyM3 con la secuencia de señal modificada de la fitasa de *A. niger* - MGVSAILLPLYLLSGVTS- (Mullaney et al., Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 35(5), 611-614, n° de acceso M94550) está directamente bajo el control del promotor de cbhI. Se utilizó el péptido de señal con una longitud de 18 aminoácidos de la fitasa de *A. niger*, con el fin de segregar el mutante de la fitasa de *E. coli* a partir de *Trichoderma reesei*. Los 16 pares de bases (CCGCGGACTGCGCATC atg) situados aguas arriba del codón de iniciación, que pertenecen al promotor de *T. reesei* (Shoemaker et al., 1983, Bio/Technology 1, 691-696), fueron modificados después de la incorporación del fragmento AvrII-PaeI de la fitasa en los sitios de disociación con SpeI y PaeI en el plásmido pAB489 para dar CCGCGGACTAGGCATC atg.

La construcción artificial pAB489-PhyM3 (Fig. 4) fue confirmada mediante representación en mapa y secuenciación.

La construcción del plásmido pAB489 se efectuó mediante las siguientes etapas:

A partir del plásmido pALK487 (documento WO 94/28117), mediante introducción de otros sitios de corte (con SpeI y PaeI, CCGCGGACTAGTCCTTAATTAACCGCGG) en el sitio de SacII entre el promotor de cbhI y el terminador de cbhI, se produjo el plásmido pAB487. Los sitios de corte con SpeI y PaeI se utilizan para la clonación directa de las variantes de la fitasa. Un fragmento de EcoRI/SpeI 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 flanqueantes en 3' de cbhI, se insertó en el sitio de disociación con StuI de pAB487, con lo que se obtuvo el vector pAB489.

La casete de expresión aislada a partir de pAB489-PhyM3 contiene el siguiente material genético:

Promotor de cbhI (celobiohidrolasa I): el fragmento de EcoRI/SacII de 2,2 kb, que contiene el promotor de cbhI, procede de *Trichoderma reesei* QM6a. La región de promotor funciona también como un ADN homólogo (junto con el fragmento de 3' de cbhI; véase más adelante), con el fin de controlar la integración del ADN transformante en el locus de cbhI.

Secuencia de señal: Se utilizó el péptido de señal modificado de la fitasa de *A. niger* con el fin de segregar la fitasa de *E. coli* a partir de *Trichoderma reesei*.

La fitasa de *E. coli* con la secuencia de la mutación V200P, inclusive la secuencia de señal de la fitasa de *A. niger*, se insertó entre el promotor de cbhI y el terminador de cbhI.

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

Gen amdS: El gen, inclusive su promotor y su terminador, se aisló a partir de *Aspergillus nidulans* VH1-TRSX6 y

codifica la acetamidasa (Hynes et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3: 1430-1439; Kelly y Hynes, 1985, EMBO J. 4:475-479). La acetamidasa permite a la cepa crecer utilizando acetamida como única fuente de nitrógeno y esta característica se utilizó para la selección de los transformantes.

5 Fragmento de 3' de *cbhl*: el fragmento (1,7 kb, 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 et al., 1991, Enzyme Microb. Technol. 13: 227-233). El fragmento de 3' se utilizó junto con la región de promotor, con el fin de integrar de un modo dirigido al objetivo la casete de expresión de la fitasa en el locus de *cbhl* mediante recombinación homóloga.

10 El gen de la variante de la fitasa PhyM3 se clonó en el plásmido pAB2004. El plásmido obtenido tiene la denominación pUC-PhyM3 (Fig. 3) y fue depositado como DSM 18717 de acuerdo con las condiciones precedentemente mencionadas.

15 El plásmido pAB2004 se basa en el plásmido pUC18 y fue producido mediante introducción de otros sitios de corte en los sitios de HindIII-EcoRI.

#### **Ejemplo 5 - Construcción de los plásmidos pUC-PhyM9 y pAB489-PhyM9 (genotipo PhyM9)**

20 La variante de la fitasa PhyM9 contiene la secuencia de la fitasa de *E. coli* (Dassa et al. 1990, n° de acceso M58740) como un gen sintético utilizando el uso de codones de *T. reesei* (<http://www.kazusa.or.jp/codon>) con las mutaciones L145I y L198I. La secuencia de ADN con el codón CAG (Gln) en la posición 1 comprende un marco de lectura abierto de 1230 pb y codifica una enzima con 410 aminoácidos.

25 En el plásmido pAB489-PhyM9, el gen que codifica la variante de la fitasa de *E. coli* PhyM9 con la secuencia de señal de la fitasa de *A. niger* (MGVSAVLLPLYLLSGVTS) Mullaney et al., Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 35(5), 611-614, n° de acceso M94550) se encuentra directamente bajo el control del promotor de *cbhl*. El péptido de señal con una longitud de 18 aminoácidos de la fitasa de *A. niger* se utilizó con el fin de segregar el mutante de la fitasa de *E. coli* a partir de *Trichoderma reesei*.

30 La construcción de pAB489-PhyM9 y pUC-PhyM9 tuvo lugar de una manera análoga a la de los plásmidos pAB489-PhyM3 y pUC-PhyM3 en el Ejemplo 4 y contiene con ello, con la excepción de la secuencia de señal de *A. niger* y la secuencia específica de la fitasa de *E. coli*, los mismos elementos genéticos.

35 El plásmido pUC-PhyM9 fue depositado bajo el número de depósito DSM 18718 el 18.10.2006.

#### **Ejemplo 6 - Construcción de los plásmidos pUC-PhyM10 y pAB600-PhyM10, que codifican mutantes múltiples (genotipo PhyM10)**

40 El plásmido pAB600-PhyM10 contiene la secuencia de la fitasa de *E. coli* con las modificaciones de los aminoácidos K74D, N139R, D142E y V200P. A partir de los plásmidos pAB490-PhyM2, pAB490-PhyM7 y pAB489-PhyM3 se produjo el gen que codifica la variante de la fitasa PhyM10 mediante el método de PCR de una manera análoga al principio de Tomic et al. (1990), Nucleic Acids Research, 18(6), 1656) y Vallette et al. (1989), Nucleic Acids Research, 17(2), 723-733). El producto de PCR se cortó con SpeI y PaeI y se insertó en los sitios de disociación con SpeI y PaeI en el plásmido pAB600.

45 El plásmido pAB600-PhyM10 resultante (véase la Fig. 6) fue confirmado mediante representación en mapa y secuenciación.

50 En el plásmido pAB600-PhyM10 se fusionó la secuencia de la fitasa de *E. coli* por medio de un sitio de corte con KexII junto al extremo de 3' del fragmento del gen CBHII. La secuencia de Kex contiene los siguientes aminoácidos RTLVKR.

La construcción del plásmido pAB600 se efectuó mediante las siguientes etapas:

55 El plásmido pAB1280 se basa en pUC18 y contiene el fragmento del gen *cbhII* (nucleótidos 1-307, que corresponden a los aminoácidos M1 hasta S86, Teeri et al., 1987, Gene 51: 43-52, n° de acceso 16190) bajo el control del promotor de *cbhl* y del terminador de *cbhl* procedentes del plásmido pALK487 (documento WO 94/28117). Además de ello, se introdujeron otros sitios de corte (con SpeI y PaeI) aguas abajo del fragmento del gen *cbhII*. Estos sitios de corte se utilizan para la clonación directa de la variante de la fitasa.

60

A partir del plásmido p3SR2 (Hynes et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3, 1430-1439; Kelly y Hynes, 1985, EMBO J. 4, 475-479) se aisló el gen de la acetamidasa (*amdS*) mediante el método de PCR como el fragmento de *Ascl* y *NruI*, y se insertó en el plásmido pAB1280 cortado con *Ascl*/*StuI*.

5 Para la amplificación del gen *amdS* se derivaron los siguientes cebadores a partir de la información de la secuencia del gen de acetamidasa de *A. nidulans*.

*AmdS-AscI* aggcgcgcacctagtcattcattggataggcagattactcag (SEQ  
ID NO: 7)

*AmdS-NruI* ggaattctcgcgaaaggcaacaaccagctcaccctgag (SEQ  
ID NO: 8)

10 El plásmido obtenido tiene la denominación pAB600 y fue confirmado mediante representación en mapa y secuenciación.

15 El gen de la variante de la fitasa *PhyM10* se clonó en el plásmido pAB2004. El plásmido pUC-*PhyM10* está representado en la Fig. 5 y ha sido depositado bajo el número de depósito DSM 18719 el 18.10.2006.

### **Ejemplo 7 - Construcción de los plásmidos pPhy2005 y pAB-Phy2005 (genotipo Phy2005)**

20 La construcción del plásmido pAB-Phy2005 se efectuó mediante las siguientes etapas:

#### **1. Construcción de pPhy2005**

25 El plásmido pPhy2005 contiene la fusión del gen (*ap*) de la fosfatasa ácida de *A. niger var. awamori* (Piddington et al., 1993, Gene 133(1), 55-62; n° de acceso L02420) y del gen de la fitasa de *E. coli* utilizando el uso de codones de *T. reesei* (<http://www.kazusa.or.jp/codon>) (Dassa et al. 1990, n° de acceso M58740). Con ello resulta un marco de lectura abierto, que codifica una variante de la fitasa con 457 aminoácidos, habiendo sido reemplazados los primeros cuatro (4) aminoácidos del gen de la fitasa de *E. coli* por los primeros cincuenta y uno (51) aminoácidos del gen de la fosfatasa ácida. Para la secreción de la proteína, consistente en la fusión de la fosfatasa ácida y de la fitasa de *E. coli* en *T. reesei*, se utilizó la secuencia de señal de la fosfatasa ácida.

30 La fusión de la secuencia de la fosfatasa ácida de *A. niger var. awamori* y de la secuencia de la fitasa de *E. coli*, producida utilizando el uso de codones de *T. reesei*, fue sintetizada y clonada en el plásmido pUC18. El plásmido pPhy2005 obtenido fue confirmado mediante secuenciación.

35 El plásmido está representado en la Fig. 7 y ha sido depositado bajo el número de depósito DSM 18720 el 18.10.2006.

#### **2. Construcción de pAB-Phy2005**

40 Para la construcción del plásmido pAB-Phy2005, la secuencia de la fusión de la fosfatasa y de la fitasa procedente del plásmido pPhy2005 se cortó con *AvrII* y *PacI* y se insertó en el plásmido pAB489 en los sitios de corte con *SpeI* y *PacI* detrás del promotor de *cbhl* de *T. reesei*. El plásmido resultante tiene la denominación pAB-Phy2005 (Fig. 8) y fue representado en mapa mediante endonucleasas de restricción y la secuencia de la fitasa fue confirmada mediante secuenciación.

45 El pAB-Phy2005 aislado a partir de la casete de expresión contiene el siguiente material genético:

50 Promotor de *cbhl* (celobiohidrolasa I): el fragmento de *EcoRI*/*SacII* 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 (junto con el fragmento de 3' de *cbhl*; véase más adelante), con el fin de controlar la integración del ADN transformante en el locus de *cbhl*.

55 Fragmento del gen de la fosfatasa ácida: el fragmento del gen de la fosfatasa ácida con su secuencia de señal se encuentra directamente bajo el control del promotor de *cbhl*. Los 16 pares de bases (CCGCGGACTGCGCATC atg) situados aguas arriba del codón de iniciación, que pertenecen al promotor de *T. reesei* (Shoemaker et al. 1983,

Bio/Technology 1, 691-696), fueron modificados después de la incorporación del fragmento de AvrII-PacI de la fusión de la fosfatasa y la fitasa para dar CCGCGGACTAGGCATC atg.

5 Gen de la fitasa de *E. coli*: el gen sintético de la fitasa de *E. coli* se ha fusionado directamente en el extremo de 3' de la secuencia de la fosfatasa ácida para dar un marco de lectura abierto.

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

10 Gen amdS: el gen, inclusive su promotor y su terminador, se aisló a partir de *Aspergillus nidulans* VH1-TRSX6 y codifica la acetamidasa (Hynes et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3: 1430-1439; Kelly y Hynes, 1985, EMBO J. 4:475-479). La acetamidasa permite a la cepa crecer utilizando acetamida como única fuente de nitrógeno y esta característica se utilizó para la selección de los transformantes.

15 Fragmento de 3' de cbhl: El fragmento (1,7 kb, 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 et al., 1991, Enzyme Microb. Technol. 13: 227-233). El fragmento de 3' se utiliza junto con la región de promotor, con el fin de integrar de un modo dirigido al objetivo la casete de expresión de la fitasa en el locus de cbhl mediante recombinación homóloga.

20

### **Ejemplo 8 - Construcción de los plásmidos pPhy2006 y pAB-Phy2006 (genotipo Phy2006)**

La construcción del plásmido pAB-Phy2006 se efectuó mediante las siguientes etapas:

#### 25 1. Construcción de pPhy2006

Para la construcción del plásmido pPhy2006, el fragmento del gen ap con una longitud de 87 pb, que codifica los 29 aminoácidos pertenecientes al extremo C del gen ap de la fosfatasa ácida de *A. niger var. awamori*, se fusionó directamente a la secuencia de ADN que codifica el último aminoácido (leucina) de la fitasa de *E. coli*, en el plásmido pPhy2005. Con ello resulta un marco de lectura abierto de 486 aminoácidos.

30

La fusión Phy2006 procedente de la secuencia de la fosfatasa ácida de *A. niger var. awamori* y de la secuencia de la fitasa de *E. coli* producida utilizando el uso de codones de *T. reesei* fue sintetizada y clonada en el plásmido pUC18. La nueva secuencia contenida en el plásmido pPhy2006 obtenido fue confirmada mediante secuenciación.

35

El plásmido está representado en la Fig. 9 y ha sido depositado bajo el número de depósito DSM 18721 el 18.10.2006.

#### 40 2. Construcción de pAB-Phy2006

40

La construcción así como la clonación del plásmido pAB-Phy2006 son idénticas a la producción del plásmido pAB-Phy2005 descrita en el Ejemplo 7.

La secuencia de la variante de la fitasa pAB-Phy2006 (Fig. 10) fue confirmada mediante secuenciación.

45

### **Ejemplo 9 - Transformación de *T. reesei***

50 *T. reesei* RH 3780d fue transformado por separado con las casetes de expresión linealizadas, aisladas a partir de los plásmidos pAB489-PhyM3, pAB490-PhyM2, pAB490-PhyM7, pAB489-PhyM9, pAB600-PhyM10, pAB-Phy2005 y pAB-Phy2006. Las técnicas utilizadas para la transformación y la manipulación de *T. reesei* eran las utilizadas según Penttilä et al. (1987, Gene 61: 155-164). Los transformantes fueron seleccionados y purificados dos veces mediante aislamiento de esporas individuales. Entre todos los transformantes se escogieron aquéllos que tenían la más alta potencia de secreción y se utilizaron ulteriormente en el Ejemplo 10 para la producción de un material enzimático. Los transformantes utilizados están recopilados en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2: Listado de los transformantes para otros ensayos en los Ejemplos 10 - 13.

Genotipo	Transformante
Wt (pKDa4)	RH 31071
pKDa2 (V200Y; M1)	RH 31068
PhyM2	RH 31575
PhyM3	RH 31545
PhyM7	RH 31507
PhyM9	RH 31686
PhyM10	RH 31898
Phy2005	RH 31676
Phy2006	RH 31677

### **Ejemplo 10 - Producción de enzima con los mutantes individuales**

5

#### **A) Producción de disoluciones enzimáticas mediante fermentación en matraces de sacudimiento**

Los transformantes, que portan las casetes de expresión de los Ejemplos 2 a 8, o bien los transformantes con el plásmido pKDa2 (M1) y pKDa4 (secuencia de aminoácidos de la fitasa de *E. coli* de tipo salvaje según Dassa) procedentes del documento DE 10 2004 050 410, se cultivaron en matraces de sacudimiento con regulación del pH en una instalación DASGIP sobre un medio inductor de la celulasa con la siguiente composición: 10,5% (p/v) de lactosa, 5,25% (p/v) de DSG, 0,63% (p/v) de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, resto agua del grifo, con un ajuste del valor del pH a 4,5 antes de la esterilización. Después de inoculación, en el matraz de sacudimiento se estableció un gradiente de valores del pH en el espacio de 5 h a pH 3,3. Los filtrados del cultivo, obtenidos después de un cultivo durante 6 días con una regulación del valor del pH a un pH de 3,3, se utilizaron para la determinación de la actividad de fitasa y para el análisis de la termoestabilidad mediante una calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Ejemplo 11).

#### **B) Preparación de granulados de enzimas mediante fermentación en biorreactores de 30 l y secado en un ProCell5**

Los transformantes del Ejemplo 10 A) se cultivaron en el medio del Ejemplo 10 A) en unos biorreactores de 30 l a un valor del pH de  $3,2 \pm 0,2$ , a 200 hasta 400 rpm y con una velocidad de aireación de 0,5 vvm. Al final de la fermentación realizada durante 6 días se separó la biomasa mediante filtración y el material sobrenadante del cultivo transparente se concentró en un factor de 6 por evaporación mediante ultrafiltración (membrana de separación por corte a 30 kDa). El material concentrado se filtró en condiciones estériles y luego se utilizó para la subsiguiente producción de granulados de enzimas.

Los granulados se produjeron a partir de concentrados por UF mediante secado en un granulador por atomización del tipo ProCell5, de la razón social Glatt Systemtechnik GmbH, Dresden, Alemania. Para ello, el valor del pH de los concentrados por UF se ajustó a 5,2 y antes del secado se añadieron 50% (p/p) de leche desnatada en polvo con un contenido de lactosa de 30% y 9,2% (p/p) de propionato de Ca, estando ambas adiciones referidas al contenido global de proteínas del material concentrado por UF. La mezcla se secó mediante una tobera para dos materiales con un  $\varnothing$  de 1,2 mm y a una presión creciente del aire desde 1,2 hasta 2,2 bar a una temperatura del aire de entrada 80°- 90°C. Los rendimientos de actividad en el secado se situaban en el intervalo de 89 a 99%. Los granulados producidos de esta manera se utilizaron para el ensayo en el Ejemplo 12.

### **Ejemplo 11- Determinación de la estabilidad térmica mediante DSC**

Las muestras procedentes del Ejemplo 10 A) se cambiaron de tampón mediante una columna PD-10 (Farmacia) en un tampón de acetato de sodio 100 mM, de pH 5,2. Para ello, se aplicaron 1,5 ml de la muestra y se eluyeron con 3,5 ml de un tampón según las instrucciones del fabricante. Todos los ensayos de DSC se llevaron a cabo en un aparato VP-DSC (MicroCal Inc., Northampton, MA, EE.UU.), y los datos fueron transferidos a un PC con el fin de ser evaluados en éste con ayuda del software Origin v7.0383 (OriginLab Corp. Northampton, MA, EE.UU.).

Las muestras fueron desgasificadas antes de la medición durante 20 min en un ThermoVac2 (MicroCal Inc., Northampton, MA; EE.UU.) y reguladas en temperatura a 25°C en un baño de agua.

Las mediciones se efectuaron con los siguientes parámetros:

#### **A) Parámetros constantes del aparato:**

50

Volumen de las celdas: 0, 51231 ml  
 Resistencia eléctrica de calentamiento de referencia: 1009,1 ohms  
 Resistencia eléctrica de calentamiento de la celda: 1002,7 ohms  
 Tasa adiabática: 0,88181  
 5 Lectura del valor Delta T: 3,676

B) Los parámetros de barrido en el VP-DSC fueron los siguientes:

10 Velocidad de barrido (hacia arriba y hacia abajo) : 1°C min<sup>-1</sup>  
 Temperatura antes del ciclo de barrido: 25°C  
 Período de tiempo de equilibrado antes del ciclo: 15 min  
 Período de tiempo de equilibrado después del ciclo: 0 min  
 Filtro: 10 s  
 Retroalimentación: ninguna  
 15 Temperatura inicial: 25°C  
 Temperatura final: 105°C  
 Presión en la celda: de 26,1 a 28,7 psi (1,827 a 2,009 bar)

20 La siguiente Tabla 3 muestra la temperatura de fusión T<sub>m</sub> (en grados Celsius) y el desplazamiento de la temperatura de fusión ΔT (en grados Celsius) de las fitasas mutantes de *E. coli*, que se habían producido según los Ejemplos arriba indicados, en comparación con la fitasa de *E. coli* de tipo salvaje (Dassa et al., 1990) producidos con el mismo sistema de hospedador que las variantes mutantes de la fitasa de *E. coli* y una fitasa de *E. coli* con una mutación (M1) no de acuerdo con la invención, asimismo producida con el mismo sistema de hospedador que las variantes mutantes de acuerdo con la invención de la fitasa de *E. coli*.

25 Tabla 3: Temperatura de fusión T<sub>m</sub> [°C] y desplazamiento de la temperatura de fusión ΔT [°C] de las mutantes de la fitasa de *E. coli* en comparación con la proteína de tipo salvaje, todas producidas en *T. reesei* de acuerdo con el Ejemplo 10 A

Muestra/genotipo	Fitasa	
	T <sub>m</sub> [°C]	ΔT [°C]
Tipo salvaje	65,64	--
M1	65,01	- 0,63
M2	66,75	+ 1,11
M3	66,04	+ 0,40
M7	66,21	+ 0,57
M9	66,27	+ 0,63
Phy2005	66,06	+ 0,42
Phy2006	66,06	+ 0,42

30 Los resultados demuestran que en el caso de todos los mutantes ha aparecido un aumento de la temperatura de fusión de la proteína, lo cual se manifiesta en un desplazamiento positivo de la temperatura del punto de fusión. El aumento de la temperatura del punto de fusión es equivalente a un aumento de la estabilidad térmica. La mejora más alta de la termoestabilidad lo mostraba en este caso la mutación doble M2 con ΔT = +1,11°C. En  
 35 contraposición a ello, la mutación descrita en el documento DE 10 2004 050 410 para la mejora del nivel de secreción (V200Y = M1), mostraba un empeoramiento de la termoestabilidad (ΔT = -0, 63°C).

También las prolongaciones en el extremo N-terminal o N- y C-terminal mostraron mejoras de la termoestabilidad. Éstas se sitúan el mismo orden de magnitud que la mutación puntual en el caso de M3.

**Ejemplo 12 - Medición de la termoestabilidad en el procedimiento de granulación**

45 Los granulados de enzimas producidos de acuerdo con el Ejemplo 10B) se mezclaron previamente con harina de trigo, tipo 550, con el fin de obtener 300 g de una mezcla previa que contiene enzimas. Esta mezcla previa se mezcló en el Instituto Biotecnológico del Research Institute for Food and Molecular Biotechnology, Kolding, Dinamarca, con 15 kg de un alimento para animales con el fin de garantizar una dilución óptima para la introducción por mezcladura en 285 kg de un alimento para animales y una actividad enzimática bien determinable en el material granulado. La cantidad empleada del granulado de enzimas condujo a una actividad de la fitasa de  
 50 aprox. 3 hasta 6 unidades enzimáticas por cada gramo de alimento para animales en la mezcla antes del proceso de ensayo. Los 300 kg de alimento para animales fueron tratados en la instalación de granulación experimental, y

tienen la composición de la Tabla 4.

Tabla 4: Composición del alimento para animales que debe de ser granulado

Componente	[%]
Trigo	hasta 75
Hipro Soja 48	20
Aceite de soja	4,75
Vitamina/minerales, Beta Avitren 90	0,25
Mezcla previa de enzimas*	300 g

5 \*Contiene una fitasa con los genotipos wt, PhyM1, PhyM2, PhyM3, PhyM7, PhyM9, Phy2005 o Phy2006

Condiciones de granulación:

10 Mezclador horizontal con un volumen de 700 l, 48 rpm. La cantidad, que es mezclada, se sitúa en el intervalo de 80 a 300 kg por h.

Un tornillo sinfín de transporte horizontal está conectado con el mezclador para el vaciado del mezclador, cuya velocidad de transporte está adaptada a la etapa subsiguiente.

15 A continuación de la mezcladura, en el mezclador horizontal se efectúa un tratamiento térmico en un mezclador de cascada (acondicionador) de Kahl con una longitud de 130 cm, un diámetro de 30 cm, 155 rpm y 37 cámaras. El caudal de paso es de 300 kg por h. El alimento para animales y las enzimas están en contacto con un vapor húmedo aproximadamente durante 30 s y con ello se calientan a una temperatura de 70° a 95°C. El vapor, que es puesto a disposición por una caldera de alta presión de Dan Stoker, circula con una sobrepresión de 2 bar a través de una válvula de regulación de la presión hacia el mezclador de cascada. La válvula regula la cantidad de vapor que afluye al mezclador de cascadas y da lugar allí al calentamiento del alimento para animales (inclusive la enzima).

25 El material acondicionado es granulado por medio de una prensa de Simon Heesen y a continuación es enfriado mediante aire en una caja perforada atravesada con un caudal de 1.500 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>. La prensa de granulación funciona con 500 rpm con una potencia absorbida de 7,5 kW y produce con ello unos gránulos de 3 x 20 mm.

30 El tratamiento en el mezclador de cascada dio lugar a una carga térmica de la enzima contenida en el material granulado. A continuación de la producción de los gránulos, se determinó el hallazgo renovado de la actividad de fitasa en el alimento para animales granulado. En la siguiente Tabla 5 se indica el hallazgo renovado de la actividad de fitasa en el alimento para animales granulado en función de la temperatura al realizar el tratamiento.

35 Tab. 5: Hallazgo renovado de la actividad de fitasa en el alimento para animales después del acondicionamiento a 70° hasta 95°C y de una subsiguiente granulación. Todas las enzimas fueron expresadas por medios recombinantes con *T. reesei*.

T [°C]	Hallazgo renovado de la actividad de fitasa [%]							
	wt	M1	M2	M3	M7	M9	Phy2005	Phy2006
70	93,0	64,0	103,1	101,6	109,5	108,4	97,6	93,6
75	90,3	47,8	104,9	90,7	88,2	105,0	85,4	90,1
80	46,6	27,8	73,0	43,7	55,5	55,3	32,9	58,6
85	7,8	5,9	37,9	9,2	16,8	11,0	7,6	27,5
90	1,3	0,0	9,7	2,8	5,4	3,0	0,6	11,8
95	0,5	0,0	4,9	0,0	1,4	0,0	1,0	0,5

40 Los resultados demuestran que la modificación de la termoestabilidad, que se encontró mediante DSC en el caso de las mediciones en un líquido, también se volvió a encontrar en los ensayos "secos" de granulación. La mejora de la termoestabilidad frente a la enzima de tipo salvaje no es constante en este caso en todos los mutantes a lo largo de todo el intervalo medido de temperaturas. M2 mostraba en el ensayo de DSC la estabilidad térmica más alta. También en el ensayo de granulación se consiguió la mejor estabilización mediante una mutación en una región aislada por la mutación doble M2, que introduce un puente iónico en la hélice D de la fitasa de *E. coli*. El mutante M1 no de acuerdo con la invención muestra, igual a como en el ensayo de DSC, un empeoramiento de la termoestabilidad en comparación con la enzima de tipo salvaje expresada en *Trichoderma reesei*. La mutación M3, que asimismo por sí sola no es de acuerdo con la invención, muestra unas propiedades de termoestabilidad similares a las de la enzima de tipo salvaje. La variante Phy2005, que sólo lleva la prolongación N-terminal por

5 medio de la parte correspondiente de la fosfatasa ácida de *A. niger var. awamori*, no es tan estable a más altas temperaturas como la Phy2006, que contiene la prolongación tanto N-terminal como también C-terminal. Esto apunta a que estas prolongaciones pueden contribuir muy ciertamente a una acumulación de moléculas de la fitasa de *E. coli* de una manera análoga a la dimerización de la fosfatasa ácida en condiciones normales y, con ello, mejorarla la termoestabilidad.

### **Ejemplo 13 - Medición de la estabilidad proteolítica en un procedimiento in vitro**

10 Para la determinación de la estabilidad proteolítica in-vitro se utilizaron unas muestras de enzimas procedentes del Ejemplo 10A), es decir, muestras de los transformantes M1 (la mutación que no es de acuerdo con la invención), M2, M3, M7, Phy2005 y Phy2006 producidas con los transformantes de la Tabla 2.

15 20 ml de una solución de pepsina (Merck 7190), que contiene 20 unidades de proteasa por ml en tampón de glicina-HCl (pH 2,5), estando referida la actividad, según la indicación del fabricante, a la hemoglobina, a pH de 1,6 y a 25°C, se regularon a una temperatura de 40°C.

20 Se añadieron 10 ml de una disolución de fitasa (diluida a razón de 1:100) y la disolución se completó hasta 50 ml con el tampón y a continuación se incubó a 40°C, pH de 2,5 durante 30 min. La reacción se interrumpió mediante inmersión en un baño de hielo/agua y el valor del pH se aumentó inmediatamente a un pH de 5 con lejía de sosa y la disolución se diluyó en este caso hasta 100 ml. La actividad de fitasa se midió entonces de acuerdo con el Ejemplo 1.

25 10 ml de la disolución tratada con pepsina se ajustaron a un pH de 7. Se añadieron 30 ml de una solución de pancreatina (Merck 7130), que contenía 30 unidades de una proteasa (caseína, pH 8,0, 35°C) en un tampón Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0), la disolución se diluyó hasta 50 ml con un tampón Tris-HCl, pH 7, y la disolución se incubó en un baño de agua a 40°C durante 30 min. La reacción se detuvo mediante inmersión en un baño de hielo/agua y el valor de pH se disminuyó inmediatamente a un pH de 5 con HCl y la disolución se diluyó en este caso a 100 ml. La actividad de fitasa se midió entonces según el Ejemplo 1. Los resultados se representan en la Tabla 6.

Tab. 6: Hallazgo renovado de la actividad después de un tratamiento de los mutantes de la enzima con pepsina y a continuación con pancreatina

Genotipo	Actividad residual después del tratamiento con pepsina [%]	Actividad residual después del tratamiento con pepsina y pancreatina [%]
PhyM1	84	71
PhyM2	111	85
PhyM3	112	80
PhyM7	101	75
Phy2005	110	99
Phy2006	109	78

5 Los resultados muestran para todos los mutantes una estabilidad proteolítica muy alta en presencia de pepsina y de pancreatina, en comparación con el mutante comparativo PhyM1, en unas condiciones in-vitro, tales como las que se presentan en el estómago de animales monogástricos, p. ej. cerdos. La alta estabilidad proteolítica aquí mostrada ilustra que estos mutantes de la enzima son especialmente adecuados para un empleo en el sector de los alimentos para animales.

10

# ES 2 434 328 T3

## LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> AB Enzymes GmbH
- 5 <120> Polipéptido con actividad de fitasa y estabilidad térmica incrementada de la actividad enzimática, así como secuencia de nucleótidos que le codifican
- <130> 16936EP1
- 10 <140>  
<140> 02-11-2007
- <150> DE 10 2006 053 059.4  
<151> 10-11-2006
- 15 <160> 22
- <170> PatentIn version 3.1
- 20 <210> 1  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220>  
<223> Cebador
- <400> 1  
**ccaactggat aacgcccggg tgaccgacgc cat** **33**
- 30 <210> 2  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220>  
<223> Cebador
- <400> 2  
**atggcgctcgg tcacccgggc gttatccagt tgg** **33**
- 40 <210> 3  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 45 <220>  
<223> Cebador
- 50 <400> 3  
**gccaacgtga ccgaggccat cctcagc** **27**
- <210> 4  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 55 <220>  
<223> Cebador
- 60 <400> 4  
**gctgaggatg gcctcgggtca cgttggc** **27**

ES 2 434 328 T3

<210> 5  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 5  
 10  
**eggactcctg gctgacaagg gatgcccgc** **29**  
 <210> 6  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Cebador  
 20  
 <400> 6  
**gcgggcatcc ottgtcagcc aggagtccg** **29**  
 25  
 <210> 7  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 7  
**aggcgcgccc tagtcatcat tggataggca gattactcag** **40**  
 35  
 <210> 8  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 8  
 45  
**ggaattctcg cgaaaggcaa caaccagctc acccctgag** **39**  
 <210> 9  
 <211> 1230  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> PhyM2 de ADN  
 55  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) ... (1230)  
 <223>  
 60  
 <400> 9

ES 2 434 328 T3

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

ES 2 434 328 T3

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

gac ctc atc aag act ggc 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 gcc 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

5 <210> 10  
 <211> 410  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> PhyM2 de ADN

<400> 10

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

15

ES 2 434 328 T3

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 Arg Val Thr Glu Ala Ile  
 130 135 140  
 Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Arg Gln  
 145 150 155 160  
 Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser Asn  
 165 170 175  
 Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr Gln  
 180 185 190  
 Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Tyr Ser Ala Asp Asn Val Ser Leu Thr  
 195 200 205  
 Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu Gln  
 210 215 220  
 Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp Ser  
 225 230 235 240  
 His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe Tyr Leu  
 245 250 255  
 Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu Leu  
 260 265 270  
 Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln Ala  
 275 280 285  
 Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His Asp  
 290 295 300  
 Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Asn Trp Thr Leu  
 305 310 315 320

ES 2 434 328 T3

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

5

<210> 11  
 <211> 1230  
 <212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> PhyM3 de ADN

15 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) ... (1230)  
 <223>

400> 11  
 cag agc gag ccc gag ctg aag ctg gag tcg gtc gtg atc gtc agc cgc 48  
 Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser Arg  
 1 5 10 15

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

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

cct cgc ggc ggt gag 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

20

ES 2 434 328 T3

100					105					110						
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	ggg	tcc	atc	gcc	gac	ttc	acc	ggc	cat	cgg	cag	480
Leu	Ser	Arg	Ala	Gly	Gly	Ser	Ile	Ala	Asp	Phe	Thr	Gly	His	Arg	Gln	
145					150					155					160	
acg	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	ccc	tcc	gcg	gac	aac	gtc	tcc	ctt	acc	624
Ala	Leu	Pro	Ser	Glu	Leu	Lys	Pro	Ser	Ala	Asp	Asn	Val	Ser	Leu	Thr	
		195					200					205				
ggg	gcc	ggt	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	ggt	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	ggg	gtc	acc	ctc	ccc	act	tcc	gtc	ctg	ttt	atc	gcc	ggg	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	ggg	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	ggt	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				

ES 2 434 328 T3

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> 12  
 <211> 410  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> PhyM3 de ADN

10 <400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser Asn



<220>  
 <223> PhyM7 de ADN

5 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) ... (1230)  
 <223>

10 <400> 13

cag agc gag ccc gag ctg aag ctg gag tcg gtc gtg atc gtc agc cgc	48
Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser Arg	
1 5 10 15	
cac ggc gtg cgt gct cct acc aag gcc acg cag ctg atg cag gac gtc	96
His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met Gln Asp Val	
20 25 30	
acc cct gac gcc tgg ccc acc tgg ccc gtc aag ctt ggc tgg ctg act	144
Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Trp Leu Thr	
35 40 45	
cct cgc ggc ggt gag 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 gac aag gga tgc ccg cag tct	240
Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Asp 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	
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 Gly 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	

15

ES 2 434 328 T3

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 gcc 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	

5 <210> 14  
 <211> 410  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> PhyM7 de ADN

<400> 14

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

ES 2 434 328 T3

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 Asp Lys Gly Cys Pro Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys Thr  
 85 90 95  
 Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr Val  
 100 105 110  
 His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro Leu  
 115 120 125  
 Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala Asn Val Thr Asp Ala Ile  
 130 135 140  
 Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Arg Gln  
 145 150 155 160  
 Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser Asn  
 165 170 175  
 Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr Gln  
 180 185 190  
 Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Tyr Ser Ala Asp Asn Val Ser Leu Thr  
 195 200 205  
 Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu Gln  
 210 215 220  
 Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp Ser  
 225 230 235 240  
 His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe Tyr Leu  
 245 250 255  
 Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu Leu  
 260 265 270

ES 2 434 328 T3

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

- 5 <210> 15
- <211> 1230
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> PhyM9 de ADN

- <220>
- <221> CDS
- <222> (1) ... (1230)
- 15 <223>

<400> 15  
 cag agc gag ccc gag ctg aag ctg gag tcg gtc gtg atc gtc agc cgc 48  
 Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser Arg  
 1 5 10 15  
 cac ggc gtg cgt gct cct acc aag gcc acg cag ctg atg cag gac gtc 96  
 His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met Gln Asp Val  
 20 25 30  
 acc cct gac gcc tgg ccc acc tgg ccc gtc aag ctt gcc 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 qgc ggt gag ctg atc gcc tac ctg gga cac tac caa cgc cag 192  
 42

ES 2 434 328 T3

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			
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						
atc	tct	aga	gct	gga	ggt	tcc	atc	gcc	gac	ttc	acc	ggc	cat	cgg	cag		480
Ile	Ser	Arg	Ala	Gly	Gly	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	atc	aag	gtg	tcc	gcg	gac	aac	gtc	tcc	ctt	acc		624
Ala	Leu	Pro	Ser	Glu	Ile	Lys	Val	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	ggt	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	ttg	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		

ES 2 434 328 T3

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 teg 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> 16
- 5 <211> 410
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
  
- <220>
- 10 <223> PhyM9 de ADN
  
- <400> 16

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	

ES 2 434 328 T3

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  
 Ile 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 Ile Lys Val 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

ES 2 434 328 T3

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

5 <210> 17  
<211> 1230  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> PhyM10 de ADN

<220>  
<221> CDS  
<222> (1) ... (1230)  
15 <223>

<400> 17

cag	agc	gag	ccc	gag	ctg	aag	ctg	gag	tcg	gtc	gtg	atc	gtc	agc	cgc	48
Gln	Ser	Glu	Pro	Glu	Leu	Lys	Leu	Glu	Ser	Val	Val	Ile	Val	Ser	Arg	
1				5					10					15		
cac	ggc	gtg	cgt	gct	cct	acc	aag	gcc	acg	cag	ctg	atg	cag	gac	gtc	96
His	Gly	Val	Arg	Ala	Pro	Thr	Lys	Ala	Thr	Gln	Leu	Met	Gln	Asp	Val	
			20					25						30		
acc	cct	gac	gcc	tgg	ccc	acc	tgg	ccc	gtc	aag	ctt	ggc	tgg	ctg	act	144
Thr	Pro	Asp	Ala	Trp	Pro	Thr	Trp	Pro	Val	Lys	Leu	Gly	Trp	Leu	Thr	
			35				40						45			
cct	cgc	ggc	ggc	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	ggt	gcc	gac	gga	ctc	ctg	gct	gac	aag	gga	tgc	ccg	cag	tct	240
Arg	Leu	Val	Ala	Asp	Gly	Leu	Leu	Ala	Asp	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			
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	cgg	gtg	acc	gag	gcc	atc	432
Lys	Thr	Gly	Val	Cys	Gln	Leu	Asp	Asn	Ala	Arg	Val	Thr	Glu	Ala	Ile	
		130				135					140					
ctc	agc	agg	gct	gga	ggc	tcc	atc	gcc	gac	ttc	acc	ggc	cat	cgg	cag	480
Leu	Ser	Arg	Ala	Gly	Gly	Ser	Ile	Ala	Asp	Phe	Thr	Gly	His	Arg	Gln	
145					150					155					160	

ES 2 434 328 T3

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 ccc tcc gcg gac aac gtc tcc ctt acc	624
Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Pro Ser Ala Asp Asn Val Ser Leu Thr	
195 200 205	
ggg 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	

ES 2 434 328 T3

5 <210> 18  
 <211> 410  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> PhyM10 de ADN  
 <400> 18

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 Asp 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 Arg Val Thr Glu Ala Ile  
 130 135 140

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

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

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

Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Pro 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

ES 2 434 328 T3

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

- 5 <210> 19
- <211> 1371
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Phy2005 de ADN

- <220>
- <221> CDS
- 15 <222> (1) ... (1371)
- <223>

<400> 19

ES 2 434 328 T3

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

ES 2 434 328 T3

Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln	
260	265 270
gcg cag gga atg ccc gag cct ggg tgg ggc cgc att acc gat tct cac	864
Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp Ser His	
275	280 285
cag tgg aac acc ctg ctc tcg ctt cac aac gcc cag ttc tat ctg ctc	912
Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu	
290	295 300
caa cgc acg ccc gag gtt gcc cgc agc cgc gcc acc ccg ctg ctc gac	960
Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp	
305	310 315 320
ctc atc aag act gcg ctg acg ccc cac cct ccg cag aag cag gct tac	1008
Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr	
325	330 335
ggt gtc acc ctc ccc act tcc gtc ctg ttt atc gcc ggt cac gac acc	1056
Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His Asp Thr	
340	345 350 355
aac ctg gcc aat ctc ggc ggc gct ctg gag ctc aac tgg acg ctt ccc	1104
Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro	
355	360 365
gga cag ccg gat aac act ccc cct ggc ggt gag ctg gtg ttc gaa cgc	1152
Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg	
370	375 380 385
tgg cgt cgg ctc agc gac aac tcc cag tgg att cag gtt tcg ctg gtc	1200
Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser Leu Val	
385	390 395 400
ttc cag acc ctg cag cag atg cgc gac aaa acg ccc ctg tcc ctc aat	1248
Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn	
405	410 415
acc cct ccc ggc gag gtc aag ctg acc ctg gca gcc tgt gaa gag cgc	1296
Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg	
420	425 430 435
aac gcc cag ggc atg tgc tct ctc gct ggc ttt acg caa atc gtg aac	1344
Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn	
435	440 445
gag gcc cgc atc ccc gct tgc tct ctg	1371
Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu	
450	455

5 <210> 20  
 <211> 457  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Phy2005 de ADN  
 <400> 20

15 Phe Ser Tyr Gly Ala Ala Ile Pro Gln Ser Thr Gln Glu Lys Gln Phe  
 1 5 10 15

ES 2 434 328 T3

Ser Gln Glu Phe Arg Asp Gly Tyr Ser Ile Leu Lys His Tyr Gly Gly  
 20 25 30

Asn Gly Pro Tyr Ser Glu Arg Val Ser Tyr Gly Ile Ala Arg Asp Pro  
 35 40 45

Pro Thr Ser Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser Arg His  
 50 55 60

Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met Gln Asp Val Thr  
 65 70 75 80

Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Trp Leu Thr Pro  
 85 90 95

Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Gln Arg Gln Arg  
 100 105 110

Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys Lys Gly Cys Pro Gln Ser Gly  
 115 120 125

Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly  
 130 135 140

Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr Val His  
 145 150 155 160

Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys  
 165 170 175

Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu  
 180 185 190

Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Arg Gln Thr  
 195 200 205

Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu  
 210 215 220

Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala  
 225 230 235 240

Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly  
 245 250 255

Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln  
 260 265 270

ES 2 434 328 T3

Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp Ser His  
 275 280 285

Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu  
 290 295 300

Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp  
 305 310 315 320

Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr  
 325 330 335

Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His Asp Thr  
 340 345 350

Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro  
 355 360 365

Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg  
 370 375 380

Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser Leu Val  
 385 390 395 400

Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn  
 405 410 415

Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg  
 420 425 430

Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn  
 435 440 445

Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu  
 450 455

- <210> 21
- <211> 1458
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
  
- <220>
- 10 <223> Phy2006 de ADN
  
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1) ... (1458)
- <223>
- 15 <400> 21

ttc tcc tac ggc gct gcc att cct cag tca acc cag gag aag cag ttc 48  
 Phe Ser Tyr Gly Ala Ala Ile Pro Gln Ser Thr Gln Glu Lys Gln Phe

ES 2 434 328 T3

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

ES 2 434 328 T3

gcg cag gga atg ccc gag cct ggg tgg ggc cgc att acc gat tct cac Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp Ser His 275 280 285	864
cag tgg aac acc ctg ctc tcg ctt cac aac gcc cag ttc tat ctg ctc Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu 290 295 300	912
caa cgc acg ccc gag gtt gcc cgc agc cgc gcc acc ccg ctg ctc gac Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp 305 310 315 320	960
ctc atc aag act gcg ctg acg ccc cac cct ccg cag aag cag gct tac Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr 325 330 335	1008
ggt gtc acc ctc ccc act tcc gtc ctg ttt atc gcc ggt cac gac acc Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His Asp Thr 340 345 350	1056
aac ctg gcc aat ctc ggc ggc gct ctg gag ctc aac tgg acg ctt ccc Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro 355 360 365	1104
gga cag ccg gat aac act ccc cct ggc ggt gag ctg gtg ttc gaa cgc Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg 370 375 380	1152
tgg cgt cgg ctc agc gac aac tcc cag tgg att cag gtt tcg ctg gtc Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser Leu Val 385 390 395 400	1200
ttc cag acc ctg cag cag atg cgc gac aaa acg ccc ctg tcc ctc aat Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn 405 410 415	1248
acc cct ccc ggc gag gtc aag ctg acc ctg gca ggc tgt gaa gag cgc Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg 420 425 430	1296
aac gcc cag ggc atg tgc tct ctc gct ggc ttt acg caa atc gtg aac Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn 435 440 445	1344
gag gcc cgg atc ccc gct tgc tct ctg ttg agc ttc tgg tgg aac tac Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu Leu Ser Phe Trp Trp Asn Tyr 450 455 460	1392
aac acc acg acg gag ctg aac tac cgc tct agc cct att gcc tgc cag Asn Thr Thr Thr Glu Leu Asn Tyr Arg Ser Ser Pro Ile Ala Cys Gln 465 470 475 480	1440
gag ggt gat gct atg gac Glu Gly Asp Ala Met Asp 485	1458

<210> 22  
 <211> 486  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Phy2006 de ADN

10 <400> 22

ES 2 434 328 T3

Phe Ser Tyr Gly Ala Ala Ile Pro Gln Ser Thr Gln Glu Lys Gln Phe  
 1 5 10 15  
 Ser Gln Glu Phe Arg Asp Gly Tyr Ser Ile Leu Lys His Tyr Gly Gly  
 20 25 30  
 Asn Gly Pro Tyr Ser Glu Arg Val Ser Tyr Gly Ile Ala Arg Asp Pro  
 35 40 45  
 Pro Thr Ser Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser Arg His  
 50 55 60  
 Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met Gln Asp Val Thr  
 65 70 75 80  
 Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Trp Leu Thr Pro  
 85 90 95  
 Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Gln Arg Gln Arg  
 100 105 110  
 Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys Lys Gly Cys Pro Gln Ser Gly  
 115 120 125  
 Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly  
 130 135 140  
 Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr Val His  
 145 150 155 160  
 Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys  
 165 170 175  
 Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu  
 180 185 190  
 Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Arg Gln Thr  
 195 200 205  
 Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu  
 210 215 220  
 Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala  
 225 230 235 240  
 Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly  
 245 250 255

ES 2 434 328 T3

Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu  
 290 295 300

Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp  
 305 310 315 320

Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr  
 325 330 335

Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His Asp Thr  
 340 345 350

Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro  
 355 360 365

Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg  
 370 375 380

Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser Leu Val  
 385 390 395 400

Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn  
 405 410 415

Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg  
 420 425 430

Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn  
 435 440 445

Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu Leu Ser Phe Trp Trp Asn Tyr  
 450 455 460

Asn Thr Thr Thr Glu Leu Asn Tyr Arg Ser Ser Pro Ile Ala Cys Gln  
 465 470 475 480

Glu Gly Asp Ala Met Asp  
 485

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula de ADN recombinante que, después de su expresión en una célula hospedadora procariótica o eucariótica, codifica un polipéptido con actividad de fitasa, conteniendo la molécula de ADN recombinante una secuencia de ADN, seleccionada entre
- 10 a) secuencias de ADN que codifican un polipéptido con una actividad de fitasa, que se había obtenido mediante variación de la secuencia de la fitasa madura de *E. coli* de tipo salvaje, comprendiendo la variación la mutación lisina → ácido aspártico en la posición 74 (K74D),
- 10 b) secuencias de ADN que, debido a la degeneración del código genético, están emparentadas con las secuencias de acuerdo con a),
- 15 en donde la molécula de ADN recombinante, en el caso de su expresión en una adecuada célula hospedadora, va acompañada de unas estabilidades térmica y frente a proteasas incrementadas de la actividad enzimática de la proteína así codificada.
- 20 2. Molécula de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que la secuencia de ADN comprende adicionalmente la variación V200P del polipéptido codificado.
- 20 3. Molécula de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que la secuencia de ADN comprende adicionalmente las variaciones L145I y L198I del polipéptido codificado.
- 25 4. Molécula de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que como adición N-terminal del polipéptido codificado comprende la secuencia FSYGAAIPQS TQEKQFSQEF RDGYSILKHY GGNGPYSERV SYGIARDPPTS, y/o como adición C-terminal del polipéptido codificado comprende la secuencia LSFWWNYNTT TELNYRSSPI ACQEGDAMD.
- 30 5. Molécula de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que comprende una secuencia escogida entre las secuencias SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 17.
- 35 6. 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 a 5 o que se obtiene mediante expresión de una célula hospedadora transformada con ésta.
- 35 7. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que comprende una secuencia escogida entre las SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO:18.
- 40 8. Construcción de ADN con la capacidad para regular la expresión de un gen de fitasa mutado en un hospedador, después de la introducción en una célula hospedadora adecuada, caracterizada por que contiene una secuencia de ADN de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5 y un terminador.
- 45 9. Construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizada por que posee secuencias flanqueantes en 5' y 3', un promotor y/o secuencias de señal y de marcador.
- 50 10. Construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada por que 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 xilanaso o de la enolasa.
- 50 11. Construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, caracterizada por que en el caso de la secuencia de señal y/o de las secuencias flanqueantes en 5' y 3' se trata de las secuencias de señal de la fitasa de *Aspergillus niger*.
- 55 12. Construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizada por que en el caso de las secuencias de señal de la fitasa de *Aspergillus niger* se trata de secuencias de señal modificadas de la fitasa de *Aspergillus niger*.
13. Vector con la capacidad de transformar a una célula hospedadora, caracterizado por que el vector contiene una construcción de acuerdo con las reivindicaciones 8 a 12.
- 60 14. Vector de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado por que se escoge entre el plásmido pET-PhyM7,

depositado bajo el número de depósito DSM 18716 o el plásmido pUC-PhyM10, depositado bajo el número de depósito DSM 18719.

- 5 15. Célula hospedadora 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 a 5, y que está dotada de la capacidad de expresar un polipéptido con actividad de fitasa.
- 10 16. Célula hospedadora transformada de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizada por que pertenece al género *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Mucor* o *Penicillium*.
17. Procedimiento para la producción de fitasa, caracterizado por que se cultiva una célula hospedadora transformada de acuerdo con la reivindicación 15 ó 16 en condiciones que fomentan la formación de fitasa, y se aísla la fitasa así producida.
- 15 18. Composición, que comprende un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, eventualmente junto con otros coadyuvantes y/o sustancias activas.
- 20 19. Composición de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizada por que la composición es una composición de alimento o de alimento para animales o un agente de panificación.
- 25 20. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 18 ó 19 para la producción de un preparado destinado a la mejora del aprovechamiento de fosfato a partir de la nutrición en animales y seres humanos o para la mejora de las propiedades reológicas de masas de panificación destinadas a la producción de productos de panificación.
- 30 21. Uso de una variación de la secuencia de la fitasa de *E. coli* madura de tipo salvaje, que comprende la mutación lisina → ácido aspártico en la posición 74 (K74D) para la producción de una molécula de ADN recombinante que, después de su expresión en una célula hospedadora procariótica o eucariótica, codifica un polipéptido con una actividad de fitasa, que posee unas estabilidades térmica y frente a proteasas incrementadas.
- 35 22. Uso de acuerdo con la reivindicación 21, caracterizado por que el uso tiene lugar junto con las variaciones L145I y L198I.
23. Uso de acuerdo con la reivindicación 22, caracterizado por que el uso tiene lugar junto con la variación V200P.
24. Uso de acuerdo con la reivindicación 22, caracterizado por que el uso tiene lugar junto con la variación de la adición N-terminal de la secuencia FSYGAAIPQS TQEKQFSQEF RDGYSILKHY GGNGPYSERV SYGIARDPPTS y/o la variación de la adición C-terminal de la secuencia LSFWWNYNTT TELNYRSSPI ACQEGDAMD.

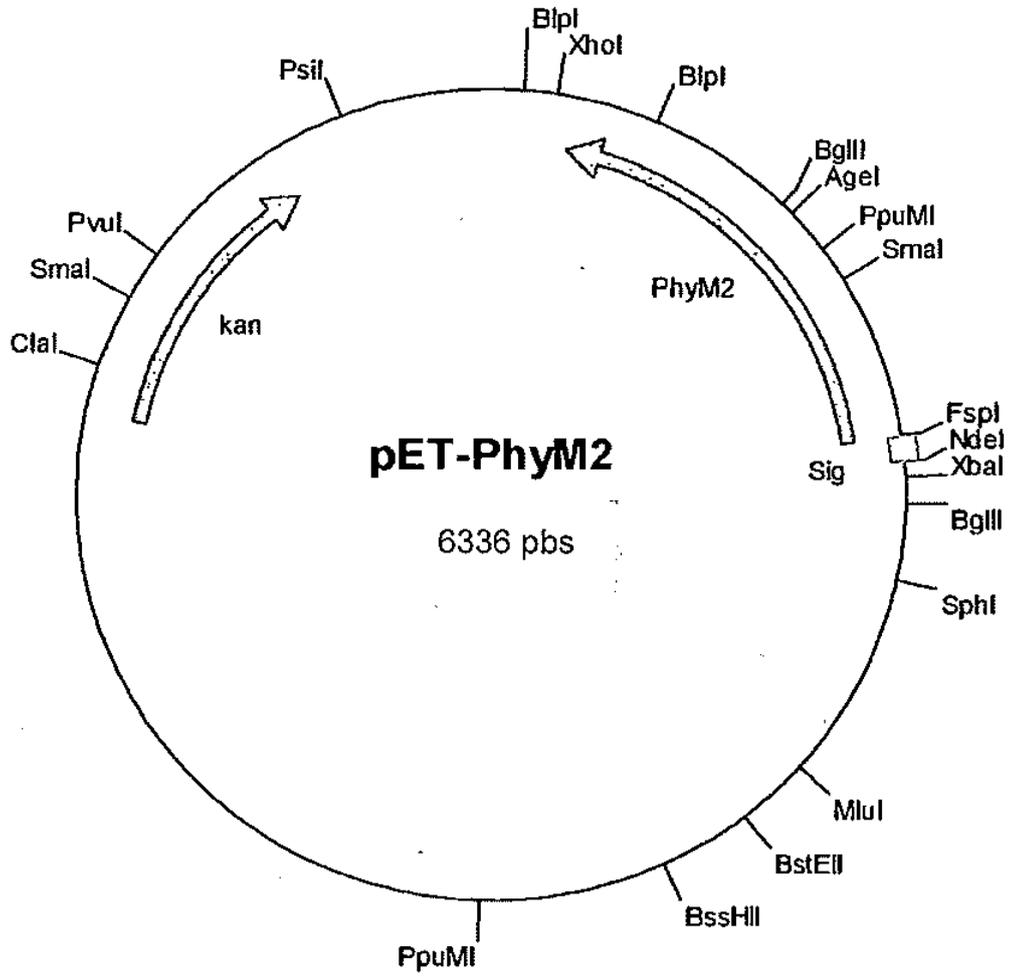


Fig.: 1

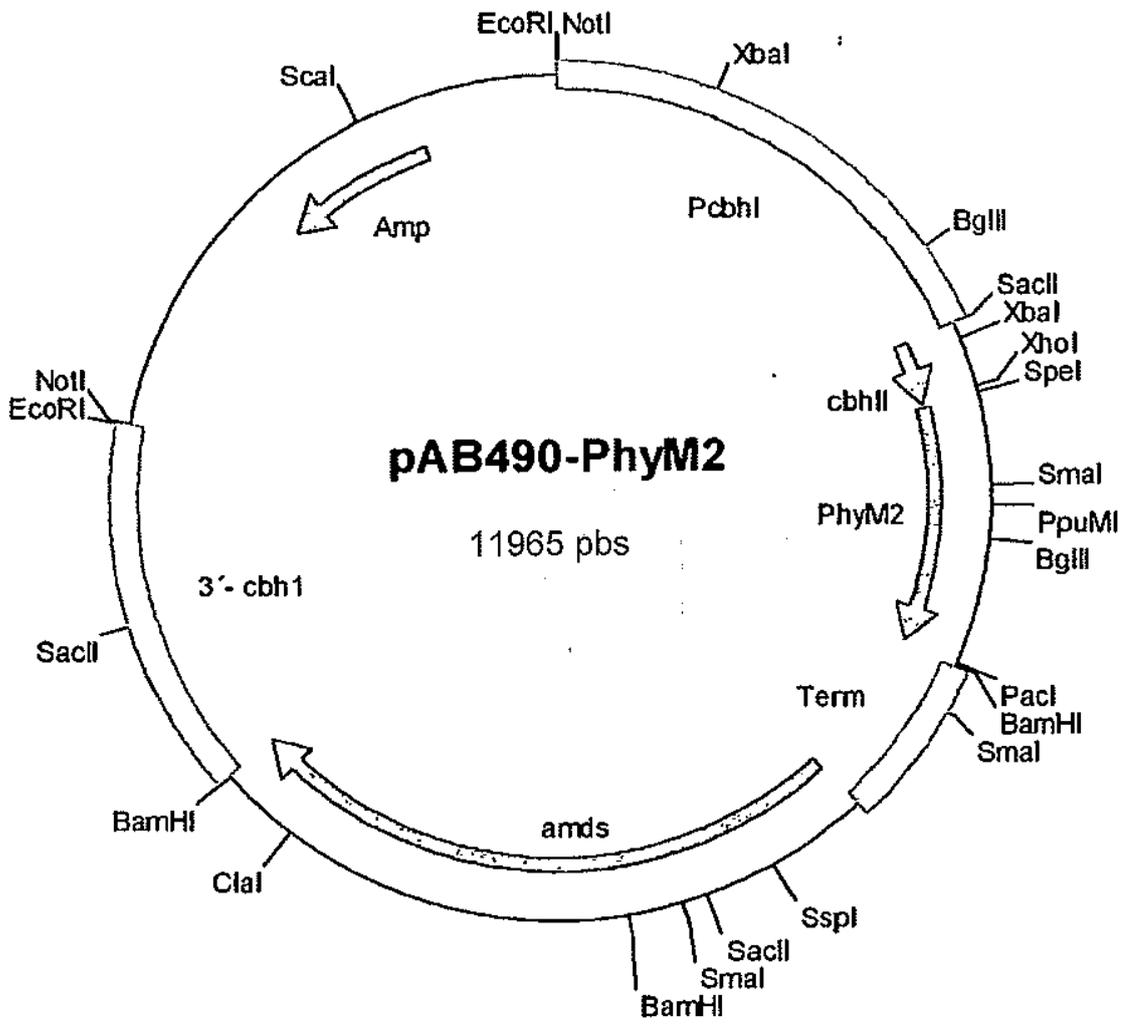


Fig.: 2

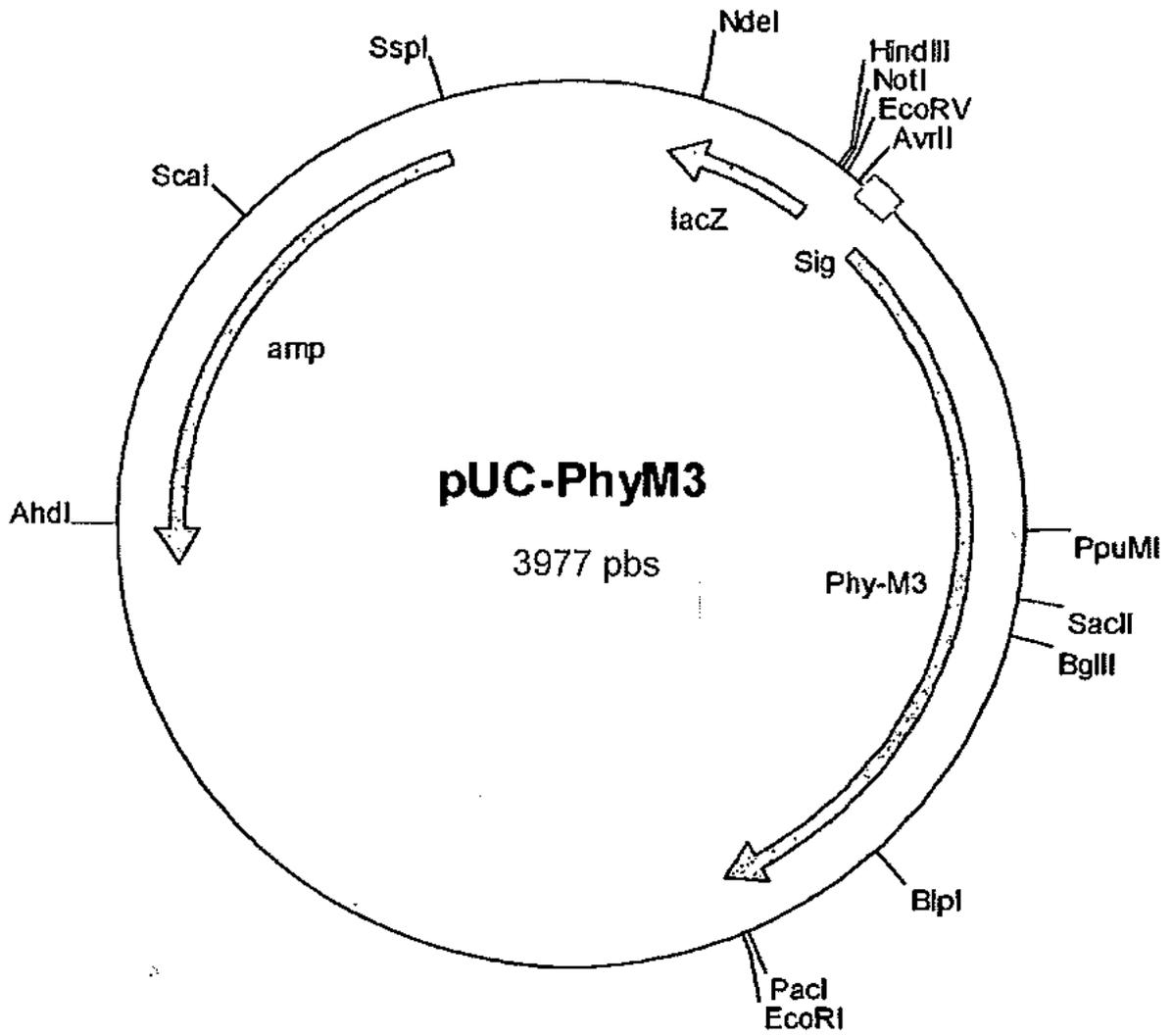


Fig.: 3

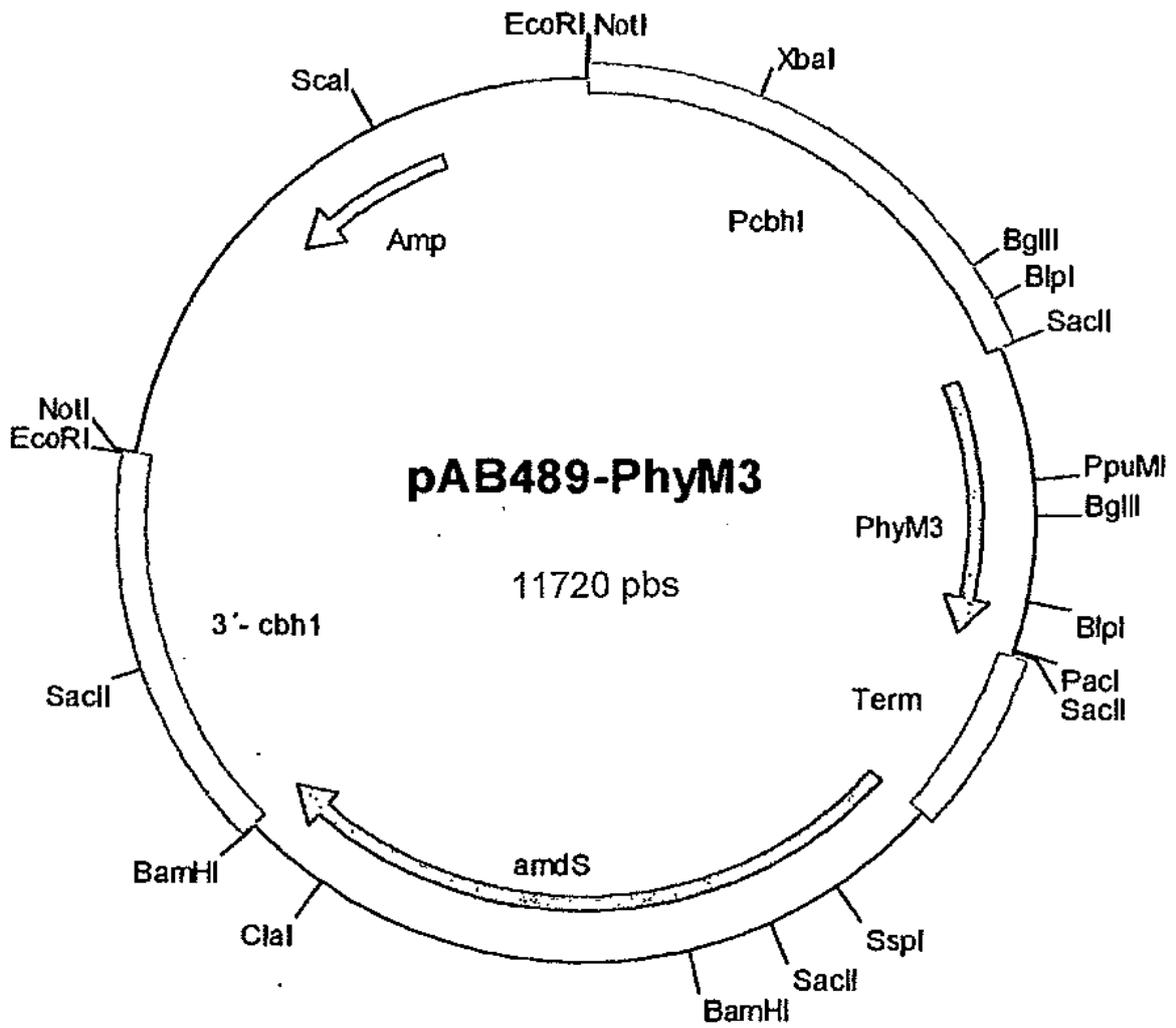


Fig.: 4

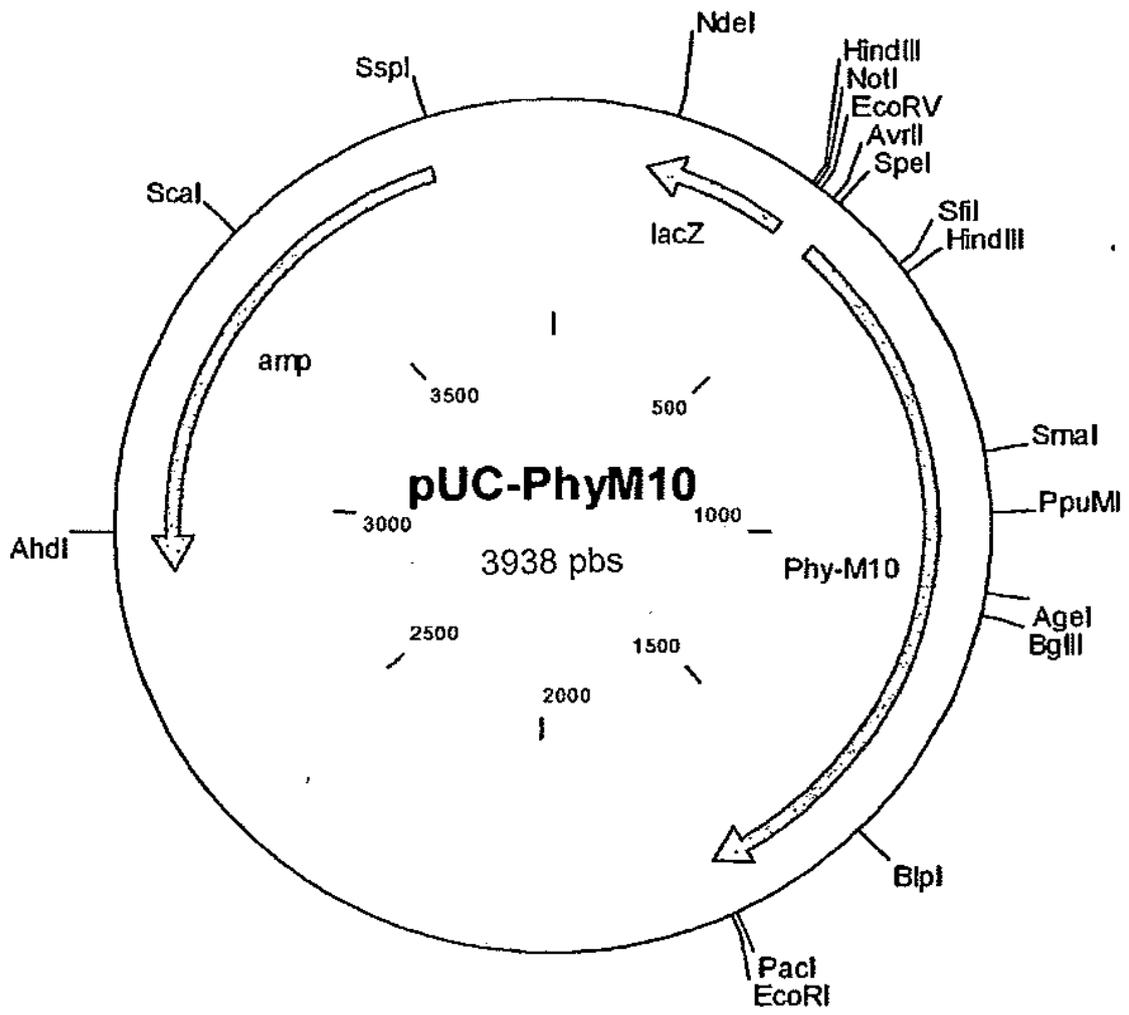


Fig.: 5

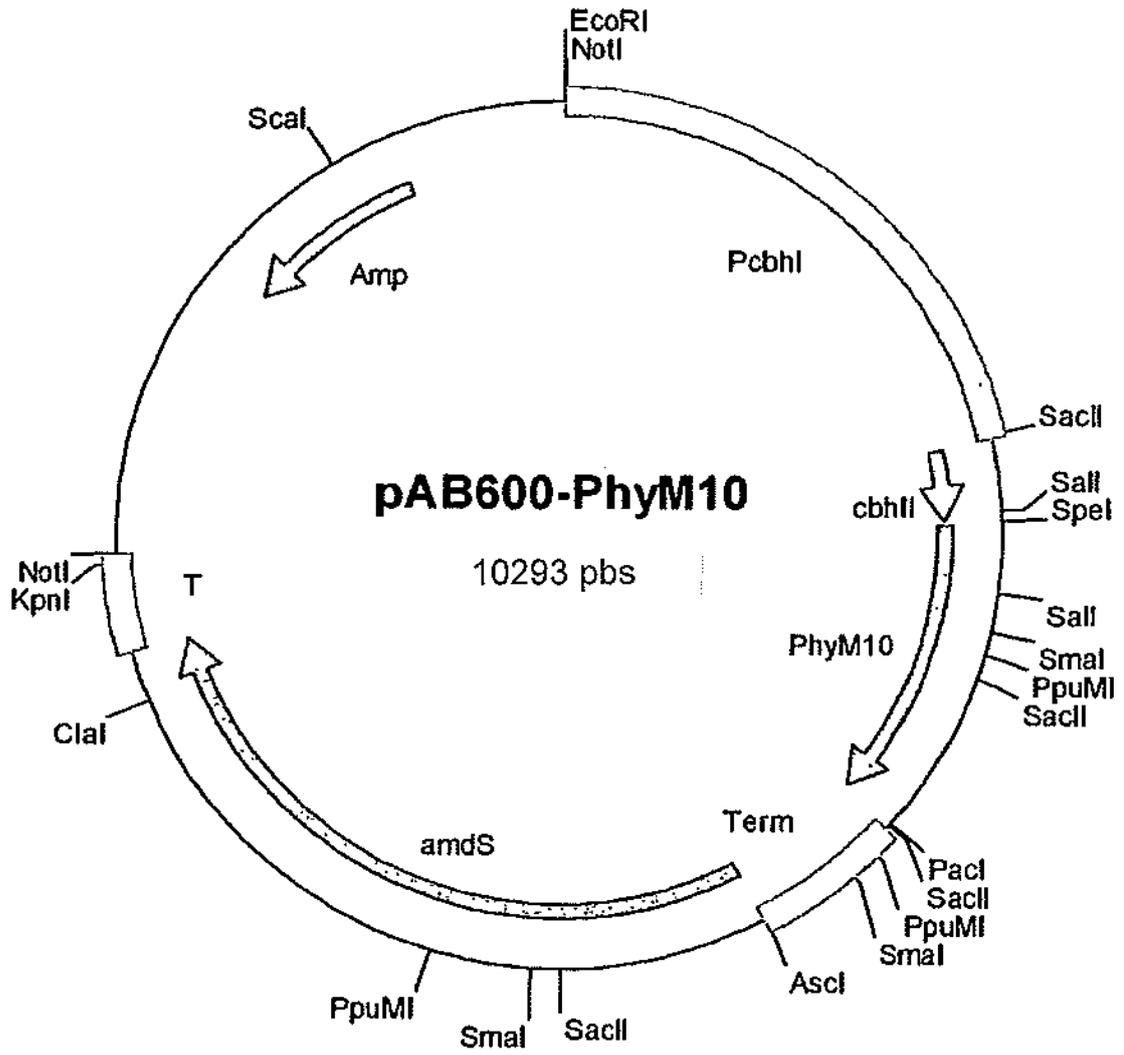


Fig.: 6

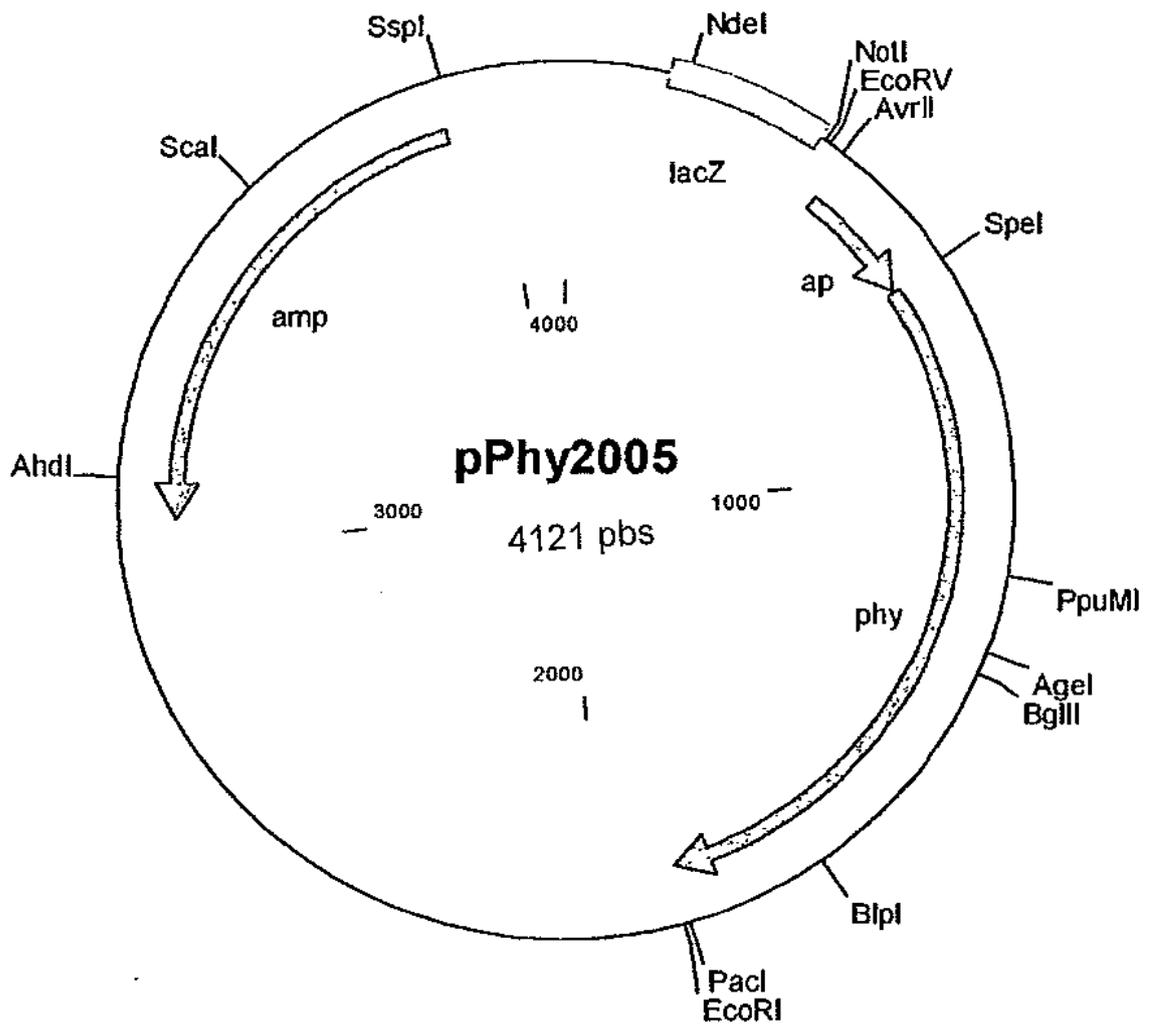


Fig.: 7

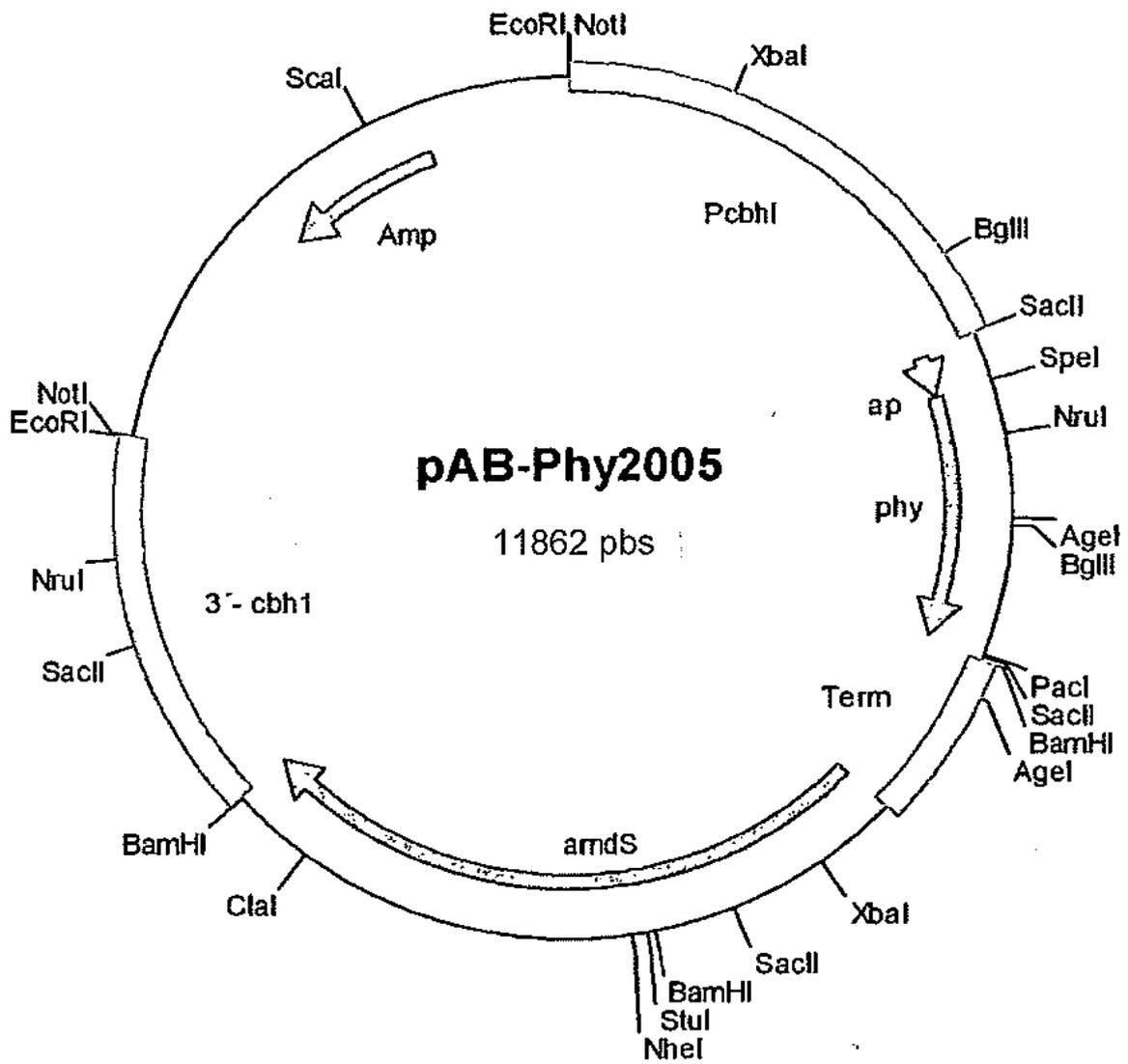


Fig.: 8

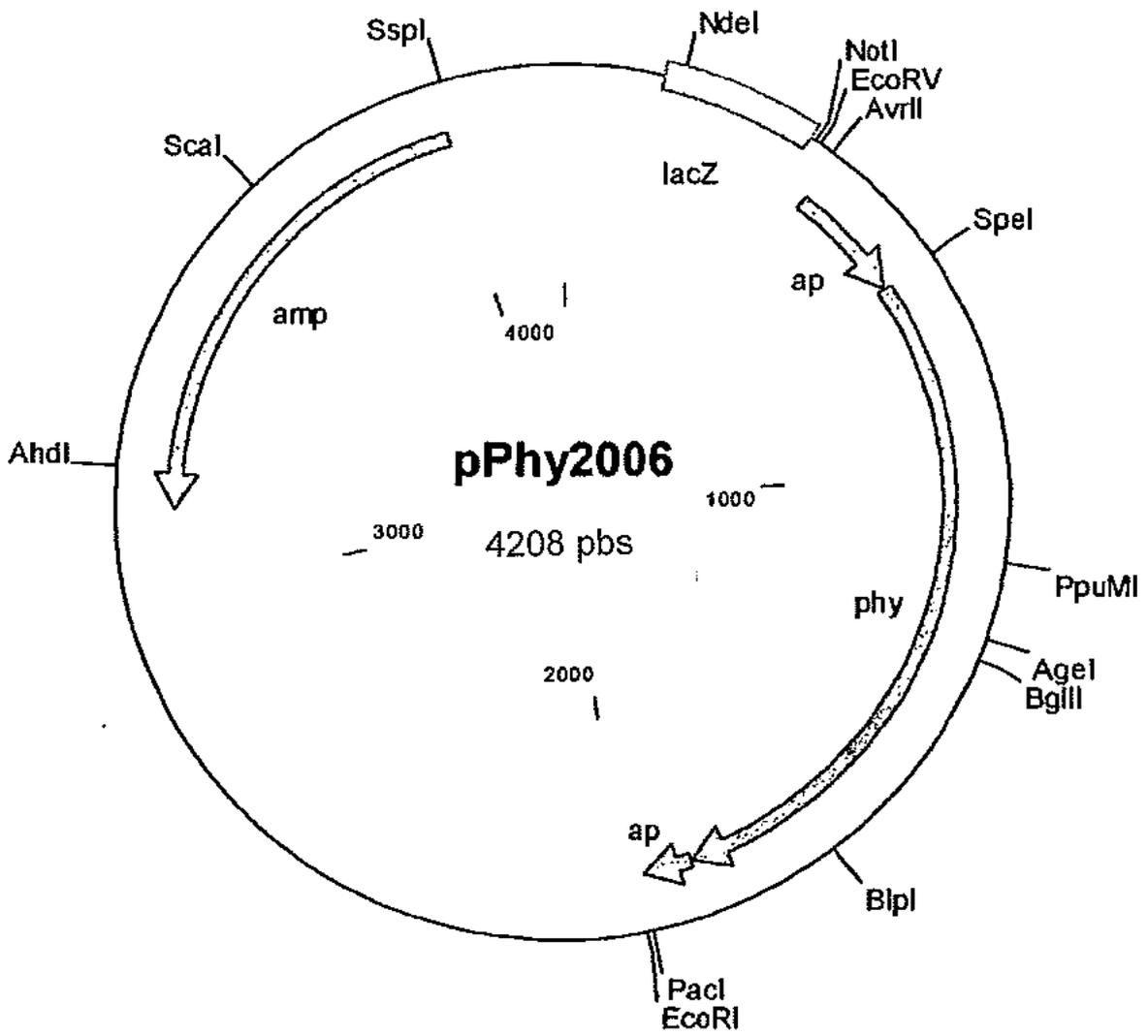


Fig.: 9

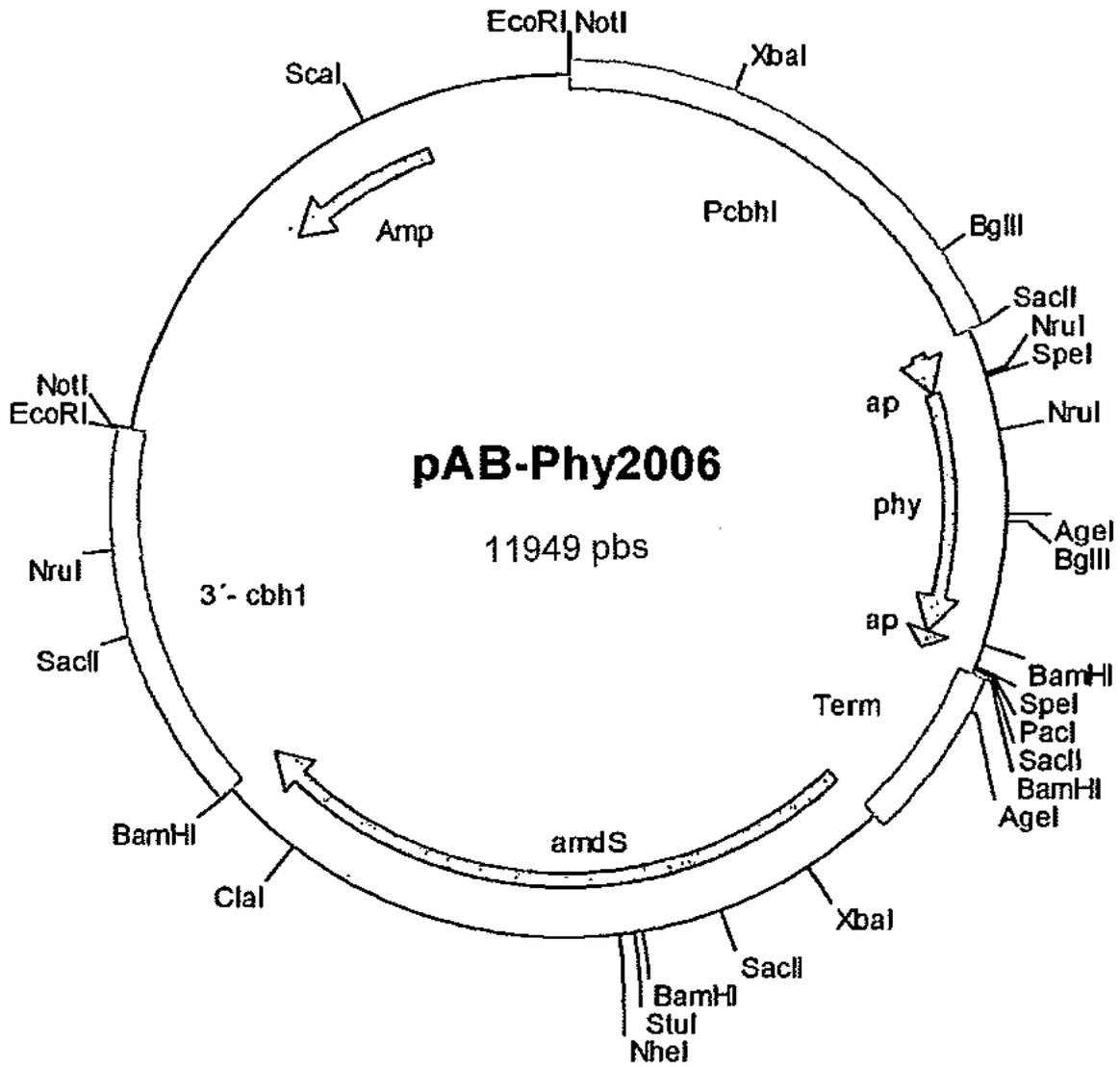


Fig.: 10

WT	QSEPELKLES	VVIVSRHGVR	APTKATQLMQ	DVTFDAWPTW	40					
PhyM1	-----	-----	-----	-----	40					
PhyM2	-----	-----	-----	-----	40					
PhyM3	-----	-----	-----	-----	40					
PhyM7	-----	-----	-----	-----	40					
PhyM9	-----	-----	-----	-----	40					
PhyM10	-----	-----	-----	-----	40					
Phy2005	FSYGAAIPQS	TQEKQFSQEF	RDGYSILKHY	GGNGPYSERV	SYGIARDPPTS	87				
Phy2006	FSYGAAIPQS	TQEKQFSQEF	RDGYSILKHY	GGNGPYSERV	SYGIARDPPTS	87				
WT	PVKLGWLTPR	GGELIAYLGH	YQRQRIVADG	LLAKKGPQS	GQVAIIADVD	ERTRKTGEAF	AAGLAPDCAI	TVHTQADTSS	PDFLNFPLKT	130
PhyM1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	130
PhyM2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	130
PhyM3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	130
PhyM7	-----	-----	-----	D-----	-----	-----	-----	-----	-----	130
PhyM9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	130
PhyM10	-----	-----	-----	D-----	-----	-----	-----	-----	-----	130
Phy2005	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	177
Phy2006	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	177
WT	GVCQIDNANV	TDALLSRAGG	SIADFTGHRQ	TAFRELERVL	NFQSNLCLK	REKQDESCSL	TOALPSELKV	SADNVSLTGA	VSLASMLTEI	220
PhyM1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	220
PhyM2	-----R-	E-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	220
PhyM3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	220
PhyM7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	220
PhyM9	-----	I-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	220
PhyM10	-----R-	E-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	220
Phy2005	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	267
Phy2006	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	267

Fig.: 11A

WT	FLLOQAQGM	EPGWGRITDS	HQWNTLLSLH	NAQFYLLQRT	PEVARSRATP	LLDLIKTALT	PHFPQQAAYG	VTLFTSVLFI	AGHDTNLANL	310
PhyM1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	310
PhyM2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	310
PhyM3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	310
PhyM7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	310
PhyM9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	310
PhyM10	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	310
Phy2005	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	310
Phy2006	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	357
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	357
WT	GGALELNWTL	PGQPDNTPPG	GELVFERWRR	LSDNSQWIQV	SLVFQTLQQM	RDKTPLSLNT	PGEVKLTLA	GCEERNAQGM	CSLAGFTQIV	400
PhyM1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	400
PhyM2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	400
PhyM3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	400
PhyM7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	400
PhyM9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	400
PhyM10	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	400
Phy2005	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	400
Phy2006	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	447
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	447
WT	NEARIPACSL									410
PhyM1	-----									410
PhyM2	-----									410
PhyM3	-----									410
PhyM7	-----									410
PhyM9	-----									410
PhyM10	-----									410
Phy2005	-----									410
Phy2006	-----									457
	-----	-----LSFWNYNTT	TELNYRSSPI	ACQEGDAMD						486

Fig. 11B