

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 491 867**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/06** (2006.01)

**C12N 9/16** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

**C07H 21/02** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2002 E 02802467 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 1438417**

54 Título: **Enzimas fitasa, secuencias de ácido nucleico que codifican enzimas fitasa y vectores y células huésped que incorporan las mismas**

30 Prioridad:

**26.10.2001 US 339552 P**

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

**08.09.2014**

73 Titular/es:

**DANISCO US INC. (100.0%)  
925 Page Mill Road  
Palo Alto, CA 94304, US**

72 Inventor/es:

**BOWER, BENJAMIN;  
CLARKSON, KATHLEEN A.;  
GOEDEGEBUUR, FRITS y  
POWER, SCOTT D.**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

**ES 2 491 867 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**

Enzimas fitasa, secuencias de ácido nucleico que codifican enzimas fitasa y vectores y células huésped que incorporan las mismas

**CAMPO DE LA INVENCION**

- 5 **[0001]** La presente invención hace referencia a la fitasa, secuencias de ácido nucleico que codifican fitasa, así como la producción de fitasa y su uso.

**REFERENCIAS****[0002]**

- al-Batshan et al., Poultry Science 73(10):1590-1596 (1994).
- 10 Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.
- 15 Aplin y Wriston, Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).
- ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Capítulos 2, 3, 6 y 7, Ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook.
- Ausubel et al. (eds.) (1995) Current Protocols In Molecular Biology ,3ª edición, John Wiley & Sons, Inc.
- Baker et al., Patente estadounidense nº 5.571.706 (1996).
- 20 Beaucage et al. (1993) Tetrahedron 49(10):1925. Benner, Steven A., Patente estadounidense nº 5.216.141 (1993).
- Bennett & Lasure, More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press, San Diego, pp. 70-76 (1991).
- Benton, W. y Davis, R., 1977, Science 196:180. Berger y Kimmel, (1987), Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA.
- 25 Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979). Nucleic Acids Research 7: 1513-23.
- Botstein, D. y Shortle, D. (1985) Science 229:1193-1201.
- Bowen et al., Patente estadounidense nº 5.736.369 (1998).
- Bremel et al., Patente estadounidense nº 6.291.740 (2001).
- Bremel et al., Patente estadounidense nº 6.080.912 (2000).
- 30 Brisson et al (1984) Nature 310:511-514.
- Briu et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:2321.
- Broglie et al (1984) Science 224:838-843.
- Cadwell, R.C. y Joyce, G.F., 1992, PCR Methods Applic. 2: 28-33.
- Canadian Journal of Animal Science 75(3):439-444 (1995).
- 35 Committee on Food Chemicals Codex, Institute of Medicine, Food Chemicals Codex, 4ª Edición, National Academy Press, Washington, DC, 1996.
- Carlsson et al., Nature 380:207 (1996).
- Clark, H. Fred, Patente estadounidense nº 5.610.049 (1997).
- Conklin et al., Patente estadounidense nº 5.750.386 (1998).
- 40 Cook et al., Patente estadounidense nº 5.637.684 (1997).
- Coruzzi et al (1984) EMBO J 3:1671-1680.
- Creighton, T.E. , Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)
- 45 Cromwell , G.L.T., T.S. Stahly, R.D. Coffey, H.J. Monegue, y J.H. Randolph. 1993. Efficacy of phytase in improving bioavailability of phosphorus in soybean and corn-soybean meal diets for pigs. J. Anim. Sci. 71:1831.
- Damron et al., Poultry Science 74(5):784-787 (1995).
- Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M. & Orcutt, B.C. (1978) "A model of evolutionary change in proteins." In "Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, suppl. 3." M.O. Dayhoff (ed.), pp. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC.
- 50 Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990).
- DeBoer et al, Patente estadounidense nº 6.066.725 (2000).
- De Clercq et al., Patente estadounidense nº 5.589.615 (1996).
- De Mesmaeker et al., Patente estadounidense nº 5.602.240 (1997).
- 55 De Mesmaeker et al., Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4:395 (1994).
- Denpcy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097 (1995).
- Devlin, Robert H., Patente estadounidense nº 5.998.697 (1999).

- Dieffenbach CW y Dveksler GS, 1995, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY.
- Eckert, K.A. y Kunkel, T.A., 1991, PCR Methods Applic. 1: 17-24.
- Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press. Edge et al.,  
5 Anal. Biochem., 118:131 (1981).
- Egholm (1992) J. Am. Chem. Soc. 114:1895.
- Ehrlich, K. C., Montalbano, B. G., Mullaney, E. J., Dischinger Jnr., H. C. & Ullah, A. H. J. (1993).  
Identification and cloning of a second phytase gene (phy B) from *Aspergillus niger* (ficum). Biochemical and  
Biophysical Research Communications 195, 53-57.
- 10 Elander, R.P., Microbial screening, Selection and Strain Improvement, in Basic Biotechnology, J. Bullock  
y B. Kristiansen Eds., Academic Press, Nueva York, 1987, 217.
- Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985).
- Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988).
- Finkelstein, DB 1992 Transformation. In Biotechnology of Filamentous Fungi. Technology and Products  
15 (eds by Finkelstein & Bill) 113-156.
- Fiske, C.H. y SubbaRow, Y. (1925). Journal of Biological Chemistry 66:375-392.
- Fungaro et al. (1995) Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojection bombardment on intact  
conidia, FEMS Microbiology Letters 125 293-298.
- Gelvin et al., J. Bacteriol. 172(3):1600-1608 (1990).
- 20 Gish, W. & States, D.J. (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search."  
Nature Genet. 3:266-272.
- Glover, DM y Hames, BD (Eds.), DNA Cloning: A Practical Approach, Vols 1 y 2, Segunda Edición.
- Glover, DM y Hames, BD (Eds.), 1995, DNA Cloning 1: A Practical Approach, Oxford University Press,  
Oxford).
- 25 Glover, DM y Hames, BD (Eds.), 1995, DNA Cloning 2: A Practical Approach, Oxford University Press,  
Oxford).
- Groot et al. (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi, Nature  
Biotechnology 16 839-842.
- Grunstein, M. y Hogness, D., 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3961.
- 30 Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987).
- Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991).
- Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989).
- Hershey et al., Patente estadounidense nº 5.268.526 (1993).
- Higgins D.G., Bleasby A.J., Fuchs R. (1992) CLUSTAL V: improved software for multiple sequence  
35 alignment. Comput. Appl. Biosci. 8:189-191.
- Hobbs S or Murry LE (1992) in McGraw Hill Yearbook of Science and Technology , McGraw Hill, Nueva  
York, N.Y., pp 191-196.
- Hodges et al., Patente estadounidense nº 5.677.175 (1997).
- Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988).
- 40 Houdebine et al., Patente estadounidense nº 6.268.545 (2001).
- Jaynes et al., Patente estadounidense nº 5.597.945 (1997).
- Jefferies et al., J. Biomolecular NMR 34:17 (1994).
- Jenkins et al., Chem. Soc. Rev. (1995) pp169-176.
- Jeroch et al., Bodenkultur Vo. 45(4):361-368 (1994).
- 45 Karatzas et al., Patente estadounidense nº 5.907.080 (1999).
- Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5783-5787 (1993).
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., Apajalahti, J. (1988) Isolation, characterization and  
molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Micro., 64,  
6, 2079-2085.
- 50 Kiedrowski et al., Angew. Chem. Intl. Ed. English 30:423 (1991).
- Kornegay, E.T., D.M. Denbow, Z. Yi., y V. Ravindran. 1996. Response of broilers to graded levels of  
Natuphosâ phytase added to corn-soybean meal-based diets containing three levels of nonphytate  
phosphorus. Br. J. Nutr.
- Lebrun et al., Patente estadounidense nº 5.510.471 (1996).
- 55 Letsinger, J. Org. Chem. 35:3800 (1970).
- Letsinger et al., Nucleoside & Nucleotide 13:1597 (1994).
- Letsinger et al. (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:4470.
- Letsinger et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14:3487.
- Leung, D.W., Chen, E., y Goeddel, D.V., 1989, Technique 1: 11-15.
- 60 Lubon et al., Patente estadounidense nº 6.262.336 (2001).
- Lundquist et al., Patente estadounidense nº 5.780.708 (1998).
- Lundquist et al., Patente estadounidense nº 5.538.880 (1996);
- Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990).

- Madden, T.L., Tatusov, R.L. & Zhang, J. (1996) "Applications of network BLAST server" *Meth. Enzymol.* 266:131-141.
- Mag et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437.
- Martin et al., *Science*, 255:192-194 (1992).
- 5 Meier et al. (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008. The Merck Veterinary Manual (Séptima Edición, Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., EE.UU., 1991, pág. 1268).
- Myers, R.M., Lerman, L.S., y Maniatis, T., 1985, *Science* 229: 242-247.
- Mitchell, D.B., Vogel, K., Weimann, B.J., Pasamontes, L. y van Loon, A.P., *Microbiology* 143 (Pt 1), 245-252 (1997)).
- 10 Moloney et al., Patente estadounidense nº 5.750.871(1998).
- Mullis, Kary B., Patente estadounidense nº 4.683.202 (1990).
- Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970).
- Nielsen (1993) *Nature*, 365:566.
- Oakley et al., *Gene* 61(3): 385-99 (1987).
- 15 Paborsky et al., *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990).
- Pasamontes, L., Haiker, M., Henriquez-Huecas, M., Mitchell, D.B. y van Loon, A.P., Cloning of the phytases from *Emericella nidulans* and the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta* 1353 (3), 217-223 (1997).
- Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M. y van Loon, A.P., Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (5), 1696-1700 (1997).
- 20 Pauwels et al. (1986) *Chemica Scripta* 26:141.
- Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988).
- Piedrahita et al., Patente estadounidense nº 6.271.436 (2001). Piddington, C. S., Houston, C. S., Paloheimo, M., Cantrell, M., Miettinen-Oinonen, A., Nevalainen, H. & Rambosek, J. (1993). The cloning and sequencing of the genes encoding phytase (PhyA) and pH 2.5- optimum acid phosphatase (aph) from *Aspergillus niger* var. *awamori*. *Gene* 133, 55-62.
- 25 Powar, V.K. y Jagannathan V., (1982) *J. Bacteriology*, 151 (3), 1102-1108.
- Rawls, C & E News Junio 2, 1997 pág. 35.
- 30 Roland et al., *Poultry Science*, 75(1):62-68 (1996). Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2ª Ed. Cold Spring Harbour Press.
- Sambrook et al. (2001). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Sanchez, O. y J. Aguirre. 1996. Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genetics Newsletter* 43: 48-51.
- 35 Sanger, F., Nilken, S. y Coulson, A.R. (1977). *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.
- Sanghvi et al. Patente estadounidense nº 5.386.023 (1995)
- Sawai et al. (1984) *Chem. Lett.* 805.
- Schwartz, R.M. & Dayhoff, M.O. (1978) "Matrices for detecting distant relationships." In "Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, suppl. 3." M.O. Dayhoff (ed.), pp. 353-358, *Natl. Biomed. Res. Found.*, Washington, DC.
- 40 Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982).
- Shimizu, M., (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(8), 1266-1269.
- Shimizu, M., solicitud de patente japonesa 6-38745 (1994).
- 45 Singleton, et al., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 2ª ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994).
- Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991).
- Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981).
- Somers et al., Patente estadounidense nº 5.773.269 (1998).
- 50 Sprinzl et al. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81:579.
- Summerton et al., Patente estadounidense nº 5.235.033 (1993).
- Summerton et al., Patente estadounidense nº 5.034.506 (1991).
- Takamatsu et al (1987) *EMBO J* 6:307-311.
- Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).
- 55 T'so et al., Patente estadounidense nº 4.469.863 (1984).
- Ullah, H.J. y Gibson, D.M., *Preparative Biochemistry*, 17 (1) (1987), 63-91.
- van Gorcom, Robert Franciscus Maria; van Hartingsveldt, Willem; van Paridon, Peter Andreas; Veenstra, Annemarie Eveline; Luiten, Rudolf Gijsbertus Marie; Selten, Gerardus Cornelis Maria; EP 420 358 (1991).
- 60 van Hartingsveldt, W., van Zeijl, C. M. J., Harteveld, G. M., Gouka, R. J., Suykerbuyk, M. E. G., Luiten, R. G. M., van Paridon, P. A., Selten, C. G. M., Veenstra, A. E., van Gorcom, R. F. M. & van den Hondel, C. A. J. J. (1993). Cloning, characterization and over expression of the phytase-encoding gene (PhyA) of *Aspergillus niger*. *Gene* 127:87-94.

- Van Loon, A. y Mitchell, D.; EP 684 313 (1995).  
 Weber, K. L. et al., *Biotechniques* 25(3): 415-9 (1998).  
 Weidner, G., d'Enfert, C., Koch, A., Mol, P., y Brakhage, A.A. (1998) Development of a homologous transformation system for the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* based on the pyrG gene encoding orotidine monophosphate decarboxylase. *Current Genet.* 33: 378-385.  
 Weissbach y Weissbach (1988) *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, Nueva York, N.Y., pp 421-463.  
 Wheeler, Mathew B., Patente estadounidense nº 5.942.435 (1999).  
 Winter J y Sinibaldi RM (1991) *Results Probl Cell Differ* 17:85-105.  
 Yau, Eric K., Patente estadounidense nº 5.644.048 (1997).  
 Yamada et al., *Agr. Biol. Chem.*, 32 (10) (1968), 1275-1282.

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- [0003] El fósforo (P) es un elemento esencial para el crecimiento. Una cantidad sustancial del fósforo encontrado en el alimento para ganado convencional, p.ej., granos de cereal, harina de semillas oleaginosas y subproductos que se originan a partir de semillas, se encuentra en forma de fosfato que está unido covalentemente en una molécula conocida como fitato (mio-inositol hexaquisfosfato). La biodisponibilidad de fósforo en esta forma es generalmente bastante baja para no rumiantes, como aves de corral y cerdos, porque carecen de enzimas digestivas para separar el fósforo de la molécula de fitato.
- [0004] Pueden observarse diversas consecuencias importantes de la incapacidad de los no rumiantes de utilizar el fitato. Por ejemplo, se incurre en gastos cuando se añade fósforo inorgánico (p.ej., fosfato dicálcico, fosfato defluorado) o productos animales (p.ej., harina de carnes y huesos, harina de pescado) para cumplir las requisitos nutricionales de fósforo de los animales. Además, el fitato puede unirse o quelar una variedad de minerales (p.ej., calcio, zinc, hierro, magnesio, cobre) en el tracto gastrointestinal, dejándolos inaccesibles para la absorción. Además, la mayoría del fitato presente en la alimentación pasa a través del tracto gastrointestinal, elevando la cantidad de fósforo en el estiércol. Esto lleva a una carga de fósforo ecológica aumentada en el medio ambiente.
- [0005] Los rumiantes, como el ganado, por el contrario, utilizan fácilmente el fitato gracias a una enzima producida por los microorganismos ruminales conocida como fitasa. La fitasa cataliza la hidrólisis de fitato a (1) mio-inositol y/o (2) mono-, di-, tri-, tetra- y/o penta-fosfatos del mismo y (3) fosfato inorgánico. Se conocen dos tipos diferentes de fitasas: (1) una llamada 3-fitasa (mio-inositol hexafosfato 3-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.8) y (2) una llamada 6-fitasa (mio-inositol hexafosfato 6-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.26). La 3-fitasa hidroliza preferentemente primero el enlace éster en la posición 3, mientras que la 6-fitasa hidroliza preferentemente primero el enlace éster en la posición 6.
- [0006] La fitasa microbiana, como aditivo para alimentación animal, se ha descubierto que mejora la biodisponibilidad de fósforo fitato en la dieta típica de los no rumiantes (véase, p.ej., Cromwell, et al, 1993). El resultado es una necesidad reducida de añadir fósforo inorgánico en el pienso animal, así como niveles de fósforo más bajos en el estiércol excretado (véase, p.ej., Kormegay, et al, 1996).
- [0007] A pesar de tales ventajas, pocas de las fitasas conocidas han logrado una aceptación extendida en la industria de piensos. La razón de esto varía de enzima a enzima. Las preocupaciones típicas están relacionadas con los altos costes de fabricación y/o pobre estabilidad/actividad de la enzima en el entorno de uso deseado (p.ej., el pH/temperatura encontrado en el procesamiento de piensos, o en el tubo digestivo de los animales).
- [0008] Generalmente, es deseable descubrir y desarrollar enzimas novedosas que tengan buena estabilidad y actividad de fitasa para su uso en conexión con el pienso animal y para aplicar los avances en tecnología de fermentación a la producción de dichas enzimas para hacerlas comercialmente viables. También es deseable determinar secuencias de nucleótidos que puedan usarse para producir organismos sometidos a ingeniería genética más eficientes capaces de expresar dichas fitasas en cantidades adecuadas para la producción industrial. Resulta aún más deseable desarrollar un sistema de expresión de fitasa mediante ingeniería genética que permita la purificación y utilización de cantidades de trabajo de enzimas relativamente puras.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

[0009] La presente invención proporciona una enzima purificada que tiene actividad de fitasa que se deriva de una fuente microbiana y preferiblemente de una fuente fúngica, como una especie *Penicillium*, p.ej., *P. chrysogenum* (depósito nº NRRL 1951).

[0010] Por consiguiente, en un aspecto la presente invención proporciona una enzima fitasa que incluye una

5 secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia de aminoácidos del 95% con una secuencia de aminoácidos expuesta en las Figuras 2, 3 o 19A-19C, donde la enzima fitasa es capaz de hidrolizar fitato para liberar fosfato inorgánico. En algunos modos de realización, la enzima fitasa de la reivindicación 1 que incluye una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de aminoácidos del 100% con una secuencia de aminoácidos expuesta en las Figuras 2, 3 o 19A-19C.

[0011] En otros aspectos, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima fitasa de la presente invención y construcciones y vectores de expresión que comprenden el polinucleótido que codifica las enzimas fitasa.

10 [0012] En otros aspectos, la presente invención proporciona una célula huésped transformada con el vector de la presente invención y un método de producción de una enzima que tenga actividad de fitasa, comprendiendo:

- (a) proporcionar una célula huésped transformada con una construcción de expresión como se define en la reivindicación 4;
- (b) cultivar dicha célula huésped transformada bajo condiciones adecuadas para que dicha célula huésped produzca dicha fitasa; y
- 15 (c) recuperar dicha fitasa.

[0013] Generalmente, la célula huésped es una especie *Aspergillus*.

[0014] En otro aspecto, la presente invención proporciona un alimento o pienso animal que incluye una enzima fitasa que tiene actividad de fitasa de la presente invención.

20 [0015] En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para separar fósforo de fitato, que comprende tratar dicho fitato con una enzima fitasa de la presente invención.

[0016] Otra ventaja de la presente invención es que, en virtud de la provisión de un polinucleótido que codifica una proteína que tiene actividad de fitasa, es posible producir, a través de medios recombinantes, una célula huésped que es capaz de producir la proteína que tiene actividad de fitasa en cantidades relativamente grandes.

25 [0017] Otra ventaja más de la presente invención es que se hace práctico el uso comercial de proteínas que presenten actividad de fitasa. Por ejemplo, la presente invención proporciona pienso animal que incorpora la fitasa aquí descrita.

[0018] Algunas de las siguientes figuras y descripción detallada pertenece a fitasas proporcionadas a modo de ejemplos de referencia.

### 30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

#### [0019]

La Figura 1 muestra una secuencia de ácido nucleico que corresponde a 1317 pares de bases de un gen que codifica una enzima hidrolizante fitasa derivada de *Penicillium chrysogenum*.

35 La Fig. 2 muestra una secuencia de aminoácidos de una enzima fitasa codificada por la secuencia de ácido nucleico de la Figura 1.

La Figura 3 muestra una secuencia de aminoácidos de una enzima fitasa quimérica madura, producida a través de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia señal de *Aspergillus*, unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima hidrolizante fitasa derivada de *Penicillium chrysogenum*.

40 La Figura 4 muestra una secuencia de ácido nucleico que corresponde a 1299 pares de bases de un gen que codifica una enzima hidrolizante fitasa derivada de *Fusarium javanicum*.

La Fig. 5 muestra una secuencia de aminoácidos de una enzima fitasa codificada por la secuencia de ácido nucleico de la Figura 4.

45 La Figura 6 muestra una secuencia de aminoácidos de una enzima fitasa quimérica madura, producida a través de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia señal de *Aspergillus*, unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima hidrolizante fitasa derivada de *Fusarium javanicum*.

La Figura 7 muestra una secuencia de ácido nucleico que corresponde a 224 pares de bases de un gen que codifica una enzima hidrolizante fitasa derivada de *Fusarium vertisillibodes*.

La Fig. 8 muestra una secuencia de aminoácidos de una enzima fitasa codificada por la secuencia de ácido nucleico de la Figura 7.

5 La Figura 9 muestra una secuencia de ácido nucleico que corresponde a 224 pares de bases de un gen que codifica una enzima hidrolizante fitasa derivada de *Humicola grisea*.

La Fig. 10 muestra una secuencia de aminoácidos de una enzima fitasa codificada por la secuencia de ácido nucleico de la Figura 9.

10 La Fig. 11 muestra una secuencia de aminoácidos de una enzima fitasa quimérica madura, producida a través de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia señal de *Aspergillus*, unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima hidrolizante fitasa derivada de *Humicola grisea*.

15 La Figura 12 muestra una secuencia de ácido nucleico que corresponde a 192 pares de bases de un fragmento de gen que codifica el extremo amino, incluyendo una secuencia señal, para una enzima hidrolizante fitasa derivada de *Aspergillus niger*. Esta secuencia incluye un codón de iniciación ATG en el extremo 50 y un intrón que se extiende desde los residuos 46 al 147.

La Fig. 13 muestra una secuencia de aminoácidos del extremo amino, que incluye una secuencia señal, de una enzima fitasa codificada por la secuencia de ácido nucleico de la Figura 12.

20 Las Figuras 14A-14D muestran alineaciones de secuencias de aminoácidos reveladas aquí con secuencias de aminoácidos publicadas de enzimas fitasa conocidas. La Figura 14A muestra una alineación GAP, como se describirá en mayor medida a continuación, de la secuencia de aminoácidos de una fitasa madura (es decir, que carece de la secuencia señal correspondiente a los aminoácidos 1-23) de *A. niger* (número de registro P34752, 444 aminoácidos; fila superior de cada par) y una fitasa derivada de *P. chrysogenum* (Figura 3, 446 aminoácidos; fila inferior de cada par). Las líneas rectas entre las secuencias alineadas indican residuos idénticos, los puntos entre las secuencias alineadas indican residuos similares. Las dos secuencias muestran una identidad del 65%, similitud del 70%.

30 La Figura 14B muestra una alineación BLAST (programa TBLASTN 2.0.5), como se describirá en mayor medida a continuación, de residuos 1-445 de la secuencia de aminoácidos de *P. chrysogenum* (P.c.) revelada en la Figura 3 y la secuencia de aminoácidos determinada a partir de los residuos de ácido nucleico 407 a 1732 de una secuencia de ADNc que codifica una fitasa de *Aspergillus fumigatus* (A.f.) (número de registro U59804). Las letras entre las secuencias alineadas indican residuos de aminoácidos idénticos, los símbolos más indican residuos similares. Estas porciones de las dos secuencias muestran una identidad del 62%, similitud del 75%.

35 La Figura 14C muestra una alineación BLAST de residuos 4-445 de la secuencia de aminoácidos de *P. chrysogenum* (P.c.) revelada en la Figura 3 y la secuencia de aminoácidos determinada a partir de los residuos de ácido nucleico 411 a 1730 de una secuencia de ADNc que codifica una fitasa de *Aspergillus terreus* (A.t.) (número de registro U60412). Estas porciones de las dos secuencias muestran una identidad del 60%, similitud del 73%.

40 La Figura 14D muestra una alineación BLAST de residuos 7-445 de la secuencia de aminoácidos de *P. chrysogenum* (P.c.) revelada en la Figura 3 y la secuencia de aminoácidos determinada a partir de los residuos de ácido nucleico 293 a 1594 de una secuencia de ADNc que codifica una fitasa de *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*; A.t.) (número de registro U59803). Estas porciones de las dos secuencias muestran una identidad del 60%, similitud del 75%.

45 Las Figuras 15A-15C muestran alineaciones de secuencias de aminoácidos reveladas aquí con secuencias de aminoácidos publicadas de enzimas fitasa conocidas. La Figura 15A muestra una alineación GAP de la secuencia de 444 aminoácidos de una fitasa madura de *A. niger* (número de registro P34752) y una secuencia de fitasa de 440 aminoácidos derivada de *F. javanicum* (revelada en Figura 6). Las dos secuencias muestran una identidad del 50%, similitud del 56%.

50 La Figura 15B muestra una alineación GAP de una secuencia de fitasa de 440 aminoácidos derivada de *F. javanicum* (revelada en la Figura 6) y la secuencia de 463 aminoácidos de una fitasa de *Emericella nidulans* (E.n.) (*Aspergillus nidulans*; número de registro U59803). Las dos secuencias muestran una identidad del 52%, similitud del 60%.

La Figura 15C muestra una alineación BLAST de residuos 7-438 de una secuencia de aminoácidos de fitasa de *F. javanicum* (F.j.) revelada en la Figura 6 y la secuencia de aminoácidos determinada a partir de los residuos de ácido nucleico 2379 a 3719 de una secuencia de ADNc que codifica una fitasa de *Myceliophthora thermophila* (M.t.) (número de registro U59806). Estas porciones de las dos secuencias muestran una identidad del 52%, similaridad del 68%.

Las Figuras 16A-16C muestran alineaciones de secuencias de aminoácidos reveladas aquí con secuencias de aminoácidos publicadas de enzimas fitasa conocidas. La Figura 16A muestra una alineación GAP de una secuencia de 487 aminoácidos de una fitasa de *M. thermophila* (número de registro U59806) y una secuencia de fitasa de 449 aminoácidos derivada de *H. grisea* (revelada en Figura 11). Las dos secuencias muestran una identidad del 66%, similaridad del 72%.

La Figura 16B muestra una alineación GAP de una secuencia de fitasa de 449 aminoácidos derivada de *H. grisea* (revelada en la Figura 11) y la secuencia de 444 aminoácidos de una fitasa madura de *A. niger* (número de registro P34752). Las dos secuencias muestran una identidad del 51%, similaridad del 59%.

La Figura 16C muestra una alineación BLAST de residuos 8-448 de una secuencia de aminoácidos de fitasa de *H. grisea* (H.g) revelada en la Figura 11 y la secuencia de aminoácidos determinada a partir de los residuos de ácido nucleico 2340 a 3722 de una secuencia de ADNc que codifica una fitasa de *Myceliophthora thermophila* (M.t.) (número de registro U59806). Estas porciones de las dos secuencias muestran una identidad del 65%, similaridad del 74%.

Las Figuras 17A y 17B muestran el ADN que codifica y secuencia de aminoácidos de una fitasa de *E. desertorum*. La Figura 17A muestra la secuencia de ADN genómico que codifica el gen para la fitasa. Las letras en minúscula representan un intrón putativo. La Figura 17B muestra la secuencia de aminoácidos putativa codificada por el gen de fitasa de *E. desertorum*.

Las Figuras 18A-18C muestran la secuencia de ADN genómica que codifica una fitasa de *F. javanicum*. La secuencia de aminoácidos putativa de la fitasa se indica bajo la secuencia de ADN. Se indica un intrón putativo bajo la secuencia de ADN por una línea horizontal. Las flechas con forma de caja bajo la secuencia de ADN indican secuencias de cebadores útiles para la amplificación del gen. Los sitios de restricción se indican encima de la secuencia en negrita.

Las Figuras 19A-19C muestran la secuencia de ADN genómica que codifica una fitasa de *P. chrysogenum*. La secuencia de aminoácidos putativa de la fitasa se indica bajo la secuencia de ADN. Se indica un intrón putativo bajo la secuencia de ADN mediante una caja horizontal. Las flechas con forma de caja bajo la secuencia de ADN indican secuencias de cebadores útiles para amplificar el gen. Se indican sitios de restricción bajo la secuencia en negrita.

Las Figuras 20A-20C muestran la secuencia de ADN genómica que codifica una fitasa de *H. grisea*. La secuencia de aminoácidos putativa de la fitasa se indica bajo la secuencia de ADN. Se indica un intrón putativo bajo la secuencia de ADN mediante una línea horizontal. Los sitios de restricción se indican encima de la secuencia en negrita.

La Figura 21 muestra una secuencia de ADN genómica parcial que codifica una fitasa de *F. vertisillibodes*. La secuencia de aminoácidos putativa de la fitasa se indica bajo la secuencia de ADN. Se indica un intrón putativo bajo la secuencia de ADN por una línea horizontal. Los sitios de restricción se indican encima de la secuencia en negrita.

La Figura 22 muestra la secuencia de ADN de un gen que codifica una fitasa de *E. desertorum* obtenida usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Se indica bajo la secuencia de ADN la secuencia de aminoácidos putativa de la fitasa. Las flechas bajo la secuencia de ADN indican secuencias de ligación (cebadores GSP1rev:fy037 y GSP2rev:fy036) usadas para obtener secuencias aguas arriba del gen (véase Fig. 17A).

La Figura 23 muestra la secuencia de ADN de un gen que codifica una fitasa de *F. javanicum* obtenida usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. La secuencia de aminoácidos putativa de la fitasa se indica bajo la secuencia de ADN. Las flechas bajo la secuencia de ADN indican secuencias de ligación (cebadores GSP1 rev:fy039 y GSP2rev:fy038) usadas para obtener secuencias aguas arriba del gen (véase Fig. 18A-18B).

La Figura 24 muestra resultados de expresión de la fitasa producida de manera recombinante aquí descrita. La Figura 24A muestra un gel de isoelectroenfoque (IEF) teñido con azul de Coomassie. Este gel muestra proteína presente en el sobrenadante de cultivos de *Aspergillus niger* que ha sido transformada con un

vector que codifica fitasa quimérica de *P. chrysogenum* (vías 5-8) y *F. javanicum* (vías 9-12), como se describe en los Ejemplos 3 y 4. Las células huésped transformadas se cultivaron en condiciones diseñadas para facilitar la expresión de las proteínas codificadas en el vector de expresión. En las vías 1-3 (como se marca) no hay nada. La vía 4 contiene caldo de fermentación de un *A. niger* transformado con el mismo vector según se usó para las fitasas de *F. javanicum* y *P. chrysogenum*, pero comprendiendo una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima fitasa de *A. niger* nativa. Las vías 5-8 contienen caldo de fermentación de cuatro clones diferentes transformados con vector que comprende la fitasa quimérica de *P. chrysogenum*, seleccionados por su actividad de fitasa aparente alta (vías 5 y 8), moderada (vía 7) y baja (vía 6), como se determina en un ensayo preliminar. Las vías 9-12 contienen caldo de fermentación de cuatro clones diferentes transformados con vector que comprende la fitasa quimérica de *F. javanicum*, seleccionados por su actividad de fitasa aparente alta (vía 11), moderada (vías 9 y 10) y baja (vía 12), como se determina en un ensayo preliminar. El gel teñido de Comassie indica bandas de proteína novedosa que corresponden a la actividad de fitasa, como se muestra en el zimograma descrito en la Figura 24B, para cada uno de los tipos de transformantes y ninguna de dichas bandas de proteínas novedosas para clones en los que no se da actividad.

La Figura 24B muestra un zimograma producido como una superposición del gel de IEF descrito en la Fig. 24A, realizado antes de la tinción del gel, mostrando la actividad de fosfatasa de las proteínas en el gel. El zimograma indica la actividad de fitasa asociada a las bandas teñidas de Comassie novedosas de los huéspedes transformados con fitasa quimérica.

## 20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### I. Definiciones

**[0020]** A menos que se defina lo contrario aquí, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que el comprendido comúnmente por aquellos expertos en la técnica a la que pertenece la invención. Singleton, et al., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 2ª Ed., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, NY (1991) ofrecen a los expertos un diccionario general de muchos de los términos usados en esta invención. Aunque se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a aquellos aquí descritos en la práctica o ensayos de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos. Los intervalos numéricos son inclusivos de los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de ácido nucleico se escriben de izquierda a derecha en una orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en una orientación de amino a carboxi, respectivamente. Los títulos proporcionados aquí no constituyen limitaciones de los diversos aspectos o modos de realización de la invención que pueden tenerse mediante referencia a la especificación en su conjunto. Por lo tanto, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen de manera más completa mediante referencia a la especificación en su conjunto.

**[0021]** "Proteína", según su uso aquí, incluye proteínas, polipéptidos y péptidos. Como apreciaran aquellos expertos en la técnica, las secuencias de ácido nucleico de la invención, como se definen a continuación y descritas en mayor medida aquí, pueden usarse para generar secuencias de proteínas.

**[0022]** Según su uso aquí, el término "fitasa" o "actividad de fitasa" hace referencia a una proteína o polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de fitato a (1) mio-inositol y/o (2) mono-, di-, tri-, tetra- y/o penta-fosfatos del mismo y (3) fosfato inorgánico. Por ejemplo, las enzimas que tienen actividad catalítica definidas en la Comisión de Enzimas EC número 3.1.3.8 o EC número 3.1.3.26.

**[0023]** En el sentido más amplio, "secuencia de ácido nucleico", "polinucleótido" o "oligonucleótido" o equivalentes gramaticales significan aquí al menos dos nucleótidos unidos de manera covalente el uno al otro. Una secuencia de ácido nucleico de la presente invención contendrá generalmente enlaces fosfodioéster, aunque en algunos casos, como se describe a continuación, se incluyen análogos de secuencia de ácido nucleico que pueden tener esqueletos alternativos, comprendiendo, por ejemplo, fosforamidato (Beaucage et al., *Tetrahedron* 49(10):1925 (1993) y las referencias que aparecen en él; Letsinger, *J. Org. Chem.* 35:3800 (1970); Sprinzl et al., *Eur. J. Biochem.* 81:579 (1977); Letsinger et al., *Nucl. Acids Res.* 14:3487 (1986); Sawai et al., *Chem. Lett.* 805 (1984); Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 (1988); y Pauwels et al., *Chemica Scripta* 26:141 91986)), fosforotioato (Mag et al., *Nucleic Acids Res.* 19:1437 (1991); y patente estadounidense nº 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al., *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321 (1989)), enlaces O-metilfosforoamidita (véase Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), y enlaces y esqueleto de ácido nucleico peptídico (véase Egholm, *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895 (1992); Meier et al., *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008 (1992); Nielsen, *Nature*, 365:566 (1993); Carlsson et al., *Nature* 380:207 (1996).

- [0024]** Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con esqueletos positivos (Denpcy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097 (1995); esqueletos no iónicos (patente estadounidense nº 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; Kiedrowshi et al., Angew. Chem. Intl. Ed. English 30:423 (1991); Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110:4470 (1988); Letsinger et al., Nucleoside & Nucleotide 13:1597 (1994); Capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook; Mesmaecker et al., Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4:395 (1994); Jeffs et al., J. Biomolecular NMR 34:17 (1994); Tetrahedron Lett. 37:743 (1996)) y esqueletos no de ribosa, incluyendo aquellos descritos en las patentes estadounidenses nº 5.235.033 y 5.034.506, y capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook. También se incluyen los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos en una definición de ácidos nucleicos (véase Jenkins et al., Chem. Soc. Rev. (1995) pp169-176). Se describen diversos análogos de ácido nucleico en Rawls, C & E News Junio 2, 1997 pág. 35. Estas modificaciones del esqueleto de ribosa-fosfato pueden hacerse por una variedad de razones, por ejemplo, para aumentar la estabilidad y vida media de dichas moléculas en entornos de procesamiento de alimento o fisiológicos.
- [0025]** Como apreciarán aquellos expertos en la técnica, todos estos análogos de ácido nucleico pueden encontrar uso en la presente invención. Además, pueden hacerse mezclas de análogos y ácidos nucleicos de origen natural; alternativamente, pueden hacerse mezclas de diferentes análogos de ácido nucleico y mezclas de ácidos nucleicos y análogos de origen natural.
- [0026]** Especialmente preferidos son los ácidos nucleicos peptídicos (PNA) que incluyen análogos de ácido nucleico peptídico. Estos esqueletos son sustancialmente no iónicos bajo condiciones neutras, a diferencia del esqueleto de fosfodiéster altamente cargado de ácidos nucleicos de origen natural. Esto resulta en dos ventajas. Primero, el esqueleto de PNA presenta cinética de hibridación mejorada. Los PNA tiene cambios más grandes en la temperatura de fusión (Tm) para pares de bases incorrectamente apareados frente a los perfectamente apareados. El ADN y ARN normalmente presenta una caída de 2-4°C en Tm para un apareamiento incorrecto interno. Con el esqueleto de PNA no iónico, la caída es más cercana a los 7-9°C. Del mismo modo, debido a su naturaleza no iónica, la hibridación de las bases unidas a estos esqueletos es relativamente insensible a la concentración de sal. Además, los PNA no se degradan por las enzimas celulares, y por tanto, pueden ser más estables.
- [0027]** Las secuencias de ácido nucleico pueden ser de una sola cadena o de doble cadena, como se especifica, o contener partes de secuencia de doble cadena o de una sola cadena. Como apreciarán aquellos expertos en la técnica, la representación de una sola cadena ("Watson") define también la secuencia de la otra cadena ("Crick"); por tanto, las secuencias descritas aquí incluyen también el complemento de la secuencia. La secuencia de ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN o un híbrido, donde la secuencia de ácido nucleico contiene cualquier combinación de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, y cualquier combinación de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc. Según su uso aquí, el término "nucleósido" incluye nucleótidos y análogos de nucleótidos y nucleósidos, y nucleósidos modificados como nucleósidos amino-modificados. Además, "nucleósido" incluye estructuras análogas de origen no natural. Por consiguiente, por ejemplo, las unidades individuales de una secuencia de ácido nucleico peptídico, conteniendo cada una una base, son denominadas aquí nucleósido.
- [0028]** El término "idéntico" en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o secuencias de polipéptido hace referencia a residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se aparean para máxima correspondencia, medido usando uno de los siguientes algoritmos de análisis o comparación de secuencia.
- [0029]** Una "alineación óptima" se define como una alineación que da la puntuación de porcentaje de identidad más alta. Dicha alineación puede llevarse a cabo usando una variedad de programas de análisis de secuencias disponibles en el mercado, como el programa de alineación local LALING que usa un ktup de 1, parámetros por defecto y PAM por defecto. Una alineación preferida es la alineación por pares llevada a cabo usando el programa CLUSTAL-W en MACVECTOR, operado en modo de alineación "lenta" usando los parámetros por defecto, incluyendo una penalización por hueco abierto de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,1, y una matriz de similaridad BLOSUM30. Si necesita insertarse un hueco en una primera secuencia para alinearla de manera óptima con una segunda secuencia, el porcentaje de identidad se calcula usando solo los residuos que están apareados con un residuo de aminoácido correspondiente (es decir, el cálculo no considera los residuos en las segundas secuencias que están en el "hueco" de la primera secuencia).
- [0030]** La alineación óptima de secuencias para la comparación también puede llevarse a cabo, p.ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante la búsqueda de método de similaridad de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software

Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual.

**[0031]** El "porcentaje de identidad de secuencia", con respecto a dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos, hace referencia al porcentaje de residuos que son idénticos en las dos secuencias cuando las secuencias se encuentran alineadas de manera óptima. Por tanto, una identidad de secuencias de aminoácidos del 80% significa que el 80% de los aminoácidos en las dos secuencias de polipéptidos alineadas de manera óptima son idénticas. Puede determinarse el porcentaje de identidad, por ejemplo, mediante una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas alineando las secuencias, contando el número exacto de coincidencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo por la longitud de la secuencia más corta y multiplicando el resultado por 100. Pueden usarse programas informáticos fácilmente disponibles para ayudar en el análisis, como ALIGN, Dayhoff, M.O. en "Atlas of Protein Sequence and Structure", M.O. Dayhoff ed.,\* 5 Suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Advances in Appl. Math.* 2:482-489 para el análisis de péptidos. Los programas para determinar la identidad de secuencias de nucleótidos se encuentran disponibles en Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 (disponible en Genetics Computer Group, Madison, WI) por ejemplo, los programas BESTFIT, FASTA y GAP, que también se basan en el algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas se utilizan fácilmente con los parámetros por defecto recomendados por los fabricantes y descritos en el Wisconsin Sequence Analysis Package al que se ha hecho referencia arriba.

**[0032]** Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul, et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). El software para llevar a cabo análisis BLAST se encuentra disponible de manera pública a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo conlleva identificar primero pares de secuencias con alta puntuación (HSPs, en inglés) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que bien coincidan o satisfagan alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinee con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. Estos aciertos o hits de palabras cercanas iniciales actúan como puntos de inicio para encontrar HSP más largas que las contengan. Estos hits de palabra se expanden en ambas direcciones a lo largo de cada una de las dos secuencias comparándose hasta donde la puntuación de alineación acumulativa pueda ser aumentada. La extensión de los hits de palabra para cuando: la puntuación de alineación acumulativa cae por la cantidad X desde un valor logrado máximo; la puntuación acumulativa es cero o inferior; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros de algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLAST usa como predeterminados una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M'5, N'-4, y una comparación de ambas cadenas.

**[0033]** El algoritmo BLAST lleva a cabo a continuación un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p.ej., Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico se considera similar a una secuencia de ácido nucleico de fitasa de esta invención si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación de la secuencia de ácidos nucleico de prueba a una secuencia de ácido nucleico de fitasa es menor de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01, y más preferiblemente menor de aproximadamente 0,001. Cuando la secuencia de ácido nucleico de prueba codifica un polipéptido de fitasa, se considera similar a una secuencia de ácidos nucleicos de fitasa específica si la comparación da como resultado una probabilidad de suma más pequeña menor de aproximadamente 0,5 y más preferiblemente menor de aproximadamente 0,2.

**[0034]** Por tanto, la expresión "sustancialmente idéntica" en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos significa normalmente que un polinucleótido o polipéptido comprende una secuencia que presenta al menos una identidad de secuencia del 60%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% y aún más preferiblemente al menos 95%, comparada con una secuencia de referencia usando los programas descritos arriba (p.ej., BLAST, ALIGN, CLUSTAL) usando parámetros estándares. Una indicación de que dos polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el primer polipéptido presenta reacción cruzada inmunológicamente con el segundo polipéptido. Normalmente, los polipéptidos que difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos presentan reacción cruzada inmunológicamente. Por lo tanto, un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando dos péptidos difieren solo por una sustitución conservadora. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones astringentes (p.ej., dentro de un margen de media a alta astringencia).

**[0035]** La "hibridación" incluye cualquier proceso por el que una cadena de una secuencia de ácido nucleico se

une a una segunda secuencia de ácido nucleico a través del apareamiento de bases. Por tanto, en sentido estricto, el término se refiere a la capacidad de una secuencia diana a unirse a una secuencia de prueba, o viceversa.

5 **[0036]** Las "condiciones de hibridación" se clasifican normalmente por el grado de "astringencia" de las condiciones en que se mide la hibridación. El grado de astringencia puede basarse, por ejemplo, en la temperatura de fusión (estimada) calculada ( $T_m$ ) del complejo de enlace de la secuencia de ácido nucleico o sonda. El cálculo de  $T_m$  se conoce bien en la técnica (véase, p.ej., pág. 9.50-9.51 de Sambrook (1989), a continuación). Por ejemplo, la "máxima astringencia" se produce a aproximadamente  $T_m - 5^\circ\text{C}$  ( $5^\circ$  por debajo de la  $T_m$  de la sonda); la "alta astringencia" a aproximadamente  $5-10^\circ$  por debajo de  $T_m$ ; la "astringencia intermedia" a 10 aproximadamente  $10-20^\circ$  por debajo de la  $T_m$  de la sonda; y la "astringencia baja" a aproximadamente  $20-25^\circ$  por debajo de la  $T_m$ . En general, las condiciones de hibridación se llevan a cabo en condiciones de alta fuerza iónica, por ejemplo, usando 6XSSC o 6XSSPE. En condiciones de alta astringencia, la hibridación se sigue por dos lavados con solución baja en sal, por ejemplo 0,5XSSC, a la temperatura calculada. En condiciones de astringencia media, la hibridación se sigue por dos lavados con solución con contenido en sal medio, por ejemplo, 2XSSC. En condiciones de baja astringencia, la hibridación es seguida por dos lavados con solución con alto contenido en sal, por ejemplo, 6XSSC. De manera operativa, las condiciones de máxima astringencia pueden usarse para identificar secuencias de ácido nucleico que tienen identidad estricta o casi estricta con la sonda de hibridación; mientras que las condiciones de alta astringencia se usan para identificar secuencias de ácido nucleico que presentan aproximadamente un 80% o más de identidad de secuencia con la sonda.

20 **[0037]** Para aplicaciones en las que se requiera elevada selectividad, se deseará normalmente emplear condiciones relativamente astringentes para formar híbridos, p.ej., se seleccionarán condiciones de temperatura relativamente altas. Las condiciones de hibridación, incluyendo la astringencia moderada y astringencia alta, se proporcionan en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Press (1989); Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (2001).

**[0038]** El término "complementario", en el contexto de una secuencia de ácido nucleico, significa una secuencia de ácido nucleico que tiene una relación de secuencia con una segunda secuencia de ácido nucleico de manera que existe una alineación perfecta de pares de bases de Watson-Crick a lo largo de la longitud completa de ambas secuencias de ácido nucleico.

30 **[0039]** El término "aislado" o "purificado" significa que un material se saca de su entorno original (p.ej., el entorno natural si ocurre de manera natural). Por ejemplo, se dice que el material está "purificado" cuando está presente en una composición concreta en una concentración más alta o más baja que la que existe en un organismo de tipo silvestre o de origen natural o en combinación con componentes que normalmente no están presentes en la expresión de un organismo de tipo silvestre o de origen natural. Por ejemplo, un polipéptido o polinucleótido de origen natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de algunos o todos sus materiales coexistentes en el sistema natural está aislado. Dichos polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o dichos polinucleótidos o polipéptidos podrían ser parte de una composición y aún así estar aislados en cuanto a que dicho vector o composición no es parte de su entorno natural. Una secuencia de ácido nucleico o proteína se dice que está purificada, por ejemplo, si da lugar esencialmente a una banda en un gel electroforético.

45 **[0040]** La presente invención facilita la producción de proteínas y ácidos nucleicos recombinantes. "Recombinante" y equivalentes gramaticales del mismo quiere decir producido usando tecnología recombinante, por medio de lo cual se hacen ácidos nucleicos (ácidos nucleicos recombinantes) y se producen proteínas de los mismos (proteínas recombinantes). Dichos métodos son bien conocidos en la técnica y muchos se describen de manera muy detallada aquí. En un sentido amplio, una secuencia de ácido nucleico recombinante puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico que no se encuentra en su forma de origen natural, tanto si es una secuencia aislada de su secuencia anexa de origen natural, o si está combinada con otras secuencias con las que no se une en la naturaleza para formar una secuencia de ácido nucleico nueva, como en un vector. Las secuencias de ácido nucleico recombinantes también incluyen aquellas que se producen a partir de secuencias de ácido nucleico recombinantes, por ejemplo, secuencias complementarias hechas a través de polimerización, copias adicionales hechas a través de replicación o ARN transcrito a partir de ADN recombinante. La proteína recombinante es proteína producida por traducción de secuencias de ácido nucleico recombinante.

55 **[0041]** Según su uso aquí, al referirse a enzimas hidrolizantes de fitato (fitasas), el término "derivado de" no pretende indicar solo una fitasa producida o producible por una cepa del organismo en cuestión, sino también una fitasa codificada por una secuencia de ADN aislada de dicha cepa y producida en un organismo huésped que contiene dicha secuencia de ADN. Además, el término pretende indicar una fitasa que es codificada por una secuencia de ADN de origen de ADNc y/o sintético y que tiene las características identificadoras de la fitasa en

cuestión. Para ejemplificar, las "fitasas derivadas de *Penicillium*" se refieren a aquellas enzimas que tienen actividad de fitasa que son producidas de manera natural por *Penicillium*, así como a las fitasas como aquellas producidas por fuentes de *Penicillium* pero que a través del uso de técnicas de ingeniería genética se producen por organismos que no son de *Penicillium* transformados con una secuencia de ácido nucleico que codifica dichas fitasas. La presente invención abarca enzimas hidrolizantes de fitato que son equivalentes a aquellas que se derivan de la cepa microbiana concreta mencionada. Ser "equivalente", en este contexto, significa que las enzimas hidrolizantes de fitato son codificadas por un polinucleótido capaz de hibridarse con el polinucleótido que tiene la secuencia mostrada en cualquiera de las Figuras 1, 4, 7 y 9 en condiciones de astringencia de media a alta. Ser equivalente significa que la enzima hidrolizante de fitato comprende al menos una identidad del 55%, preferiblemente al menos una identidad de al menos un 60%, más preferiblemente una identidad de al menos un 65%, y aún más preferiblemente una identidad de al menos un 70%, aún más preferiblemente una identidad de al menos un 75%, incluso más preferiblemente una identidad de al menos un 80%, de nuevo más preferiblemente una identidad de al menos un 85%, todavía más preferiblemente una identidad de al menos un 90%, y más preferiblemente al menos una identidad del 95% hasta aproximadamente un 100% con la enzima hidrolizante de fitato que tiene la secuencia de aminoácidos revelada en una de las Figuras 2, 3, 5, 6, 8, 10 y 11. La presente invención abarca también mutantes, variantes y derivados de las enzimas hidrolizantes de fitato de la presente invención siempre que el mutante, variante o derivado de enzima hidrolizante de fitato sea capaz de conservar al menos una actividad característica de la enzima hidrolizante de fitato de origen natural. Según su uso aquí, el término "mutantes y variantes", cuando hace referencia a enzimas hidrolizantes de fitato, se refiere a enzimas hidrolizantes de fitato obtenidas mediante la alteración de la secuencia de aminoácido de origen natural y/o estructura de la misma, como mediante alteración de la secuencia de nucleótidos de ADN del gen estructural y/o por sustitución directa y/o alteración de la secuencia de aminoácidos y/o estructura de la enzima hidrolizante de fitato.

**[0042]** El término "derivado" o "derivado funcional", relacionado con la fitasa, se usa aquí para indicar un derivado de fitasa que tiene las características funcionales de fitasa de la presente invención. Los derivados funcionales de fitasa abarcan péptidos o fragmentos de péptidos, mutantes o variantes producidos de manera recombinante, sintética o de origen natural que pueden presentar una o más delecciones, sustituciones o inserciones de aminoácidos que tienen las características generales de la fitasa de la presente invención.

**[0043]** El término "derivado funcional" relacionado con las secuencias de ácido nucleico que codifican fitasa se usa a lo largo de la especificación para indicar un derivado de una secuencia de ácido nucleico que tiene las características funcionales de una secuencia de ácido nucleico que codifica fitasa. Los derivados funcionales de una secuencia de ácido nucleico que codifica fitasa de la presente invención abarcan secuencias de ácido nucleico o fragmentos producidos de manera recombinante, sintética o de origen natural, mutantes o variantes de las mismas que pueden tener una o más delecciones, sustituciones o inserciones de ácido nucleico y codifican la fitasa característica de la presente invención. Las variantes de secuencias de ácido nucleico que codifican fitasa según la invención incluyen alelos y variantes basados en la degeneración del código genético conocido en la técnica. Los mutantes de secuencias de ácido nucleico que codifican fitasa según la invención incluyen mutantes producidos por técnicas de mutagénesis dirigida (véase, por ejemplo, Botstein, D. y Shortie, D., 1985, Science 229:1193-1201 y Myers, R.M., Lerman, L.S., y Maniatis, T., 1985, Science 229: 242-247), PCR propensa a error (véase, por ejemplo, Leung, D.W., Chen, E., y Goeddel, D.V., 1989, Technique 1: 11-15; Eckert, K.A. y Kunkel, T.A., 1991, PCR Methods Applic. 1: 17-24; y Cadwell, R.C. y Joyce, G.F., 1992, PCR Methods Applic. 2:28-33) y/o técnicas de mutagénesis inducida por el uso de sustancias químicas conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Elander, R.P., Microbial screening, Selection and Strain Improvement, en Basic Biotechnology, J. Bullock y B. Kristiansen Eds., Academic Press, Nueva York, 1987, 217).

**[0044]** "Vector de expresión" significa una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que está enlazada de manera operable a una secuencia de control adecuada capaz de efectuar la expresión del ADN en un huésped adecuado. Dichas secuencias de control pueden incluir un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifica sitios de enlace a ribosomas en el ARNm, y secuencias que controlen la terminación de la transcripción y traducción. Se usan preferiblemente diferentes tipos de células con diferentes vectores de expresión. Un promotor preferido para vectores usados en *Bacillus subtilis* es el promotor AprE; un promotor preferido usado en *E. coli* es el promotor Lac y un promotor preferido usado en *Aspergillus niger* es *glaA*. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago o simplemente un inserto genómico potencial. Una vez transformado en un huésped adecuado, el vector puede replicar y actuar independientemente del genoma del huésped, o puede, en condiciones adecuadas, integrarse en el propio genoma.

**[0045]** En la presente especificación, a veces se usa plásmido y vector de manera intercambiable. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión que presentan funciones equivalentes y que son, o llegan a ser, conocidas en la técnica. Por ello, puede usarse una amplia variedad de combinaciones de vector de expresión/huésped en la expresión de secuencias de ADN de esta invención. Los vectores de

expresión útiles, por ejemplo, pueden constar de segmentos de secuencias de ADN sintético, cromosómico y no cromosómico como diversos derivados conocidos de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, p.ej., plásmidos de *E. coli* que incluyen col E1, pCR1, pBR322, pMb9, pUC 19 y sus derivados, plásmidos de una amplia gama de huéspedes, p.ej., RP4, ADN del fago, p.ej., los numerosos derivados de fago I, p.ej., NM989, y otros fagos de ADN, p.ej., M13 y fagos de ADN de una cadena filamentosos, plásmidos de levaduras, como el plásmido 2m o derivados del mismo, vectores útiles en células eucariotas, como vectores útiles en células animales y vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, como plásmidos que han sido modificados para emplear ADN de fago u otras secuencias de control de expresión.

**[0046]** Las técnicas de expresión utilizadas en los vectores de expresión de la presente invención son conocidas en la técnica y se describen generalmente en, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Press (1989); Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (2001). A menudo, dichos vectores de expresión que incluyen las secuencias de ADN de la invención se transforman en un huésped unicelular mediante inserción directa en el genoma de una especie concreta a través de un evento de integración (véase p.ej., Bennett & Lasure, *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, San Diego, pp. 70-76 (1991) y artículos allí citados que describen la inserción genómica dirigida en huéspedes fúngicos).

**[0047]** "Cepa huésped" o "célula huésped" significa un huésped adecuado para un vector de expresión que comprende ADN según la presente invención. Las células huésped útiles en la presente invención son generalmente huéspedes procariontes o eucariotas, incluyendo cualquier microorganismo transformable en el que se puede lograr la expresión. Por ejemplo, las cepas huésped pueden ser *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, y *Aspergillus nidulans*. Las células huésped se transforman o transfectan con vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante. Dichas células huésped transformadas son capaces de replicar vectores que codifican fitasa y sus variantes (mutantes) o expresar el producto peptídico deseado.

**[0048]** Los ejemplos de huéspedes de expresión apropiados incluyen: células bacterianas, como *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, como *Aspergillus* y *Penicillium*; células de insecto como *Drosophila* y *Spodoptera Sf9*; células de animales como CHO, COS, HEK 293 o melanoma de Bowes; células vegetales, etc. La selección de un huésped apropiado se considera dentro del alcance de aquellos con experiencia en la técnica a partir de los principios aquí expuestos. Debería observarse que la invención no está limitada por las células huésped concretas empleadas.

## II. Enzimas fitasa y secuencias de ácido nucleico que codifican enzimas fitasa

**[0049]** Un aspecto de la presente invención está relacionado con proteínas o polipéptidos que son capaces de catalizar la hidrólisis de fitato y liberar fosfato inorgánico; por ejemplo, enzimas que tienen actividad catalítica como se define en la Comisión de Enzimas EC número 3.1.3.8, o en EC número 3.1.3.26. En un modo de realización preferido, la invención proporciona una llamada 3-fitasa. La presente invención abarca además polinucleótidos (p.ej., ADN) que codifica dichas proteínas o polipéptidos hidrolizantes de fitato.

**[0050]** La fitasa y/o polinucleótidos que codifican la fitasa se pueden derivar de un hongo, preferiblemente de un hongo anaerobio u hongo termófilo y más preferiblemente de *Penicillium sp.*, p.ej., *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium sp.*, p.ej., *Fusarium javanicum* o *Fusarium verticillibodes* o *Humicola sp.*, p.ej. *Humicola grisea*. Por tanto, se contempla que la fitasa o el ADN que codifica la fitasa según la invención pueda derivarse de *Absidia sp.*; *Acremonium sp.*; *Actinomyces sp.*; *Agaricus sp.*; *Anaeromyces sp.*; *Aspergillus sp.*, incluyendo *A. auculeatus*, *A. awamori*, *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. fumaricus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. terreus* y *A. versicolor*; *Aeurobasidium sp.*; *Cephalosporum sp.*; *Chaetomium sp.*; *Coprinus sp.*; *Dactyllum sp.*; *Fusarium sp.*, incluyendo *F. conglomerans*, *F. decemcellulare*, *F. javanicum*, *F. lini*, *F. oxysporum* y *F. solani*, *Gliocladium sp.*; *Humicola sp.*, incluyendo *H. insolens* y *H. lanuginosa*; *Mucor sp.*; *Myceliophthora ssp.*, incluyendo *M. thermophila*; *Neurospora sp.*, incluyendo *N. crassa* y *N. sitophila*; *Neocallimastix sp.*; *Orpinomyces sp.*; *Penicillium spp*; *Phanerochaete sp.*; *Phlebia sp.*; *Piromyces sp.*; *Pseudomonas sp.*; *Rhizopus sp.*; *Schizophyllum sp.*; *Streptomyces spp*; *Trametes sp.*; y *Trichoderma sp.*, incluyendo *T. reesei*, *T. longibrachiatum* y *T. viride*; y *Zygorhynchus sp.* Del mismo modo, se prevé que una fitasa y/o ADN que codifica una fitasa como se ha descrito aquí pueden derivarse de bacterias como *Streptomyces sp.*, incluyendo *S. olivochromogenes*; específicamente bacterias degradadoras de fibra en el rumen como *Fibrobacter succinogenes*; y en levadura incluyendo *Candida torresii*; *C. parapsilosis*; *C. sake*; *C. zeylanoides*; *Pichia minuta*; *Rhodotorula glutinis*; *R. mucilaginosa*; y *Sporobolomyces holsaticus*.

**[0051]** La fitasa y/o polinucleótidos que codifican la fitasa pueden derivarse de (i) un hongo de descomposición de grano, como *Penicillium hordei*, *Penicillium piceum*, o *Penicillium brevi-compactum*; o (ii) un hongo ectomicorrícico asociado a las raíces de los árboles, p.ej., *Laccaria laccata*, *Laccaria rufus*, *Paxillus involutus*,

*Hebeloma crustuliniforme*, *Amanita rubescens*, o *Amanita muscaria*. Según un modo de realización preferido, la fitasa y/o polinucleótido que codifica la fitasa de la presente invención se encuentra en forma purificada, es decir, presente en una composición concreta en una concentración más alta o más baja a la que existe en un organismo de tipo silvestre o de origen natural o en combinación con componentes que normalmente no están presentes en la expresión de un organismo de tipo silvestre u origen natural.

**[0052]** La invención abarca péptidos y proteínas hidrolizantes de fitato que comprenden al menos un 95%, y hasta un 100%, de identidad de secuencia de aminoácidos con la enzima hidrolizante de fitato que tiene la secuencia de aminoácidos revelada en las Figuras 2, 3 o 19A-19C, así como los polinucleótidos que codifican las enzimas fitasas.

III. Obtención de polinucleótidos que codifican una enzima hidrolizante de fitato

**[0053]** La secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima hidrolizante de fitato puede obtenerse mediante procedimientos estándares conocidos en la técnica de, por ejemplo, ADN clonado (p.ej., una "biblioteca" de ADN), mediante síntesis química, mediante clonación de ADNc, mediante PCR o mediante la clonación de ADN genómico, o fragmentos del mismo, purificado a partir de una célula deseada, como una especie fúngica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; Glover, DM y Hames, BD (Eds.), 1995, DNA Cloning 1: A Practical Approach and DNA Cloning 2: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford). Las secuencias de ácido nucleico derivadas de ADN genómico pueden contener regiones reguladoras además de regiones codificantes.

**[0054]** En la clonación molecular del gen de ADN genómico, se generan fragmentos de ADN, algunos de los cuales comprenderán al menos una parte del gen deseado. El ADN puede escindirse en sitios específicos usando diversas enzimas de restricción. De manera alternativa, puede usarse ADNasa en presencia de manganeso para fragmentar el ADN, o el ADN puede ser cortado físicamente, como por ejemplo, mediante sonicación. A continuación, los fragmentos de ADN lineales pueden separarse según el tamaño mediante técnicas estándares, incluyendo, sin carácter limitativo, electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida, PCR y cromatografía en columna.

**[0055]** Una vez que se generan los fragmentos de secuencia de ácido nucleico, puede lograrse la identificación del fragmento de ADN específico que codifica una enzima hidrolizante de fitato de diversas maneras. Por ejemplo, un gen que codifica la enzima hidrolizante de fitato de la presente invención o su ARN específico, o un fragmento del mismo, como una sonda o cebador, puede aislarse y marcarse y después utilizarse en ensayos de hibridación para detectar un gen generado. (Benton, W. y Davis, R., 1977, Science 196:180; Grunstein, M. y Hogness, D., 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3961). Aquellos fragmentos de ADN que comparten una similitud de secuencia sustancial con la sonda hibridarán bajo astringencia de media a alta.

**[0056]** La presente invención abarca enzimas hidrolizantes de fitato derivadas de especies fúngicas (esp., *Penicillium*, *Fusarium* y especies *Humicola*) que se identifican a través de técnicas de hibridación de secuencias de ácido nucleico usando una de las secuencias reveladas en las Figuras 1, 4, 7 y 9 o una parte o fragmento adecuado de las mismas (p.ej., al menos aproximadamente 10-15 nucleótidos contiguos), como una sonda o cebador y explorando secuencias de ácido nucleico de origen de ADNc o genómico. Las secuencias de ácido nucleico que codifican enzimas hidrolizantes de fitato derivadas de especies fúngicas y que tienen al menos una identidad del 65% con la secuencia de una de las Figuras 1, 4, 7 y 9 o una parte o fragmento de las mismas pueden detectarse mediante hibridación ADN-ARN o ADN-ADN o amplificación usando sondas, partes o fragmentos de las secuencias reveladas. Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para la detección de secuencias de ácido nucleico que codifican una enzima hidrolizante de fitato abarcada por la presente invención que comprende la parte hibridante o todo de una secuencia de ácido nucleico de la Figura 1, 4, 7 o 9 con una secuencia de ácido nucleico de origen de ADNc o genómico.

**[0057]** También incluido en el alcance de la presente invención se encuentran secuencias de polinucleótido que son capaces de hibridar con la secuencia de nucleótido revelada en las Figuras 1, 4, 7 o 9 en condiciones de astringencia de media a alta. En un modo de realización, las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del complejo de enlace de la secuencia de ácido nucleico, como se describe en Berger y Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol 152, Academic Press, San Diego CA) y conferir una astringencia definida. En este modo de realización, la "astringencia máxima" se produce normalmente a aproximadamente  $T_m - 5^\circ\text{C}$  ( $5^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_m$  de la sonda); la "alta astringencia" de aproximadamente  $5^\circ\text{C}$  a  $10^\circ\text{C}$  por debajo de  $T_m$ ; la "astringencia intermedia" o "media" de aproximadamente  $10^\circ\text{C}$  a  $20^\circ\text{C}$  por debajo de  $T_m$ ; y la "baja astringencia" de aproximadamente  $20^\circ\text{C}$  a  $25^\circ\text{C}$  por debajo de  $T_m$ . Puede usarse una hibridación de máxima astringencia para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos idénticas o casi idénticas, mientras que puede usarse una hibridación de astringencia baja o

media para identificar o detectar homólogos de secuencias de polinucleótidos.

**[0058]** El proceso de amplificación como se lleva a cabo en las tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se describe en Dieffenbach CW y GS Dveksler (1995, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY). Una secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 10 nucleótidos y hasta aproximadamente 60 nucleótidos de la secuencia de la Figura 1, preferiblemente aproximadamente de 12 a 30 nucleótidos, y más preferiblemente aproximadamente 25 nucleótidos puede usarse como sonda o cebador de PCR.

**[0059]** Un método preferido de aislamiento de una construcción de secuencia de ácido nucleico de la invención de una biblioteca genómica o ADNc es mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usar sondas de oligonucleótidos degenerados preparadas sobre la base de la secuencia de aminoácidos de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las Figuras 2 o 3. Por ejemplo, la PCR puede llevarse a cabo usando las técnicas descritas en la patente estadounidense n° 4.683.202.

**[0060]** En vista de lo anterior, se apreciará que la secuencia de polinucleótido proporcionada en la Figura 1, es útil para obtener fragmentos idénticos u homólogos de polinucleótidos de otras especies, y especialmente de hongos (p.ej., el hongo de descomposición de grano, o las ectomicorrizas) que codifican enzimas que presentan actividad de fitasa.

#### IV. Obtención de enzimas hidrolizantes de fitato variantes o derivadas

**[0061]** Las proteínas fitasa pueden ser fitasa derivada o variante en comparación con la secuencia de tipo silvestre. Es decir, como se explica de manera más completa a continuación, el péptido de fitasa derivado contendrá al menos una sustitución, delección o inserción de aminoácido, siendo especialmente preferidas las sustituciones de aminoácidos. La sustitución, inserción o delección de aminoácidos puede producirse en cualquier residuo en el péptido de fitasa.

**[0062]** También se encuentran incluidas en un modo de realización de proteínas fitasa de la presente invención variantes de secuencias de aminoácidos. Estas variantes recaen en una o más de las tres clases: variantes de delección, inserción o sustitución. Estas variantes se preparan de manera ordinaria mediante mutagénesis dirigida de nucleótidos en el ADN que codifica la proteína fitasa, usando mutagénesis por inserción de un casete o por PCR u otros métodos conocidos en la técnica, para producir ADN que codifique la variante y a partir de entonces exprese el ADN en el cultivo celular recombinante como se ha explicado arriba. Sin embargo, los fragmentos de proteína de fitasa variante que tengan hasta aproximadamente 100-150 residuos pueden prepararse mediante síntesis in vitro utilizando las técnicas establecidas. Las variantes de secuencias de aminoácidos están caracterizadas por la naturaleza predeterminada de la variación, un rasgo que las separa de variaciones entre especies o alélicas de origen natural de la secuencia de aminoácidos de proteínas fitasa. Las variantes presentan normalmente la misma actividad biológica cualitativa que los análogos de origen natural, aunque también pueden seleccionarse variantes que tengan características modificadas como se explicará de manera más completa a continuación.

**[0063]** Mientras que el sitio o región para introducir una variación de secuencia de aminoácidos es predeterminada, la mutación no es necesario que esté predeterminada per se. Por ejemplo, para optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, puede realizarse mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las variantes expresadas pueden explorarse para localizar la combinación óptima de actividad deseada. Las técnicas para realizar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tengan una secuencia conocida son conocidos, por ejemplo, mutagénesis con el cebador M13 y mutagénesis por PCR. La selección de mutantes se realiza usando ensayos de actividades de proteínas fitasa.

**[0064]** Las sustituciones de aminoácidos son de residuos sencillos normalmente; las inserciones serán normalmente del orden de aproximadamente 1 a 20 aminoácidos; aunque pueden tolerarse inserciones considerablemente más grandes, y pueden producirse de manera interna o en cualquier extremo de la proteína codificada. Las delecciones oscilan entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 residuos, aunque en algunos casos las delecciones pueden ser mucho mayores.

**[0065]** Pueden usarse sustituciones, delecciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas para llegar a un derivado final. Normalmente estos cambios se hacen sobre algunos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula. Sin embargo, pueden tolerarse cambios mayores en determinadas circunstancias. Cuando se desean pequeñas alteraciones en las características de la fitasa, las sustituciones se realizan generalmente de acuerdo con la siguiente tabla de residuos de sustituciones conservadoras:

Tabla I

Residuo original	Sustituciones de ejemplo
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

- 5 **[0066]** Los cambios sustanciales en la función o identidad inmunológica se realizan seleccionando sustituciones que sean menos conservadoras que aquellas mostradas en la Tabla I. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones que afecten de manera más significativa: la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la alteración, por ejemplo, la estructura de lámina beta o helicoidal alfa; la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que produzcan cambios más grandes en las propiedades del polipéptido son aquellos en los que (a) un residuo hidrofílico, p.ej., serilo o treonilo se sustituye por (o mediante) un residuo hidrofóbico, p.ej., leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina es sustituida por (o mediante) cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, p.ej., lisilo, arginilo o histidilo, es sustituido por (o mediante) un residuo electronegativo, p.ej., glutamilo o aspartilo; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, p.ej., fenilalanina, es sustituida por (o mediante) uno que no tenga una cadena lateral, p.ej., glicina.
- 10
- 15 **[0067]** Las variantes normalmente presentan la misma actividad biológica cualitativa y pueden provocar la misma respuesta inmune que el análogo de origen natural, aunque también se seleccionan variantes para modificar las características de las proteínas fitasa según sea necesario. De manera alternativa, la variante puede diseñarse de manera que la actividad biológica de la fitasa sea alterada. Por ejemplo, los sitios de glicosilación pueden alterarse o eliminarse. También, dichas alteraciones pueden resultar en una inmunogenicidad alterada.

- 5 **[0068]** Las modificaciones covalentes de polipéptidos de fitasa se incluyen en el alcance de esta invención. Un tipo de modificación covalente incluye reaccionar residuos de aminoácido diana de un polipéptido de fitasa con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N-terminales o C-terminales de un polipéptido de fitasa. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular una fitasa con otra proteína. Los agentes reticulantes utilizados comúnmente incluyen, p.ej., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluyen disuccinimidil ésteres como 3-3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidias bifuncionales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.
- 10 **[0069]** Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos glutaminilo y asparaginilo a los residuos glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo, treonilo o tirosilo, metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], acetilación de la amina N-terminal, y amidación cualquier grupo carboxilo C-terminal.
- 15 **[0070]** Otro tipo de modificación covalente del polipéptido de fitasa incluido en el alcance de esta invención comprende alterar el patrón de glicosilación nativo del polipéptido. "Alterar el patrón de glicosilación nativo" pretende significar, para los usos de la presente memoria, eliminar una o más fracciones de carbohidratos encontradas en la fitasa nativa, y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el polipéptido nativo.
- 20 **[0071]** La adición de sitios de glicosilación a polipéptidos puede lograrse alterando la secuencia de aminoácidos de los mismos. La alteración puede realizarse, por ejemplo, mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos serina o treonina al polipéptido de fitasa de la secuencia nativa (para sitios de glicosilación O-enlazados). La secuencia de aminoácidos de fitasa puede alterarse de manera opcional a través de cambios a nivel de ADN, especialmente mutando el ADN que codifica el polipéptido de fitasa en bases preseleccionadas de manera que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.
- 25 **[0072]** Otros medios para aumentar el número de fracciones de carbohidratos en el polipéptido de fitasa es mediante acoplamiento enzimático o químico de glicósidos al polipéptido. Dichos métodos se encuentran descritos en la técnica, p.ej., en WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).
- 30 **[0073]** La eliminación de fracciones de carbohidratos presentes en la fitasa puede lograrse de manera química o enzimática o mediante sustitución mutacional de codones que codifican residuos de aminoácidos que sirven como dianas para la glicosilación. Los métodos de desglicosilación química son conocidos en la técnica y han sido descritos, por ejemplo, por Hakimuddin, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) y por Edge et al., *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). La escisión enzimática de fracciones de carbohidratos en polipéptidos puede lograrse mediante el uso de una variedad de endo- y exoglicosidasas como se ha descrito por Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).
- 35 **[0074]** Otro tipo de modificación covalente de fitasa comprende el enlace del polipéptido de fitasa a uno de una variedad de polímeros no proteicos, p.ej., polietilenglicol, polipropilenglicol, o polioxialquilenos, en la manera expuesta en las patentes estadounidenses n° 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.
- 40 **[0075]** Las fitasas de la presente invención pueden modificarse también para formar moléculas quiméricas que comprenden un polipéptido de fitasa fusionado a otra secuencia de aminoácidos o polipéptido heterólogo. En otro modo de realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión de un polipéptido de fitasa con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que se puede unir de manera selectiva un anticuerpo antietiqueta. La etiqueta de epítipo se sitúa generalmente en el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal del polipéptido de fitasa. La presencia de dichas formas etiquetadas de epítipo de una fitasa pueden detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. También, la provisión de la etiqueta de epítipo permite a la fitasa purificarse fácilmente mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo antietiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se enlace a la etiqueta de epítipo. En un modo de realización preferido, la molécula quimérica puede comprender una fusión de un polipéptido de fitasa con una secuencia inicial o polipéptido señal, como una señal de secreción, de una fitasa diferente u otra proteína. La fusión puede implicar la adición de una secuencia de una proteína, como una fitasa, que es nativa a una célula huésped en la que se está expresando la fitasa. Se proporcionan ejemplos específicos de esto en la sección de Ejemplos a continuación.
- 45 **[0076]** Se conocen en la técnica diversos polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos
- 55

- incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); polipéptido etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos de la misma 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y9E10 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus del herpes simple y su anticuerpo [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido Flag [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; el péptido de epítipo KT3 [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]; el péptido de epítipo de tubulina [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; y la etiqueta peptídica de proteína del gen 10 de T7 [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].
- 10 **[0077]** También se incluyen en la definición de fitasa en un modo de realización otras proteínas fitasa de otros organismos, que son clonadas y expresadas como se explica a continuación. Por tanto, una sonda o secuencias cebadoras de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) degeneradas pueden usarse para encontrar otras fitasas relacionadas de hongos u otros organismos. Como se apreciará por aquellos expertos en la técnica, las secuencias de cebador de PCR y/o sondas especialmente útiles incluyen las secuencias de aminoácidos
- 15 altamente conservadas y las secuencias catalíticas o enlazantes conocidas. Por ejemplo, la región de unión de fosfato de la fitasa producida en diversos hongos está altamente conservada. Como se conoce generalmente en la técnica, los cebadores de PCR preferidos son de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 nucleótidos de longitud, siendo preferido de aproximadamente 20 a aproximadamente 30, y puede contener inosina según sea necesario. Las condiciones para la reacción de PCR son conocidas en la técnica.
- 20 **V. Expresión y recuperación de enzimas hidrolizantes de fitato**
- [0078]** Las secuencias de polinucleótido de la presente invención pueden expresarse uniéndolas de manera operativa a una secuencia de control de expresión en un vector de expresión adecuado y emplearse en ese vector de expresión para transformar un huésped apropiado según los métodos bien establecidos en la técnica. Los polipéptidos producidos en la expresión de las secuencias de ADN de esta invención pueden aislarse de la fermentación de cultivos celulares y purificarse de una variedad de maneras según los métodos bien establecidos en la técnica. Un experto en la técnica es capaz de seleccionar las técnicas de purificación y aislamiento más apropiadas.
- 30 **[0079]** Más concretamente, la presente invención proporciona células huésped, métodos de expresión y sistemas para la producción de enzimas hidrolizantes de fitato derivadas de microorganismos, como especies *Penicillium*, *Fusarium* y *Humicola*. Una vez se obtiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima hidrolizante de fitato de la presente invención, las células huésped recombinantes que contienen la secuencia de ácido nucleico pueden construirse usando técnicas bien conocidas en la técnica. Se revelan técnicas de biología molecular en Sambrook et al., Molecular Biology Cloning: A Laboratory Manual, Segunda edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) y Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (2001).
- 35 **[0080]** En un modo de realización, las secuencias de ácido nucleico que codifican enzimas hidrolizantes de fitato derivadas de especies *Penicillium* y que tienen al menos una identidad del 95% con la secuencia de ácido nucleico de una de la Figura 1, o que es complementaria a la misma, es obtenida y transformada en una célula huésped usando vectores apropiados.
- 40 **[0081]** Las secuencias de ácido nucleico que codifican enzimas hidrolizantes de fitato pueden incluir una secuencia líder capaz de proporcionar la secreción de la fitasa codificada. Dependiendo de si la fitasa se va a expresar de manera intracelular o es secretada, puede diseñarse por ingeniería genética una secuencia de ADN o vector de expresión de la invención de manera que la forma madura de la fitasa se exprese con o sin una secuencia señal de fitasa natural o secuencia señal que funcione en un hongo (p.ej., *Aspergillus niger*), procariotas o eucariotas. La expresión también puede lograrse eliminando o eliminando parcialmente dicha
- 45 secuencia señal.
- [0082]** Son conocidos para aquellos expertos en la técnica una variedad de vectores y casetes de expresión y transformación adecuados para la clonación, transformación y expresión en hongos, levadura, bacterias, células de insectos y vegetales. Normalmente, el vector o casete contiene secuencias que dirigen la transcripción y traducción de la secuencia de ácido nucleico, un marcador seleccionable y secuencias que permiten la replicación autónoma o integración cromosómica. Los vectores adecuados comprenden una región 5' del gen que alberga los controles de iniciación de la transcripción y una región 3' del fragmento de ADN que controla la terminación de la transcripción. Estas regiones de control pueden derivarse de genes homólogos o heterólogos al huésped siempre que la región de control seleccionada sea capaz de funcionar en la célula huésped.
- 50 **[0083]** Las regiones de control de iniciación o promotores, que son útiles para dirigir la expresión de las enzimas
- 55

hidrolizantes de fitato en una célula huésped son conocidas por aquellos expertos en la técnica. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima hidrolizante de fitato se une de manera operable a través de codones de iniciación a regiones de control de expresión seleccionadas para la expresión eficaz de dicha enzima. Una vez que se construyen casetes adecuados, se utilizan para transformar la célula huésped.

5 **[0084]** En casos en que se usan vectores de expresión de planta, la expresión de una secuencia que codifica fitasa puede ser impulsada por cualquiera de una variedad de promotores. Por ejemplo, los promotores virales como los promotores 35S y 19S de CaMV (Brisson et al (1984) Nature 310:511-514) pueden usarse solos o en combinación con la secuencia líder omega de TMV (Takamatsu et al (1987) EMBO J 6:307-311). Alternativamente, pueden usarse los promotores de plantas como la subunidad pequeña de RUBISCO (Coruzzi et al (1984) EMBO J 3:1671-1680; Broglie et al (1984) Science 224:838-843); o promotores de choque térmico (Winter J y Sinibaldi RM (1991) Results Probl Cell Differ 17:85-105). Estas construcciones pueden introducirse en células vegetales mediante transformación de ADN directa o transfección mediada por patógenos. Para análisis de dichas técnicas, véase Hobbs S o Murry LE (1992) en McGraw Hill Yearbook of Science and Technology, McGraw Hill, Nueva York, N.Y., pp 191-196; o Weissbach y Weissbach (1988) Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, Nueva York, N.Y., pp 421-463.

**[0085]** Se explican procedimientos de transformación generales en Current Protocols In Molecular Biology (3ª edición, editada por Ausubel et al., John Wiley & Sons, Inc. 1995, Capítulo 9) e incluyen métodos de fosfato de calcio, transformación usando PEG y electroporación.

20 **[0086]** Para *Aspergillus* y *Trichoderma*, puede usarse transformación de protoplastos mediada por calcio y PEG (Finkelstein, DB 1992 Transformation. In Biotechnology of Filamentous Fungi. Technology and Products (ed. por Finkelstein & Bill) 113-156. La electroporación de protoplasto se revela en Finkelstein, DB 1992 Transformation. In Biotechnology of Filamentous Fungi. Technology and Products (ed. por Finkelstein & Bill) 113-156. El bombardeo por microproyección sobre conidios se describe en Fungaro et al. (1995) Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojection bombardment on intact conidia, FEMS Microbiology Letters 125 293-298. La transformación mediada por *Agrobacterium* se revela en Groot et al. (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi, Nature Biotechnology 16 839-842 y patentes estadounidenses n° 6.255.115. Para la transformación de *Saccharomyces*, son conocidas por los expertos en la técnica técnicas de transformación mediada por acetato de litio y transformación de protoplastos mediada por calcio y PEG así como las técnicas de electroporación.

30 **[0087]** Las células huésped que contienen la secuencia de codificación para una enzima hidrolizante de fitato de la presente invención y expresan la proteína pueden identificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, sin carácter limitativo, hibridación ADN-ADN o ADN-ARN y técnicas de inmunoensayo o bioensayo de proteínas que incluyen tecnologías basadas en la membrana, en soluciones, o en chips para la detección y/o cuantificación de la secuencia de ácido nucleico o proteína.

**[0088]** Debería observarse también que la invención contempla la expresión *in vitro* de las enzimas fitasas aquí descritas.

40 **[0089]** En modos de realización preferidos de la invención, la fitasa se produce en células fúngicas. En un modo de realización de la presente invención, una secuencia de polinucleótidos que codifica una enzima hidrolizante de fitato derivada de *Penicillium chrysogenum* (n° de depósito NRRL 1951) es aislada y expresada en *Aspergillus niger*, y en otro modo de realización es expresada en *Aspergillus nidulans*. En otro modo de realización, una secuencia de polinucleótidos que codifica una enzima hidrolizante de fitato derivada de *Fusarium javanicum* (n° de depósito CBS 203.32) o *Fusarium verticillibodes* es aislada y expresada. En otro modo de realización diferente, se aísla y expresa una secuencia de polinucleótidos que codifica una enzima hidrolizante de fitato derivada de *Humicola grisea* (n° de depósito ATCC 22081). A continuación, puede recuperarse la fitasa expresada, p.ej., como se describe a continuación.

50 **[0090]** En modos de realización preferidos de la invención, la fitasa se expresa en plantas. Según su uso aquí, la planta transgénica hace referencia a una planta que contiene material genético recombinante que no se encuentra normalmente en plantas de este tipo y que ha sido introducido en la planta en cuestión (o en progenitores de la planta) mediante manipulación humana. Por tanto, una planta que se cultiva a partir de una célula vegetal en la que se introduce ADN recombinante por transformación es una planta transgénica, como lo son todos los vástagos de esta planta que contienen el transgen introducido (tanto si se ha producido de manera sexual como asexual). Se entiende que el término planta transgénica abarca la planta completa y partes de dicha planta, por ejemplo, granos, semillas, flores, hojas, raíces, fruta, polen, tallo, etc.

55 **[0091]** La presente invención es aplicable tanto a plantas dicotiledóneas (p.ej., tomate, patata, soja, algodón,

tabaco, etc) como a plantas monocotiledóneas, incluyendo, sin carácter limitativo, monocotiledóneas gramíneas como trigo (*Triticum* spp.), arroz (*Oryza* spp.), cebada (*Hordeum* spp.), avena (*Avena* spp.), centeno (*Secale* spp.), maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum* spp.) y mijo (*Pennisetum* spp). Por ejemplo, la presente invención puede emplearse con genotipos de cebada incluyendo, sin carácter limitativo, Morex, Harrington, Crystal, Stander, Moravian III, Galena, Salome, Steptoe, Klages, Baronesse, y con genotipos de trigo que incluyen, sin carácter limitativo, Yecora Rojo, Bobwhite, Karl y Anza. En general, la invención es especialmente útil en cereales.

**[0092]** Los métodos de biología molecular estándar y técnicas de transformación de plantas pueden usarse para producir plantas transgénicas que producen semillas que contienen la proteína fitasa. La siguiente descripción proporciona una guía general en cuanto a la selección de construcciones y procedimientos de transformación particulares.

**[0093]** La presente invención utiliza construcciones recombinantes que son adecuadas para obtener la expresión de fitasa en semillas vegetales en relación con las semillas vegetales no transformadas. En su forma más básica, estas construcciones pueden representarse como Pr-Ph, donde Pr es un promotor específico de la semilla y Ph es una secuencia de ácido nucleico que codifica fitasa. En otro modo de realización, puede emplearse una secuencia señal peptídica que dirige la expresión del polipéptido de fitasa a un cuerpo intracelular. Dichas construcciones pueden representarse como Pr-SS-Ph, donde SS es el péptido señal. Las moléculas de ácido nucleico que pueden usarse como fuente de cada uno de estos componentes se describen en la sección de Definiciones anterior.

**[0094]** Cada componente se une de manera operable al siguiente. Por ejemplo, cuando la construcción comprende el promotor de D-hordeína (P), la secuencia señal de D-hordeína (SS) que codifica el péptido señal de hordeína, y un marco de lectura abierto que codifica una fitasa (Ph), el promotor de hordeína es enlazado al extremo 5' de la secuencia que codifica la secuencia señal de hordeína, y la secuencia señal de hordeína es enlazada de manera operable al extremo 5' del marco de lectura abierto de fitasa, de manera que el extremo C-terminal del péptido señal está unido al extremo N-terminal de la proteína codificada.

**[0095]** La construcción incluirá también normalmente una región de terminación transcripcional que sigue al extremo 3' del ORF de la proteína codificada. Las regiones de terminación de transcripción ilustrativas incluyen el terminador nos del plásmido Ti de *Agrobacterium* y el terminador de alfa-amilasa del arroz.

**[0096]** Pueden emplearse métodos de biología molecular estándares, como la reacción en cadena de la polimerasa, digestión con enzimas de restricción y/o ligación para producir estas construcciones que comprenden cualquier molécula o secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o polipéptido de fitasa.

**[0097]** La introducción de la construcción seleccionada en plantas se logra normalmente usando técnicas de transformación estándares. El enfoque básico es: (a) clonar la construcción en un vector de transformación; que (b) se introduce a continuación en células vegetales mediante una variedad de técnicas (p.ej., electroporación, bombardeo de micropartículas, infección por *Agrobacterium*); (c) identificar las células vegetales transformadas; (d) regenerar plantas enteras a partir de células vegetales identificadas, y (d) seleccionar plantas descendientes que contengan la construcción introducida. Preferiblemente todo o parte del vector de transformación se integrará de manera estable en el genoma de la célula vegetal. La parte del vector de transformación que se integra en la célula vegetal y que contiene la secuencia Pr- Ph o Pr-SS-Ph introducida (el "transgén de fitasa" introducido) puede denominarse como casete de expresión recombinante.

**[0098]** La selección de plantas progenie que contienen el transgen introducido puede realizarse basándose en la detección de expresión de fitasa en semillas, o en la resistencia aumentada a un agente químico (como un antibiótico) como resultado de la inclusión de un gen marcador seleccionable dominante incorporado en el vector de transformación.

**[0099]** Los ejemplos exitosos de la modificación de características de plantas mediante transformación con secuencias de ácido nucleico clonadas abundan en la literatura técnica y científica. Los ejemplos seleccionados, que sirven para ilustrar el conocimiento en este campo de tecnología incluyen:

Patente estadounidense nº 5.571.706 ("Plant Virus Resistance Gene and Methods");  
 Patente estadounidense nº 5.677.175 ("Plant Pathogen Induced Proteins");  
 Patente estadounidense nº 5.510.471 ("Chimeric Gene for the Transformation of Plants");  
 Patente estadounidense nº 5.750.386 ("Pathogen-Resistant Transgenic Plants");  
 Patente estadounidense nº 5.597.945 ("Plants Genetically Enhanced for Disease Resistance");  
 Patente estadounidense nº 5.589.615 ("Process for the Production of Transgenic Plants with Increased Nutritional Value Via the Expression of Modified 2S Storage Albumins");

- Patente estadounidense nº 5.750.871 ("Transformation and Foreign Gene Expression in *Brassica* Species");  
 Patente estadounidense nº 5.268.526 ("Over expression of Phytochrome in Transgenic Plants");  
 Patente estadounidense nº 5.780.708 ("Fertile Transgenic Com Plants");  
 5 Patente estadounidense nº 5.538.880 ("Method For Preparing Fertile Transgenic Corn Plants");  
 Patente estadounidense nº 5.773.269 ("Fertile Transgenic Oat Plants");  
 Patente estadounidense nº 5.736.369 ("Method For Producing Transgenic Cereal Plants");  
 Patente estadounidense nº 5.610.049 ("Methods For Stable Transformation of Wheat").
- 10 **[0100]** Estos ejemplos incluyen descripciones de selección de vectores de transformación, técnicas de transformación y la construcción de construcciones diseñadas para expresar un transgén introducido.
- [0101]** Las construcciones que expresan el transgén de la presente invención puede expresarse de manera útil en una amplia gama de plantas superiores para obtener expresión específica del grano o semillas de polipéptidos seleccionados. Se espera que la invención sea especialmente aplicable a las plantas de cereales  
 15 monocotiledóneas que incluyen cebada, trigo, arroz, centeno, maíz, triticual, mijo, sorgo, avena, forraje y hierbas de césped. En concreto, los métodos de transformación descritos aquí permitirán que la invención se use con genotipos de cebada que incluyen Morex, Harrington, Crystal, Stander, Moravian III, Galena, Golden Promise, Steptoe, Klages y Baronesse, y genotipos de trigo comercialmente importantes que incluyen Yecora Rojo, Bobwhite, Karl y Anza.
- 20 **[0102]** La invención puede aplicarse también a plantas dicotiledóneas que incluyen, sin carácter limitativo, soja, remolacha de azúcar, algodón, alubias, colza/cánola, alfalfa, linaza, girasol, cártamo, brassica, algodón, linaza, cacahuete, trébol; vegetales como lechuga, tomate, cucurbitáceas, mandioca, patata, zanahoria, rábano, guisante, lentejas, col, coliflor, brócoli, coles de Bruselas, pimientos; y frutos como cítricos, manzanas, peras, melocotones, albaricoques y nueces.
- 25 **[0103]** Se ha descrito una variedad de vectores recombinantes adecuados para la transformación estable de células vegetales o para el establecimiento de plantas transgénicas que incluyen aquellos descritos en Weissbach y Weissbach, (1988), y Gelvin et al., J. Bacteriol. 172(3):1600-1608 (1990). Normalmente, los vectores de transformación vegetales incluyen uno o más ORF bajo el control de transcripción de las secuencias reguladoras 5' y 3' y un marcador seleccionable dominante con secuencias reguladoras 5' y 3'. La selección de  
 30 secuencias reguladoras 5' y 3' adecuadas para construcciones de la presente invención se analiza arriba. Los genes marcadores seleccionables dominantes que permiten la fácil selección de transformantes incluyen aquellos que codifican genes de resistencia a antibióticos (p.ej., resistencia a higromicina, kanamicina, bleomicina, G418, estreptomycin o espectinomycin) y genes de resistencia a herbicida (p.ej., fosfinotricina acetiltransferasa).
- 35 **[0104]** Son conocidos los métodos para la transformación y regeneración de células de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas y la técnica de transformación apropiada será determinada por el profesional. La elección del método variará con el tipo de planta a transformar; aquellos con experiencia en la técnica reconocerán la idoneidad de los métodos particulares para tipos de planta dados. Los métodos adecuados pueden incluir, sin carácter limitativo; electroporación de protoplastos vegetales; transformación mediada por  
 40 liposomas; transformación mediada por polietilenglicol (PEG); transformación usando virus; microinyección de células vegetales; bombardeo de microproyectiles de células vegetales; infiltración en vacío; y transformación mediada por *Agrobacterium*. Los procedimientos comunes para transformar y regenerar plantas de describen en los documentos de patente enumerados al principio de esta sección.
- 45 **[0105]** Tras la transformación, los transformantes se seleccionan preferiblemente usando un marcador seleccionable dominante. Normalmente, dicho marcador conferirá resistencia a los herbicidas o antibióticos en plántulas de plantas transformadas y la selección de transformantes puede lograrse exponiendo las plántulas a concentraciones apropiadas de antibiótico o herbicida. Después de seleccionar las plantas transformadas y cultivarlas hasta la madurez para permitir la formación de semillas, pueden recolectarse las semillas y someterse a ensayo para detectar la expresión de fitasa.
- 50 **[0106]** La fitasa de la invención puede recuperarse del medio de cultivo o de lisados de célula huésped. Si está unida a la membrana, puede liberarse de la membrana usando una solución de detergente adecuada (p.ej., Triton-X 100) o mediante escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión de fitasa pueden alterarse por diversos medios físicos o químicos, como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, ruptura mecánica, o agentes lisantes celulares. Puede desearse purificar la fitasa a partir de polipéptidos o proteínas de  
 55 células recombinantes. Los procedimientos siguientes son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados; mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC en

fase inversa; cromatografía sobre sílice o en una resina de intercambio catiónico como DEAE; cromatofocalización; SDS- PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtrado con gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A-Sepharose para eliminar contaminantes; y columnas quelantes de metales para unir las formas con etiqueta de epítipo de la fitasa. Pueden emplearse diversos métodos de purificación de proteínas y dichos métodos son conocidos en la técnica y se describen por ejemplo en Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y la forma particular de fitasa producida.

**[0107]** Las fitasas pueden producirse en animales transgénicos no humanos. Los métodos para producir dichos animales transgénicos se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense nº 6.291.740. Los métodos para la producción exitosa de animales bovinos (p.ej., patentes estadounidenses nº 6.080.912 y 6.066.725), porcinos (p.ej., patentes estadounidenses nº 6.271.436 y 5.942.435), cabras (p.ej., patente estadounidense nº 5.907.080) y peces transgénicos (p.ej., patente estadounidense nº 5.998.697) están disponibles en la técnica. Además, la expresión específica en un órgano, especialmente la expresión en leche producida por los animales transgénicos, se encuentra entre las habilidades del experto (p.ej., patentes estadounidenses nº 6.268.545 y 6.262.336).

#### VI. Ensayos sobre la actividad de fitasa

**[0108]** Los ensayos para evaluar la actividad de fitasa son conocidos en la técnica. Quizá, el usado más comúnmente es el ensayo clásico de liberación de fosfato inorgánico desarrollado por Fiske y SubbaRow, Journal of Biological Chemistry 66:375-392 (1925). Se encuentra una variación de este método en Mitchell et al., Microbiol. 143:245-252 (1997). Se describe un método preferido en Food Chemicals Codex, 4ª Edición, Committee on Food Chemicals Codex, Institute of Medicine, National Academy Press, Washington, DC, 1996 en las págs. 809-810.

**[0109]** Generalmente, el ensayo implica permitir que un peso o volumen medido de una muestra de fitasa reaccione con fitato en solución durante un periodo de tiempo medido. La reacción se para y se añade solución de color que contiene molibdato de amonio (AM, en inglés) a la solución de reacción. A continuación se lleva a cabo la colorimetría usando un espectrofotómetro y se compara con los controles de concentración conocida de fosfato inorgánico (Pi) y/o los controles producidos por reacciones con enzimas que tienen actividad de fitasa conocida. Se determina una unidad de actividad como la cantidad de muestra de enzima necesaria para liberar 1  $\mu\text{mol Pi}$  por minuto de fitato en condiciones de reacción definidas.

**[0110]** Las reacciones enzimáticas se llevan a cabo frecuentemente a pH 5,5 y 37 °C. Sin embargo, las condiciones de temperatura y pH pueden variarse para determinar las tolerancias y condiciones de reacción óptimas para una fitasa dada. Cuando se ensayan diferentes condiciones de reacción, las unidades de actividad deberían continuar estando relacionadas con un solo conjunto específico de condiciones de reacción.

**[0111]** La reacción puede pararse y a continuación añadirse solución de color, o puede usarse una solución de parada/color que detenga la actividad enzimática y añada un producto cuya absorbancia espectral se vea afectada de manera medible por la concentración de Pi de manera predecible y calculable. Como se ha analizado arriba, las soluciones de color contienen generalmente AM. Existen disponibles diversos ejemplos de dichas soluciones en la literatura relevante. En la patente estadounidense nº 6.039.942, la reacción se para usando tricloroacetato (TCA) y la solución de color añadida a continuación contenía sulfato ferroso y AM. En otros ejemplos donde la reacción se para primero con TCA, una solución de color diferente contenía ácido sulfúrico, AM y ácido ascórbico (patente estadounidense nº 6.221.644) y ácido sulfúrico, AM y sulfato ferroso (patente estadounidense nº 6.190.897). En otros casos, la solución de color y parada son la misma. Por ejemplo, en las patentes estadounidenses nº 6.139.902 y 6.261.592, la solución contenía ácido sulfúrico, AM y acetona, tras lo cual se añadió una solución que contenía ácido acético. En un modo de realización preferido, la solución de color/parada contiene vanadato de amonio, AM y ácido nítrico (véase Food Chemicals Codex, arriba).

**[0112]** La absorción de longitud de onda específica por la solución final, que contiene la solución de reacción y solución(es) de parada/color, se mide usando un espectrofotómetro. Muchos de dichos instrumentos están disponibles y su uso es rutinario en la técnica. La longitud de onda usada para la medición de la absorción puede variar con los componentes de la solución de color. Por ejemplo, las referencias citadas arriba midieron la absorbancia a 380, 415, 690, 700 o 750 nm. Cualquiera de estas puede proporcionar la indicación adecuada de concentración de Pi en estas soluciones. Sin embargo, la longitud de onda utilizada debería generalmente ser la descrita en un protocolo dado. El experto puede determinar fácilmente de manera empírica qué longitud de onda proporciona una discriminación óptima de diferencias en concentración de Pi comparando la linealidad de cambio de absorción entre soluciones de control diluidas en serie de concentraciones de Pi conocidas en diferentes longitudes de onda.

## VII. Aplicaciones de enzimas hidrolizantes de fitato

**[0113]** La fitasa y derivados de la misma como se explica aquí pueden usarse en una variedad de aplicaciones donde es deseable separar el fósforo del fitato. Se exponen a continuación diversos ejemplos de aplicaciones.

5 **[0114]** Por ejemplo, la invención facilita el uso de células o esporas capaces de producir fitasa según la invención como un producto microbiano para alimentación directa o probiótico. Los modos de realización preferidos para dichos usos son *Aspergillus* sp. productor de fitasa de la invención.

**[0115]** Además, la invención contempla el uso de fitasa como se describe aquí en comida o pienso animal.

10 **[0116]** La presente invención proporciona alimento o pienso animal que incluye fitasa como se describe aquí. Preferiblemente, dicho alimento o pienso animal comprende fitasa como un aditivo que es activo en el tracto digestivo, preferiblemente el buche y/o intestino delgado, de ganado, como aves y cerdos y animales de granja acuáticos que incluyen peces y camarones. Dicho aditivo también es preferiblemente activo en el procesamiento de piensos o alimentos.

15 **[0117]** En un modo de realización alternativo, se añaden fitasa u organismos productores de fitasa como un pretratamiento al alimento o pienso animal, como en el procesamiento del alimento o pienso. En este modo de realización, la fitasa es activa antes del consumo del alimento o pienso, pero puede o no ser activo en el momento en el que se consume el alimento o pienso animal.

**[0118]** Las composiciones que comprenden polipéptidos o proteínas que poseen actividad de fitasa pueden prepararse según los métodos conocidos en la técnica y pueden encontrarse en forma de composición seca o líquida. El polipéptido a incluir en la composición puede estabilizarse según los métodos conocidos en la técnica.

20 **[0119]** La invención proporciona además alimento o pienso animal que comprende partes de plantas, esporas o células, incluyendo semillas, capaces de expresar fitasa como se ha descrito aquí.

25 **[0120]** Aún más, la presente invención contempla un método para la producción de un alimento o pienso animal, caracterizado porque la fitasa según la invención se mezcla con dicho alimento o pienso animal. Dicha fitasa se añade como un producto seco o un líquido, antes o después del procesamiento. Según un modo de realización, donde se usa un polvo seco, la enzima se diluye como un líquido en un portador seco como grano molido.

30 **[0121]** Las composiciones líquidas no necesitan contener nada más que la enzima fitasa, preferiblemente en una forma purificada. Sin embargo, normalmente se añade también un estabilizador como glicerol, sorbitol o monopropilenglicol. La composición líquida puede comprender también uno o más aditivos, como sales, azúcares, conservantes, agentes reguladores de pH (es decir, agentes amortiguadores), proteínas o fitato (un sustrato de fitasa). Las composiciones líquidas típicas son lodos acuosos o basados en aceite.

35 **[0122]** Las composiciones líquidas pueden añadirse a alimentos o pienso tras un granulado opcional de las mismas. Las composiciones secas pueden ser composiciones atomizadas, en cuyo caso la composición no necesita contener nada más que la enzima en una forma seca. Sin embargo, normalmente las composiciones secas son los denominados granulados que pueden mezclarse fácilmente con, por ejemplo, componentes de pienso o alimento, o más preferiblemente, formar un componente de premezcla. El tamaño de partícula del granulado de enzima preferiblemente es compatible con el de los otros componentes de la mezcla. Esto proporciona un medio conveniente y seguro para incorporar enzimas en el pienso animal, por ejemplo.

40 **[0123]** Se preparan gránulos de aglomeración usando técnicas de aglomeración en un mezclador de alto cizallamiento (p.ej., Lodige) durante lo cual se coaglomera el material de relleno y la enzima para formar gránulos. Se prepara granulado de absorción mediante núcleos de un material portador para adsorber/ser recubiertos por la enzima.

**[0124]** Los materiales de relleno típicos son sales como sulfato de sodio. Otros rellenos son caolín, talco, silicato de aluminio y magnesio y fibras de celulosa. De manera opcional, se incluyen también aglutinantes como dextrinas en gránulos de aglomeración.

45 **[0125]** Los materiales portadores típicos son almidón, p.ej., en forma de mandioca, maíz, patata, arroz y trigo. También pueden usarse sales.

**[0126]** Opcionalmente, los gránulos se recubren con una mezcla de recubrimiento. Dichas mezclas comprenden agentes de recubrimiento, preferiblemente agentes de recubrimiento hidrofóbicos, como aceite de palma hidrogenado y sebo de vacuno, y si se desea otros aditivos, como carbonato cálcico o caolín.

**[0127]** Además, las composiciones de fitasa pueden contener otros sustituyentes como agentes colorantes, compuestos aromáticos, estabilizadores, vitaminas, minerales, otros alimentos y piensos que mejoren las enzimas y similares. Esto es así en especial para las llamadas premezclas.

5 **[0128]** Un "pienso" o un "alimento", respectivamente, significa cualquier dieta natural o artificial, comida o similares o componentes de dichas comidas dirigidos o adecuados para ser ingeridos, tomados, digeridos, por un animal y un ser humano, respectivamente.

10 **[0129]** Un "aditivo de pienso o alimento" es un compuesto esencialmente puro o una composición de múltiples componentes dirigida a o adecuada para añadirse al alimento o pienso. Normalmente comprende uno o más compuestos como vitaminas, minerales o enzimas que mejoran el pienso y portadores adecuados y/o excipientes, y se proporciona normalmente en una forma adecuada para ser añadido al pienso animal.

15 **[0130]** Las fitasas de la invención pueden usarse también en alimento de aves para mejorar la calidad de la cáscara de huevos (reducción de pérdidas debido a rotura), véase, por ejemplo, The Merck Veterinary Manual (Séptima Edición, Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., EE.UU., 1991, pág. 1268); Jeroch et al. Bodenkultur Vo. 45(4):361-368 (1994); Poultry Science, 75(1):62-68 (1996); Canadian Journal of Animal Science 75(3):439-444 (1995); Poultry Science 74(5):784-787 (1995) y Poultry Science 73(10):1590-1596 (1994).

**[0131]** Una cantidad efectiva del polipéptido en el alimento o pienso consiste en normalmente aproximadamente de 10 a 50.000 U/kg de pienso o alimento; preferiblemente de aproximadamente 10 a 15.000, más preferiblemente de aproximadamente 10 a 10.000, en concreto de aproximadamente 100 a 5.000, especialmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 U/kg de pienso o alimento.

20 **[0132]** Se describe aquí un método para la producción de un alimento o pienso animal, caracterizado porque las células, partes de plantas, incluyendo semillas, y/o esporas capaces de expresar fitasa según la invención se añaden a dicho alimento o pienso animal. Dichas células o esporas pueden ser de cualquier origen, bacteriano, vegetal o animal.

25 **[0133]** Se describe aquí el uso de la fitasa descrita aquí con o sin fosfatasa accesorias en la producción de inositol y fosfato inorgánico, y productos intermedios de fitato.

**[0134]** Se describe aquí un método para la reducción de niveles de fósforo en estiércol animal, caracterizado porque un animal es alimentado con pienso animal según la invención en una cantidad efectiva para convertir el fitato contenido en dicho pienso animal.

30 **[0135]** En un modo de realización, la proteína del transgén, por ejemplo, fitasa expresada en plantas, especialmente semillas o granos, usando los métodos aquí descritos, se usa en la producción y síntesis de fitasa. El transgén de la fitasa expresado por el ácido nucleico recombinante de la invención puede recolectarse en cualquier momento después de que comience la expresión de la proteína. Cuando se recolecta a partir de la semilla o grano u otra parte de una planta por ejemplo, no es necesario que la semilla o grano u otra parte de la planta haya experimentado una maduración antes de la recolección. Por ejemplo, la expresión del transgén puede ocurrir antes de la maduración de grano o semilla o puede alcanzar niveles óptimos antes de la maduración del grano o semilla. La proteína del transgén puede aislarse a partir de semillas o grano, si se desea, mediante métodos de purificación de proteínas convencionales. Por ejemplo, el grano o semilla puede ser molido, a continuación extraerse con un medio de extracción orgánico o acuoso, seguido de purificación de la proteína de fitasa extraída. De manera alternativa, según la naturaleza del uso previsto, la proteína del transgén puede purificarse de manera parcial, o el grano o semilla puede usarse directamente sin purificación de la proteína del transgén para alimento o pienso animal, procesamiento de alimentos u otros fines.

35  
40

45 **[0136]** Las alfa-amilasas rompen los enlaces 1-4 del almidón. Las amilasas son enzimas fundamentales para las industrias de panadería y cerveceras. Las amilasas son necesarias para romper el almidón en el malteado y en determinados procedimientos de horneado llevados a cabo en ausencia de azúcares añadidos u otros carbohidratos. La obtención de actividad adecuada de estas enzimas es problemática especialmente en la industria maltera. Se sabe desde hace algún tiempo que el fitato tiene un efecto inhibidor sobre las amilasas. Un método para aumentar de manera adecuada la actividad de amilasas con un sistema aceptable de manera fisiológica lleva a métodos de malteado más rápidos y, debido a la mayor disponibilidad de azúcar, a bebidas alcohólicas como cervezas con un contenido de carbohidratos reducido.

50 **[0137]** Por consiguiente, las semillas o granos con expresión de fitasa proporcionan ventajas en la producción de malta y bebidas producidas por un proceso de fermentación. La actividad mejorada de amilasas en el grano aumenta la velocidad y eficiencia de la germinación, importante en el malteado, donde se produce malta que tiene una actividad enzimática aumentada que resulta en la hidrólisis mejorada de almidón en carbohidratos fermentables, mejorando de ese modo la eficiencia de fermentación en la producción de bebidas alcohólicas, por

ejemplo, cerveza o whisky escocés. Los procesos de fermentación mejorados también encuentran utilidad en la producción de alcoholes no destinados al consumo humano, es decir, alcoholes industriales.

**[0138]** La fitasa y los productos intermedios derivados de fitato de la invención también encuentran utilidad en muchas otras aplicaciones en los sectores de la agricultura, industria, medicina y nutrición. Por ejemplo, los productos intermedios de fitasa y derivados de fitato pueden usarse en la molienda por vía húmeda de grano. El fitato se utiliza en productos de limpieza, productos de eliminación de herrumbre y en la eliminación de metales y otros policones de materiales tan diversos como productos de desecho y bebidas carbonatadas. El fitato y las fitasas pueden usarse en el aislamiento y recuperación de metales raros. La fitasa puede usarse para producir homólogos de fitato de bajo fosfato, que pueden usarse en dentífrico y otros productos para el cuidado dental como tratamientos o preventivos potenciales de resorción ósea (p.ej., en osteoporosis) y cálculos renales (piedras en el riñón). El fitato y derivados han encontrado uso en la producción de tofu y quelación de minerales (p.ej., hierro, zinc, calcio o magnesio) con fitato, seguida de la liberación con adición de fitasa puede proporcionar un medio único de proporcionar estos nutrientes. Las fitasas pueden usarse en la producción de inositol a partir de fitato su uso en productos alimentarios. Las fitasas pueden usarse también en la síntesis química o bioquímica de materiales que contienen fosfato. La fitasa, fitato y derivados de fitato de fosfato imás bajo encuentran numerosos usos diferentes en productos de cuidado personal, productos médicos y productos de alimentación y nutricionales, así como diversas aplicaciones industriales, especialmente en los sectores de limpieza, textil, litografía y química.

**[0139]** Los siguientes ejemplos se ofrecen exclusivamente con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención en modo alguno. El experto en la técnica apreciará que los métodos revelados pueden aplicarse a cualquier número de especies diferentes, incluyendo para obtener todas las secuencias aquí reveladas.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

#### Preparación de ADN genómico que codifica fitasas

**[0140]** Se preparó ADN genómico de diversos microorganismos diferentes con el fin de experimentar una reacción de PCR para determinar si las fitasas son codificadas por el ADN de un organismo concreto.

**[0141]** Se obtiene ADN genómico de *Penicillium chrysogenum* (depósito n° NRRL 1951); *Fusarium javanicum* (depósito n° CBS 203.32); *Fusarium verticillibodes*; *Humicola grisea var. thermoidia* depósito n° CBS 225.63 o ATCC 22081; y *Emericella desertorum* depósito n° CBS 653.73 y se aísla según los métodos estándares.

**[0142]** Se llevan a cabo alineaciones de diversas secuencias de fitasa conocidas, incluyendo aquellas de *Aspergillus Niger/Aspergillus ficum*, *Aspergillus terreus* 59, *Aspergillus terreus* 60, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Emericella nidulans*, *Talaromyces thermophilus* y *Myceliophthora thermophila*. A partir de estas, se identificaron diversas "cajas" como conservadas en gran medida, y a partir de estas se desarrollaron cebadores.

**[0143]** Se construyeron los siguientes cebadores de ADN para su uso en la amplificación de genes de fitasa a partir de bibliotecas construidas a partir de diversos microorganismos. Todos los símbolos aquí utilizados para secuencias de ADN y proteínas corresponden a códigos de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB.

CAJA1: cebadores que codifican (V/L)L(A/S)RHGAR  
 cebador directo BTIYTIKCIMGICAYGGIHCIMG  
 cebador inverso BTIYTIAGYMGICAYGGIHCIMG

CAJA2: cebadores que codifican NNTL(D/E/H)  
 cebador directo AAYAAYACIYTISA  
 cebador inverso TSIARIGTRTTRTT

CAJA3: cebadores que codifican LSPFC  
 cebador directo YTTTCICCCITTYTGY  
 cebador directo YTIAGYCCITTYTGY  
 cebador inverso RCARAAIGGIGAIAR  
 cebador inverso RCARAAIGGRCTIAR

CAJA4: cebadores que codifican G(N/S)PLGP

cebador directo GGIWVICCIYTIGGICC  
 cebador inverso CCIARIGGIBWICC

5 CAJA5: cebadores que codifican DFSHD  
 cebador directo GAYTTYTCICAYGAY  
 cebador directo GAYTTYAGYCAYGAY  
 cebador inverso RTCRTGIGARAARTC  
 cebador inverso RTCRTGRCTRAARTC

10 CAJA6: cebadores que codifican VR(A/V)I(I/V)NDR  
 cebador inverso CKRTCRTTIAYIARIRCICKIAC

**[0144]** Se desarrollaron cajas también según los métodos de Pasamontes et al. Appl. Evir. Microbiol. 63(5):1696-1700 (1997) para proporcionar los siguientes cebadores.

15 CAJA2.5: codifica MDMCSFD  
 cebador directo ATGGAYATGTGYTCNTTYGA

20 CAJA4□: codifica YGHGAG  
 cebador inverso TTRCCRGCRCCRTGNCCRTA

**[0145]** Se lleva a cabo PCR en una máquina de PCR estándar como el PTC-150 Mini Cycler de MJ Research Inc. (Watertown, MA) o un Eppendorf Mastercycler (Hamburgo, Alemania). En los experimentos descritos a continuación, se llevó a cabo la PCR usando un termociclador Hybaid Touchdown (Middlesex, Reino Unido).

25 **[0146]** Las condiciones de PCR para polimerasa Pwo (Boehringer Mannheim, Cat nº 1644-947) comprenden una solución de 100 microlitros hecha de 10 microlitros de amortiguador de reacción 10X (amortiguador de reacción 10X que comprende 100mM Tris HCl, pH 8-8,5; 250 mM KCl; 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 20 mM MgSO<sub>4</sub>); 0,2 mM cada uno de dATP, dTTP, dGTP, dCTP (concentración final), 1 microlitro de 100 nanogramos/microlitro de ADN genómico, 1 microlitro de PWO a 1 unidad por microlitro, 500 mM cebadores (concentración final) y agua a 100 microlitros. La solución es recubierta con aceite mineral.

**[0147]** Se desarrollaron dos enfoques para la amplificación de genes de fitasa a partir del ADN genómico:

35 A) Se realiza una primera PCR usando los cebadores de la CAJA1 y CAJA6; se analizan los productos en un gel de agarosa y se aíslan aproximadamente 1 kb de fragmentos y se analizan en una segunda PCR usando cebadores anidados. Para el análisis de la segunda PCR, se obtuvieron mejores resultados usando cebadores de CAJA1-CAJA5 o de CAJA5-CAJA6 o CAJA2.5/CAJA4'.

Protocolo A:

40 PCR1: - 2' a 94°C (1 ciclo)  
 - 45" a 94°C; 1'30" a 40°C; 1'30" a 72°C (30 ciclos)  
 - 7' a 72°C (1 ciclo)  
 - mantener a 4°C

45 Los fragmentos se colocaron sobre un gel de baja fusión al 1% y se cortaron fragmentos del tamaño esperado aproximadamente (0,0-1,2 kb) del gel, se aislaron y se usaron como plantilla para la segunda PCR (PCR2). La PCR2 siguió el mismo protocolo de ciclado que la PCR1.

B) Se llevó a cabo PCR Touchdown usando cebadores de CAJA2.5/CAJA4'. Usando esta técnica, puede aislarse un fragmento específico, clonarse en un vector TOPO (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y secuenciarse sin mayor procesamiento.

50 Protocolo B:

55 - 3' a 95°C (1 ciclo)  
 - 1' a 95°C; 1' a 60°C, descendiendo a 50°C; 30" a 72°C (20 ciclos, de manera que la temperatura caiga 0,5°C cada ciclo en el etapa de alineamiento)  
 - 1' a 95°C; 1□ a 50°C; 30" a 72°C (10 ciclos)  
 - mantener a 4°C

[0148] A partir de los fragmentos secuenciados, es posible usar la técnica RAGE (amplificación rápida de extremos genómicos) para obtener rápidamente la secuencia del gen de longitud completa. Usando el kit GenomeWalker<sup>®</sup> de Clontech Laboratories, Inc (Palo Alto, CA) y el protocolo del fabricante (GenomeWalker<sup>®</sup> Kits User Manual, publicado el 10 de noviembre de 1999), las ligaciones de adaptadores se derivaron de las secuencias de fragmento para determinar en mayor medida la secuencia del gen aguas arriba. Las secuencias de genes de fitasa se determinaron a partir de ADN cromosómico de diversas especies.

[0149] La Figura 22 muestra la secuencia de polinucleótidos de fitasa de *E. desertorum* obtenida mediante los métodos anteriores y las secuencias en ella de las que se derivan las ligaciones de adaptadores (cebadores GSP1 rev:fyt037 y GSP2rev:fyt036) para obtener las secuencias aguas arriba que codifican esta fitasa (véase la Figura 17A).

[0150] La Figura 23 muestra la secuencia de fitasa de *F. javanicum* obtenida mediante los métodos anteriores y las secuencias en ella a partir de las que se derivaron ligaciones de adaptador (cebador GSP1 rev:fyt039 y GSP2rev:fyt038) para obtener las secuencias aguas arriba que codifican esta fitasa (véase Figuras 18A-18B).

### **Ejemplo 5**

#### **Indicios de la actividad hidrolizante de fitato en cultivo líquido**

[0151] Se cultiva una especie fúngica seleccionada en medio definido que contiene diversas concentraciones de fosfato inorgánico y se someten a ensayo y comparan las características de crecimiento y producción de fitasa. Se usaron suspensiones de esporas ( $2 \times 10^6$  esporas/ml concentración final) para inocular un medio mínimo (Vogels) donde la concentración de fosfato se altera para ver cómo afecta al crecimiento y producción de fitasa. Se dejan crecer cultivos en 50ml de medio en cultivo en frasco de agitación a una temperatura de 25°C hasta 30°C. Los cultivos se recolectaron a las 24, 48, 72 y 96 horas. Se sometieron a ensayo los sobrenadantes de cultivo para detectar actividad de fitasa usando el método de Fiske y SubbaRow, Journal of Biological Chemistry 66:375-392 (1925). Puede determinarse el crecimiento mediante lecturas DO o peso en seco.

#### **5A. Efecto de las diferentes condiciones de medios en el crecimiento y morfología**

[0152] Se produce una serie de curvas de crecimiento fúngico para mirar el efecto de P disponible en el medio en el crecimiento y producción de fitasa. En algunos ejemplos, cuando el nivel de P es reducido, se observan cambios morfológicos en el crecimiento de los hongos que se asocian a condiciones de estrés (p.ej., fragmentación de micelio, granulado, crecimiento heterogéneo y una apariencia general de un color amarillo pálido). Esta cepa fisiológica puede relacionarse con la aparición de actividad de fitasa en un punto en la curva de crecimiento, por ejemplo, acercándose a la fase exponencial tardía. Los indicios morfológicos de utilización de ácido fítico pueden observarse en cultivos de bajo P (p.ej., 0,57 mM) complementados tras 24 horas de cultivo con 1 mM fitato como fuente de fósforo. Los cambios morfológicos observados sin fitato añadido pueden no ser evidentes, de hecho, las muestras de complemento pueden parecerse a cultivos en medios de alto P que no eran limitativos. Esta respuesta indicaría que se estaba produciendo una actividad hidrolizante específica de ácido fítico de manera que pudiera suministrarse P al hongo en crecimiento. Como salvedad, es posible que concentraciones mayores de fitato (p.ej., 5 mM) que complementen los cultivos den como resultado una falta de crecimiento celular. Dicho resultado sugeriría que el alto nivel de fitato en el medio que la minerales esenciales resultando en un medio que no puede soportar la nutrición y crecimiento fúngico.

[0153] En un estudio de ejemplo, el hongo se cultiva en medios que contienen

- Alto nivel de fosfato (1,14 mM)
- Bajo nivel de fosfato (0,57 mM)
- Bajo nivel de fosfato más 1mM de fitato complementado.

[0154] Se monitoriza el crecimiento a lo largo de 0, 24, 48, 72 y 96 horas mediante mediciones de peso en seco y se observan también las características morfológicas en respuesta a las diferentes condiciones de los medios. En una situación en la que la actividad hidrolizante de fitato que permite al hongo acceder al fosfato a partir del fitato, y así evita los esfuerzos por carencia de fosfato que el cultivo sufriría de lo contrario, podrían esperarse las siguientes observaciones principales:

1. Buen crecimiento en alto nivel de fosfato, morfología fúngica uniforme indicativa de un cultivo sano.
2. Crecimiento notablemente más pobre en condiciones de bajo nivel de fosfato, morfología fúngica heterogénea con indicios de acumulación y fragmentación de micelio. El cultivo puede tener una apariencia demasiado amarilla.
3. Cultivos similares a los de (2), cuando se complementan con fitato (el sustrato), ya no parecen encontrarse

bajo el mismo estrés fisiológico. El crecimiento de biomasa es similar a la condición (1) y la morfología fúngica es la misma que en la condición de alto nivel de fosfato.

4. Las curvas de crecimiento e indicios fotográficos respaldan estas observaciones.

## 5 5B. Actividad de fitasa en sobrenadantes de cultivo

[0155] Puede medirse la actividad de fitasa en los sobrenadantes de hongos que crecen en el medio con niveles variables de P inorgánico. Se usan muestras de sobrenadante para comparar la actividad en momentos específicos tras la inoculación. La actividad de fitasa puede expresarse como el número de  $\mu\text{moles}$  de P liberados por minuto por ml de sobrenadante del cultivo. Las actividades de la muestra se calculan a partir de frascos de cultivo por triplicado donde los sobrenadantes se someten a ensayo para detectar fitasa por duplicado. Las actividades se muestran como mean\_SD. Junto con las observaciones anteriores, puede observarse un claro estrés fisiológico asociado a cultivos en los que el fosfato es limitado, lo cual afecta de manera adversa al crecimiento, y unirse a la aparición de actividad de fitasa.

## 15 5C. Concentración de sobrenadantes de cultivo

[0156] Pueden esperarse indicios adicionales de la actividad de fitasa a partir del sobrenadante concentrado (proteína concentrada). Por ejemplo, pueden obtenerse muestras de proteína concentrada a partir de:

1. Cultivos de hongos de condiciones de estrés y bajo fosfato (donde se espera que se exprese fitasa),
2. Cultivos de hongos de alto nivel de fosfato y sin estrés, donde no se espera que se produzca fitasa, y
- 20 3. Cultivos complementados con bajo nivel de fosfato y fitato complementario.

[0157] Se espera que los geles de SDS-PAGE de tinción con plata de estas muestras de proteínas concentradas muestren un perfil de proteína que demuestra la aparición de una banda de proteínas (banda de fitasa putativa) en la proteína concentrada de la condición 1 (arriba) que no está presente en la condición 2. También se espera una aparición similar de esta banda en la condición 3, aunque a un nivel inferior. Basándose en la secuencia de aminoácidos de una fitasa específica, y en si parece ser una enzima extracelular, el tamaño de la proteína puede ser aproximado. Sin embargo, debería observarse que la modificación de la glicosilación en la enzima extracelular puede aumentar el MW.

### Ejemplo 6

## 30 Amplificación por PCR de fragmentos de gen de fitasa

### 6A. Diseño de cebador degenerado

[0158] Basándose en las alineaciones de secuencias de aminoácidos de fitasa publicadas, se diseña una gama de cebadores degenerados frente a las regiones catalíticas y estructurales conservadas. Dichas regiones incluyeron aquellas que son altamente conservadas entre las fitasas, así como aquellas conocidas por su importancia para la función y estructura de enzimas.

[0159] Por ejemplo, se alinean las secuencias de aminoácidos de fitasas publicadas. Debería observarse que muchas secuencias de fitasas se encuentran disponibles de manera pública en GenBank, y cada una queda incorporada aquí mediante referencia.

[0160] Se eligen regiones concretas que cumplen los criterios anteriores, y una gama de cebadores directos e inversos diseñados a partir de las secuencias de aminoácidos. Usando el código genético para el uso de codones, se sintetizan los cebadores de PCR con nucleótidos degenerados.

[0161] Como otro ejemplo, se diseñan cebadores a partir de la secuencia de aminoácidos publicada para diferentes fitasas de una sola especie (p.ej., *A. niger*). Estos cebadores pueden diseñarse como sigue:

- 45 1. Cebador 1: Cebador directo (5'-3') de, por ejemplo, el dominio de enlace de fosfato de una fitasa, que debería ser esencial para la actividad catalítica.
2. Cebador 2: Cebador inverso desde una región de fitasa central que parece estar relativamente bien conservada.

[0162] Todos los cebadores pueden sintetizarse en la dirección 5'-3'. El código genético estándar se utiliza para cambiar de aminoácido a codón triplete, y se usa el código IUB estándar para sitios de bases mixtas (p.ej., para designar I para A/C/T/G).

[0163] Como puede verse a partir de la alineación de secuencias para *A. niger* PhyA y PhyB, el dominio de enlace de fosfato está bien conservado con solo una diferencia de aminoácidos entre PhyA (RHGARYP; van Hartingsveldt *et al.*, 1993) y PhyB (RHGERYP; Piddington *et al.*, 1993). Puede diseñarse un cebador degenerado complementario a esta región en la versión PhyA de la secuencia solamente, es decir, usando  
5 RHGARYPT como la base para el diseño de cebador. Esto sería predisponer el cebador hacia un dominio de enlace de fosfato de tipo PhyA. Una segunda región conservada, que puede servir como la base para el cebador 2 de cebadores derivados de *A. niger*, se produce en la mitad de la secuencia de aminoácidos de PhyA y PhyB. Este dominio específico de fitasa central conservado en PhyA (FTHDEWI) corresponde a los aminoácidos 285-291. En PhyB, la secuencia de aminoácidos (FTQDEWV) corresponde a los aminoácidos 280-286.

10 [0164] Los cebadores degenerados desarrollados como se ha descrito arriba pueden usarse para amplificar una región de codificación de fitasa de otras especies mediante PCR, como se describe a continuación.

### 6B. Amplificación por PCR de fragmentos de gen de fitasa

[0165] El ADN genómico de una especie de interés puede usarse como plantilla para la amplificación por PCR de fragmentos de gen de fitasa putativos usando combinaciones de los cebadores realizados según la descripción anterior. Se lleva a cabo la PCR usando PCR Ready-to-go Beads de Amersham Pharmacia. Las condiciones se determinan mediante experimentos individuales, pero normalmente se realizan treinta ciclos en un termociclador Techne. Se verifica el éxito de la amplificación mediante electroforesis de la reacción de PCR en un gel de agarosa al 1%. Puede anticiparse un producto de fitasa de la PCR que es amplificado por los cebadores por un tamaño esperado correcto. A continuación, se purifica el producto mediante extracción en gel usando el kit Qiaquick Spin Gel Extraction de Qiagen. El producto de la PCR purificado es ligado al pGEM-T Easy vector System (Promega Corporation) para facilitar la clonación. Las reacciones de ligación son incubadas a 4°C durante la noche en un volumen total de 10 ml que contiene 0,1 volúmenes de amortiguador ligasa 10x y 1 ml (1 U.ml<sup>-1</sup>) de ADN ligasa T4. Normalmente se usa un inserto de ADN en la reacción en una ratio molar de 1-4:1 del inserto a ADN del vector. Se extrae una alícuota de 100 ml de células XL-1 Blue de *E. coli* competentes con CaCl<sub>2</sub> del almacenamiento a -80°C y se descongelan en hielo para su transformación. Se añaden 3ml de mezcla de ligación a las células y se incuba la mezcla en hielo durante 20 minutos. A continuación, las células se someten a choque término a 42°C durante 1 minuto y se devuelven al hielo durante 5 minutos. Se añade la mezcla de transformación a 0,9 mL de caldo L, y se incuban las células con agitación y sin selección para permitir la expresión del producto génico de resistencia a ampicilina antes de aplicar la selección (37°C, 1h). A continuación se extienden alícuotas de 200, 300 y 400 ml de este cultivo directamente sobre placas de agar selectivo. Se incuban las placas durante la noche a 37°C. Las colonias que contienen plásmidos recombinantes se visualizan usando selección azul/blanco. Para una exploración rápida de transformantes recombinantes, se prepara ADN plasmídico de cultivos de colonias positivas (blanco) putativas. El ADN es aislado por el método de Birnboim y Doly siguiendo el protocolo expuesto en Sambrook *et al.* (1989). La presencia del inserto correcto (650pb) en el plásmido recombinante se confirma mediante análisis de restricción. El ADN es digerido con enzimas de restricción (p.ej., Not1-pPst1) durante la noche a 37°C, y los productos de digestión se visualizan mediante electroforesis en gel de agarosa. Diversos clones pueden contener el inserto de tamaño correcto y pueden seleccionarse para secuenciación manual para ver si el inserto es un fragmento del gen de fitasa. Se secuencian los insertos usando el método de terminación de cadena didesoxi de Sanger *et al.* (1977) con una forma modificada de T7 ADN polimerasa (Sequenase version 2.0). Las reacciones se llevan a cabo usando reactivos proporcionados en el kit Sequenase version 2.0 (Amersham Life Science-United States Biochemical Corporation), siguiendo el protocolo del fabricante. La secuencia parcial de los clones de extremo puede indicar que se ha clonado un fragmento del gen de fitasa. La secuenciación completa de los insertos de doble cadena se lleva a cabo en ADN plasmídico de estos clones.

### 45 6C. Análisis de la secuencia

[0166] Las secuencias se analizan mediante BLAST y herramientas de secuencias de traducción de proteínas. La comparación BLAST al nivel de nucleótidos puede mostrar diversos niveles de homología para secuencias de fitasa publicadas. Inicialmente, las secuencias de nucleótidos se remiten a BLAST (Basic BLAST version 2.0) accediendo a la base de datos de BLAST en internet. La página web utilizada es <http://ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>. El programa elegido es **blastn**, y la base de datos elegida es **nr**. Se emplean valores de parámetros por defecto/estándares. Los datos de secuencias para fragmentos de gen putativos se introducen como **secuencia en formato FASTA** y se remite la consulta a BLAST para comparar estas secuencias con aquellas existentes en la base de datos.

55 [0167] Las secuencias se someten después a una herramienta de traducción de ADN a proteína llamada máquina proteínica. Esta herramienta también está disponible en internet en <http://medkem.gu.se/edu/translat.html>. Otra herramienta de traducción adecuada es conocida como Translation Machine, disponible en internet en <http://www2.ebi.ac.uk/translate/>. Las secuencias de ADN de fragmentos de

gen de fitasa putativos se insertan en el bloque de análisis, y se usa el código genético estándar como la base para la traducción. Las traducciones se llevan a cabo en los tres marcos y las cadenas *forward* y *reverse*. La secuencia de aminoácidos traducida se presenta en la pantalla mediante la herramienta de análisis como secuencia de aminoácidos en código de una letra. Idealmente, el análisis de la secuencia de aminoácidos mostrará que el fragmento contiene ambos extremos correctos (como se usa para diseñar los cebadores), contiene el motivo de enlace de P esencial y quizá otros residuos que también se encuentren presentes en secuencias de fitasa publicadas. A partir de esto, se puede concluir que el fragmento clonado es un fragmento del gen de fitasa.

**[0168]** Las alineaciones de secuencia y análisis de aquellas alineaciones se llevan a cabo a nivel de aminoácidos y nucleótidos usando el programa ALIGN (Alignment Editor Version 4/97; Dominick Hepperle, Fontanestr. 9c, D016775, Neuglobsow, Alemania). En el desarrollo del análisis, se pegan las secuencias sometidas y se utiliza el formato PHYLIP Interleaved. El análisis de homología se lleva a cabo usando la sección "Analyze" del programa y específicamente la opción denominada "Distance Analysis." Esto calcula el porcentaje de homología y el número de sitios diferentes entre especies, usando un mínimo de dos secuencias de aminoácidos (es decir, dos "especies"). Las homologías máximas y mínimas se calculan como %. La base para el análisis de homología se realiza como porcentaje de identidad, en el cálculo de "número de aminoácidos (o bases) idénticos dividido por el número total de aminoácidos (o bases) multiplicado por 100" para dar un valor porcentual. Las secuencias de aminoácidos se sitúan en el programa ALIGN junto con secuencias de fitasa publicadas y se lleva a cabo una alineación manual a nivel de aminoácidos. A partir de esto, puede obtenerse la traducción deducida para el producto de PCR obtenido usando cebadores degenerados.

### Ejemplo 7

#### Análisis southern para la producción de biblioteca

**[0169]** Se digiere ADN genómico de diferentes especies con una gama de enzimas de restricción durante la noche a 37°C. El ADN digerido con éxito se analiza sobre gel de agarosa al 1% en preparación para la transferencia a la membrana de nylon. Tras completar la electroporesis, el gel de agarosa se pone a remojo durante 10 minutos en 0,2 M HCl para despurinar el ADN y después se enjuaga brevemente en ddH<sub>2</sub>O. El ADN es transferido a la membrana Hybond<sup>+</sup>-N+ (Amersham International PLC) mediante transferencia capilar alcalina. La transferencia se prepara de manera que el filtro de nylon quede situado entre el gel y una pila de papel absorbente. Se prepara una mecha de papel Whatman 3MM (Schleicher y Schuell, Dassel, Alemania) en una placa de vidrio sobre un depósito de amortiguador de transferencia (0,4M NaOH). Se invierte el gel en la mecha, con cuidado para evitar la formación de burbujas de aire, y se rodea por tiras de Nescofilm para evitar que la acción de transferencia del papel eluda el gel en los bordes. Se cubre el gel con una pieza de igual tamaño de membrana Hybond<sup>+</sup>-N+ que ha sido cortada en la esquina para coincidir con el gel y que ha sido mojada previamente en 3xSSC. A continuación, se sitúan 3-5 piezas de papel de 3MM en la parte superior del filtro y se completa la transferencia añadiendo una tira de papel secante de 10 cm seguido de un peso de 0,5 kg. Se deja la prueba de 8-24 h para transferir el ADN. A continuación, se lava la membrana brevemente en 2xSSC a temperatura ambiente y se calienta en una estufa de vacío a 80°C para fijar el ADN a la membrana. Se usa un fragmento aislado de los procedimientos anteriores para sondar el Southern blot. En primer lugar, se etiqueta con isótopo <sup>32</sup>P mediante el uso del kit High Prime DNA Labeling (Boehringer Mannheim). Se añade fragmento desnaturalizado en una reacción de marcaje con cebado aleatoria que incorpora adenina radiomarcada. El Southern blot es prehibridado durante 1 hora a 42°C en 12 mL de amortiguador Easy-Hyb (Boehringer Mannheim) en un tubo de hibridación. La sonda radiomarcada es desnaturalizada y se añade a 5 mL de amortiguador de hibridación Easy-Hyb y se deja hibridar durante la noche a 42°C. Tras la hibridación, se lava la transferencia mediante incubación en 40 mL 3xSSC, 0,1%SDS durante 15 minutos a 42°C. Este lavado de baja astringencia se repite con solución de lavado nueva. Tras el lavado de astringencia, se enjuaga el lote en 3xSSC, se sella en un plástico transparente y se expone a película de rayos X. Se deja durante 2 horas y se revela la película.

**[0170]** Se pueden observar fuertes bandas de hibridación para una digesta de especie concreta. Dichos resultados indican que el fragmento puede usarse como sonda para la exploración de bibliotecas.

### Ejemplo 8

#### Aislamiento de una secuencia de polinucleótido del genoma de una especie de interés que codifica una fitasa

##### 8A. Generación y exploración de biblioteca genómica

**[0171]** Tras el análisis de hibridación Southern, puede fabricarse una biblioteca genómica parcial para probar y

clonar un gen de fitasa de longitud completa. Se genera una biblioteca de plásmidos de tamaño limitado que se dirige a un fragmento de digestión (según se estima a partir del análisis Southern). El ADN genómico digerido se analiza en gel de agarosa al 1,25%. Los fragmentos digeridos de un tamaño aproximado preferido se extraen del gel y se purifican mediante Glass-Max ((Gibco-BRL, Escocia). Los fragmentos genómicos purificados se usan en una reacción de ligación aleatoria o "shotgun" con vector pSK II Bluescript (Stratagene) linealizado con nucleasa de restricción. Primero el vector es desforforilado antes de la ligación y la reacción de ligación se lleva a cabo a 14°C durante la noche. Se produce la biblioteca mediante transformación de células ultracompetentes E.coli XL-10 Gold (Stratagene). Se extraen del almacenamiento a -80°C alícuotas de 100 ml de células y se descongelan en hielo para su transformación. Se añaden 4 mL de b-mercaptoetanol a las células en hielo. Se añaden 3ml de mezcla de ligación a la mezcla y se incuba la mezcla en hielo durante 20 minutos. A continuación, las células se someten a choque térmico a 42°C durante 30 segundos y se devuelven al hielo durante 2 minutos. Se añade la mezcla de transformación a 0,9mL de caldo NZY y se incuban las células con agitación y sin selección para permitir la expresión del gen de resistencia a ampicilina. Las células transformadas se colocan en placas de agar LB de selección azul/blanco y se dejan incubar durante la noche a 37°C. Las colonias se elevan hacia filtros de nitrocelulosa por el método de Maniatis (10% SDS - lisis, 3 minutos; 1,5 M NaOH- desnaturalización, 5 minutos; 1,5M TrichHCl - neutralización, 5 minutos; 3xSSC - enjuague, 5 minutos). A continuación, se calientan los filtros durante 2 horas a 80°C en vacío para fijar el ADN. La biblioteca se explora con sonda de 636pb radiomarcada con <sup>32</sup>P de la misma manera que en la hibridación Southern. Tras la hibridación, se lavan los filtros dos veces en 3xSSC, 0,1%SDS, 42°C, 15 minutos. A continuación, se enjuagan los filtros en 3xSSC, se sellan en plástico y se exponen a película de rayos X durante la noche a -80°C. Se identifican los puntos de hibridación positiva sobre la película. Estos se alinean con las placas de agar que contienen los transformantes. Los puntos de hibridación se emparejan con colonias sencillas en las placas de agar. Todas las colonias en el radio del punto de hibridación se recogen usando asas estériles y se utilizan para inocular 2 mL de caldo Luria. Se dejan crecer los cultivos a 37°C durante 2 horas. Se realizaron diluciones de los cultivos de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup> y se colocan 100 mL de cada muestra en placas de agar LB-amp y se incuban durante la noche a 37°C. Las placas que tienen entre 10 y 150 colonias en ellas se eligen para continuar con una segunda exploración. Se llevan a cabo las elevaciones de colonias como antes y se procesan los filtros usando los mismos procedimientos. Se prepara sonda marcada con <sup>32</sup>P nueva y se exploran los filtros del mismo modo que se ha explicado previamente. Se llevan a cabo lavados de astringencia usando 2xSSC, 0,1%SDS a 42°C durante 15 min. A continuación, se enjuagan los filtros en 2xSSC, se sellan en plástico y se exponen a película de rayos X durante 2 horas. La película desarrollada debería mostrar los puntos de hibridación, coherentes con la amplificación de las colonias positivas de la primera exploración. A continuación, se alinea la película con las placas y se coordinan los puntos para ver si corresponden con colonias aisladas simples. Se eligen los mejores positivos que coinciden con las colonias simples y se usan para inocular caldo Luria para preparaciones de ADN plasmídico. El ADN plasmídico se purifica mediante el kit Qiaspin Mini-Prep (Qiagen) y se lleva a cabo análisis de restricción para estimar el tamaño de los insertos. Todos los clones que dan el mismo perfil de restricción pueden usarse para sugerir un tamaño de inserto. Los clones pueden secuenciarse parcialmente para determinar si son el gen/fragmento de gen correcto. Después, se determina la secuencia completa de estos clones.

#### 40 **8B. Comparación del porcentaje de identidad entre fitasas fúngicas**

[0172] El producto de polipéptido deducido del fragmento de gen de fitasa clonado se usa para el análisis de homología con fitasas publicadas. El análisis muestra el porcentaje de identidad y, junto con el análisis de la secuencia traducida, puede proporcionar indicios de que el fragmento de gen clonado es un homólogo de una fitasa específica.

#### 45 **8C. Generación y exploración de una biblioteca genómica de tamaño limitado basada en enzima de restricción para aislar restos del gen de fitasa**

[0173] Para aislar la parte restante de un gen, puede usarse una segunda enzima de restricción para generar una segunda biblioteca genómica parcial y a continuación pueden subclonarse juntos los fragmentos. Los sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción presentes en una secuencia de fitasa clonada se identifican usando Webcutter. Resultan de especial interés los sitios para enzimas que se usan en el análisis Southern analizado arriba. Los fragmentos muy grandes (p.ej., 8Kb) serían difíciles de clonar en una biblioteca basada en plásmidos. Un bajo grado de hibridación con una banda de enzima de restricción específica aboga en contra del uso de los mismos en una exploración de la biblioteca y la presencia de dos bandas en una vía de enzimas de restricción es probable que complique el proceso de exploración. La biblioteca se realiza como antes en pBluecript SKII, y se explora usando la misma sonda. Se elige una selección de colonias de hibridación positiva y se alinean con las colonias en las placas. Se recogen las colonias coincidentes para las preparaciones de ADN plasmídico. El análisis de restricción puede mostrar cuántos clones tienen insertos. Después, estos clones son secuenciados completamente.

**8D. Amplificación de gen de fitasa contiguo para expresión heteróloga**

5 **[0174]** Se produce una secuencia de fitasa compuesta a partir de clones genómicos y se usa para diseñar una serie de cebadores aguas arriba y aguas abajo que podrían usarse para amplificar una secuencia de gen de fitasa contiguo. También se diseña una amplificación por PCR para facilitar la clonación y expresión del gen de fitasa completo en un vector de expresión heterólogo (p.ej., pGAPT-PG, un constructo de 5,1 Kb proporcionado por Genencor International, Inc.). Se determinan los sitios de enzimas de restricción en el sitio de clonación múltiple del vector que no están presentes en la secuencia del gen de fitasa. Puede diseñarse una variedad de cebadores flanqueantes 5' y 3' usando la secuencia del gen de fitasa y modificarse para incluir los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción para estas enzimas.

10 **[0175]** Se diseñan sitios de reconocimiento de enzimas de restricción en las secuencias de cebadores para facilitar la clonación en el vector de expresión. Las regiones flanqueantes aguas arriba y aguas abajo usadas para diseñar los cebador se eligen de manera arbitraria a aproximadamente 100 pb aguas arriba del codón ATG (inicio) y aguas abajo del codón TAG (terminación) respectivamente. La secuencia de gen usada se elige también para contener el mejor equilibrio de bases posible.

15 **[0176]** La amplificación del gen de fitasa por PCR puede realizarse usando combinaciones de ADN genómico de cebadores. La PCR debería amplificar una región correspondiente al gen de fitasa de longitud completa. El producto deseado producido por la amplificación con los cebadores es clonado en un vector y se seleccionan diversos clones que contienen el tamaño correcto de inserto para la secuenciación. A continuación, se lleva a cabo el análisis de homología de las secuencias de clones y se determina una secuencia de fitasa de longitud completa.

20

**[0177]** Se lleva a cabo la amplificación por PCR de ADN genómico usando una combinación de cebadores 5' y cebadores 3' y usando un ADN polimerasa de alta fidelidad, *Pfu*, para minimizar el error de expresión del gen de fitasa. Esta polimerasa es *Pfu* ADN polimerasa (Stratagene) y viene como parte del kit *Pfu* ADN polimerasa para PCR. Para estas reacciones, se mezcla amortiguador de reacción, dNTP, ADN diana y cebadores y 2,5 unidades de *Pfu* polimerasa añadidas en un volumen de reacción final de 50  $\mu$ L. Tras la amplificación, se analiza una alícuota de 5  $\mu$ L de la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel. Los fragmentos seleccionados se clonan directamente en el vector pCR-Blunt II TOPO (Invitrogen) y se analiza un número seleccionado de clones para confirmar la presencia del inserto correcto. (Los productos de PCR de extremos romos que se generan mediante *Pfu* ADN polimerasa se clonan en el kit de clonación Zero Blunt\_ TOPO\_PCR (Invitrogen)). Este vector contiene un sitio de clonación múltiple (MCS, en inglés) y un gen de kanamicina para resistencia antibiótica, pero también permite la selección basada en la alteración del gen *ccdb* de *E.coli* letal, a diferencia de la selección azul-blanco. Se añade producto de PCR (50-200ng) purificado a 1  $\mu$ L de vector pCR-BluntII-TOPO y se lleva el volumen de reacción a 5  $\mu$ L con agua estéril. Esto se mezcla suavemente y se deja incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añade 1  $\mu$ L de 6 x TOPO Cloning Stop Solution y se deja la reacción en hielo o se congela a -20°C durante un periodo de hasta 24 horas para la transformación. La integridad de los sitios de restricción sometidos a ingeniería genética se confirma también mediante este análisis. Se preparan y secuencian una variedad de clones. Los análisis de secuencia pueden confirmar la presencia de un gen de fitasa de longitud completa. A continuación, este gen puede desarrollarse para su expresión en un sistema heterólogo y caracterización bioquímica posterior de la enzima.

25

30

35

**8E. Análisis de la secuencia de fitasa**

**[0178]** Se realiza una alineación de la secuencia aislada y fitasas publicadas y se lleva a cabo un análisis de homología sobre la base del porcentaje de identidad.

**Ejemplo 9****Clonación, expresión y caracterización de la fitasa**

45 **[0179]** La sobreexpresión del gen de fitasa en un huésped heterólogo puede realizarse para producir suficiente proteína para llevar a cabo la caracterización de la enzima.

**9A. Clonación del gen de fitasa en el vector de expresión y transformación en un huésped**

**[0180]** El gen de fitasa de longitud completa es amplificado con un ADN polimerasa de alta fidelidad, es producido usando cebadores que se modifican para contener dos sitios de enzima de restricción (p.ej., EcoRV y AgeI). Estos sitios se usan para facilitar la clonación en el vector de expresión (p.ej., pGAPT-PG). Los clones de fitasa son digeridos con las enzimas para producir un fragmento de inserto sencillo. El vector también es digerido con estas enzimas y linealizado. El fragmento de gen de fitasa se liga al vector de expresión y se produce un número de transformantes. Se analiza una selección de estos clones para confirmar la presencia del inserto. A

50

continuación, se usan clones de fitasa para transformar esporas hinchadas de *A. nidulans* mediante electroporación.

5 **[0181]** La transformación de huésped como cepa *A. niger* FGSC A767 y *A. nidulans* FGSC A1032 mediante electroporación se adapta a partir del protocolo de O. Sanchez y J. Aguirre desarrollado para *A. nidulans*. Se inoculan 50 mL de medio YG (extracto de levadura 0,5%, glucosa 2%, complementado con 10mM de uridina y 10mM de uracilo) a  $10^7$  esporas/mL con suspensión de esporas apropiada. Se dejan crecer los cultivos durante 4 h a 25°C a 300 rpm en un agitador giratorio. Se recogen las esporas hinchadas mediante centrifugación a 4000rpm durante 5 minutos a 4°C. Las esporas se resuspenden en 200 mL de agua estéril helada y se centrifugan a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante es vertido y las esporas se resuspenden en 10 12,5 ml de medio YED pH 8,0 (extracto de levadura 1%, glucosa 1%, 20mM HEPES) y se incuban durante 60 minutos a 30°C a 100 rpm en un agitador giratorio. Las esporas se recogen mediante centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos, a continuación se resuspenden en 1 mL de amortiguador EB helado (10 mM tris-HCl, pH 7,5, 15 270 mM sacarosa, 1 mM acetato de litio) a una concentración de  $10^9$  conidios.mL<sup>-1</sup> y se guarda en hielo. 50\_ L de la suspensión de esporas hinchadas se mezcla con una cantidad de 1 a 2 µg de ADN en un volumen total de 60 µl en Eppendorf estéril y se guarda en hielo durante 15 minutos. La suspensión se transfiere a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La electroporación se lleva a cabo en un dispositivo de electroporación BioRad (ajustes 1 kV, 400 W, 25 µF). Se añade 1 mL de YED helado a la suspensión tras la electroporación y se transfiere la mezcla combinada a un tubo Falcon de 15 mL estéril prerrefrigerado y se guarda en hielo durante 15 minutos. A continuación, se incuba a 30°C durante 90 minutos a 100 rpm en un agitador giratorio, con los tubos 20 en una posición horizontal. Las esporas se colocan en placas y se observan los transformantes tras 36-48 horas.

**[0182]** Puede usarse ADN plasmídico circular. Puede obtenerse cepa *A. niger* FGSC A767 y cepa *A. nidulans* FGSC A1032 a partir del Fungal Genetics Stock Center, University of Kansas Medical Center, 3901 Rainbow Boulevard, Kansas City, Kansas, Estados Unidos.

#### 9B. Caracterización preliminar de transformantes

25 **[0183]** Se seleccionan los transformantes para mayor análisis. Se utilizan esporas de cada uno de estos transformantes para inocular medio selectivo y se realizan suspensiones de esporas de cada clon. Estas se usan para inocular cultivos líquidos de los transformantes que se exploran para detectar actividad de fitasa. Se dejan crecer cultivos durante 72 horas y se recogen los sobrenadantes. Las muestras se desalan en columnas PD-10 y las muestras de proteínas son eluidas en 0,25 M acetato de sodio. Se llevan a cabo ensayos de fitasa en las 30 condiciones estándares (pH 5,5, 37°C durante 30 minutos). Se identifican los clones que tienen actividad de fitasa. Estos se seleccionan para mayor análisis.

#### 9C. Tiempo de máxima expresión de fitasa en cultivo líquido

35 **[0184]** Para evaluar cuando el nivel de producción de fitasa se encuentra en su punto más alto para la posterior caracterización bioquímica, se genera una serie de cultivos líquidos de clones durante un periodo de 2 días a 7 días. Los cultivos son inoculados con suspensión de esporas de los transformantes apropiados y se recolectan cada día durante este periodo. Se procesan los sobrenadantes del cultivo de manera estándar y se somete a ensayo el sobrenadante de cultivo desalado en condiciones de fitasa estándares. A continuación, se determina el momento de mayor actividad de fitasa.

40 **[0185]** Los cultivos líquidos se recolectan en cada momento temporal, se desalan y eluyen en 0,25 mM de acetato de sodio pH 5,5. Se llevan a cabo ensayos de fitasa en condiciones estándares (pH 5,5, 37°C, 30 minutos) por duplicado. La actividad se expresa en unidades de fitasa por mL de sobrenadante de cultivo (µmoles de Pi liberado min<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>).

45 **[0186]** El huésped no transformado también puede someterse a ensayo a través de estos puntos temporales como control. Las muestras de proteína de muestras de sobrenadante seleccionado (día 4 y día 6), tanto antes como después de la desalación, se analizan mediante SDS-PAGE para determinar los niveles de secreción.

#### 9D. Análisis Southern de los transformantes

50 **[0187]** Aunque puede haber indicios de que el gen de fitasa ha sido clonado con éxito en el vector de expresión, y que se ha logrado la expresión de una enzima activa, también pueden obtenerse indicios moleculares. Se realizan preparaciones de ADN genómico a partir del huésped transformado y a partir del huésped no transformado original. El ADN es digerido con una enzima de restricción, preferiblemente una en la que no haya sitio interno en el gen de fitasa, y se lleva a cabo análisis de hibridación Southern de los transformantes. Las transferencias Southern se analizan con una sonda de fitasa a partir de especies en investigación. Las bandas

de hibridación sencillas fuertes observadas para los transformantes en condiciones de media a alta astringencia (3xSSC) indican una clonación con éxito. Si no hay indicios de otras bandas de hibridación, puede concluirse que una sola copia del gen de fitasa está presente en el huésped transformado. Una falta de bandas de hibridación en la muestra no transformada indica que no hay homología entre la fitasa de interés y ninguna fitasa presente en el genoma huésped.

#### 9E. Caracterización bioquímica de una fitasa

[0188] Para probar que el gen clonado representa una actividad de fitasa específica, y para caracterizar esa actividad, se llevan cabo una gama de análisis bioquímicos sobre la enzima sobreexpresada. La caracterización preliminar puede indicar que el gen está produciendo una actividad hidrolizante de ácido fítico. Este análisis puede extenderse para examinar la actividad a diferentes pH, temperaturas y frente a diferentes sustratos.

[0189] Se seleccionan los transformantes para estos análisis y los cultivos se recolectan en momentos de expresión óptima, como se ha determinado arriba. Con ácido fítico como el sustrato, puede mostrarse el efecto del pH en la actividad enzimática. La muestra de enzima purificada es desalada a partir del sobrenadante de cultivo, y eluida en 0,025mM de acetato de sodio pH 5,0. A continuación, esto se añado al sustrato que es realizado en soluciones de los siguientes amortiguadores; pH 3,0: 0,4 M glicina-HCl, pH 4,0: 0,4 M acetato de sodio, pH 5,0: 0,4 M acetato de sodio, pH 6,0: 0,4 M imidazol-HCl, pH 7,0: 0,4 M Tris-HCl, pH 8,0: 0,4 M Tris-HCl, pH 9,0: 0,4M Tris-HCl. También, puede determinarse un pH óptimo para la actividad de fitasa. La poca actividad observada cuando se usa como sustrato 4-nitrofenil-fosfato indica un nivel alto de especificidad para el sustrato de ácido fítico.

[0190] El perfil de temperatura de la enzima se caracteriza usando amortiguador pH 5,0, con una gama de temperaturas, usando ácido fítico como el sustrato. Puede determinarse el margen de actividad de temperatura de fitasa y la temperatura de actividad óptima.

[0191] También pueden llevarse a cabo estudios de estabilidad preliminares sobre la fitasa. Las muestras de la proteína se dejan a -20°C, 4°C y 37°C durante la noche y se someten a ensayo después bajo condiciones estándares. Las muestras pueden también exponerse a alta temperatura (p.ej., 80-105°C durante 5-25 minutos) para determinar la termoestabilidad de la actividad de fitasa. La actividad residual se basa en la comparación con las determinaciones de actividad de fitasa tomadas a partir de muestras antes de la exposición a cada condición. Las muestras pueden someterse a ensayo a continuación en las mismas condiciones de ensayo.

**Reivindicaciones**

1. Una enzima fitasa que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia de aminoácidos del 95% con una secuencia de aminoácidos expuesta en las Figuras 2, 3 o 19A-19C, donde la enzima fitasa es capaz de hidrolizar fitato para liberar fosfato inorgánico.
- 5 2. La enzima fitasa de la reivindicación 1, que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100% con una secuencia de aminoácidos expuesta en las Figuras 2, 3 o 19A-19C.
3. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima fitasa de la reivindicación 1 o reivindicación 2.
- 10 4. Un constructo de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 3.
5. Un vector que incluye el constructo de expresión de la reivindicación 4.
6. Una célula huésped transformada con el vector de la reivindicación 5.
7. Un método de producción de una enzima que tiene actividad de fitasa, que comprende:
  - 15 (a) proporcionar una célula huésped transformada con un constructo de expresión según se define en la reivindicación 4;
  - (b) cultivar dicha célula huésped transformada en condiciones adecuadas para que dicha célula huésped produzca dicha fitasa; y
  - (c) recuperar dicha fitasa.
- 20 8. El método de la reivindicación 7, donde dicha célula huésped es una especie *Aspergillus*.
9. Un alimento o pienso animal que incluye una enzima fitasa que presenta actividad de fitasa de la reivindicación 1 o reivindicación 2.
10. Un método para separar fósforo de fitato, que comprende tratar dicho fitato con una enzima fitasa de la reivindicación 1 o reivindicación 2.

25

30

35

## FIG. 1

TGCACTACTGTCGATGGCGGTTACCAATGCAATTCGAGCTCTCACACAAGTGGGGCCAGTATTCCGCCCTATTTCTCTCT  
 TTCCGAAGAATCATCCATCTCGAATGAGGTACCTCATGATTGTCAGATCACTTTTGCTCAAGTGATCTCCCGTCATGGTG  
 CTCGATTCCCGTCCGCGAAGAAGAGCAAGGTATATGCCAAGCTCATTGAAAATATCCAAGCGAACCGGACTGCATACAAT  
 GGCAACACGAAGTTCTCCGCTCATACAAGTACACCATGGGCGGTGATGATTTGGTACCCTTCGGAGTGAACCAGACGGT  
 GGACTCGGGGACCAAATTCTACCAGCGCTACGAGGCGTTGGCGAAGAAAGCTGTGCCCTTCATTCCGGTCATCTGACTCAG  
 GCGCGGTTGTGGCTTCAGGCGTGAACCTTTATCAAGGGATTCCAGCAGGCAAAGTTGGATGATAAAAATGCCAATCACCGT  
 CAGCCAAGCCCCAAAACCAACGTCATCATCTCAGAAGAGTCTGGCACCACCAACTCTGAACCACAGCGAGATCTGTCC  
 TAAGTTCGAAGACAATGAGCTGGGCGACAAGGTGGAAGAAAATACATGAAAATCTTTGTGCCGCCCATCCGAGCTCGTC  
 TCGAGGCCGATCTCCCTGGCGTTAAACTTGAAGACATCGATGTTGTCAGTCTGATGGACATCTGCCCTTTCGAGACAGTG  
 TCTCAAGTGACGACGCGAGCCGAGCTATCTCCATTCTGCGACCTCTTCAACCCGACCGAATGGAGCCAATATGACTACCT  
 CCAGTCGTTAAGCAAGTACTATGGTTATGGCGCCGGCAATCCTCTCGGCCGACCCAGGGTGTGGTTTCGTAAACGAAC  
 TGATTGCCCCGACTCACTCGCCACCCAGTGAGAGACCACACAAGCACAAACCGTGGCGCTCGATGCCCGGCGCTGCGACA  
 TTCCCCCTCAACTACACCATGTATGCCGACTTCACGCATGACAACGGAATGATCCCGTTCTTCTTTGCTTTGGGGCTGTA  
 CAACGGCACCGCTCCACTCTCGCTCACCCAGTCCAGTCTCCTAGCCAAACAGACGGGTTCTCATCCGCCTGGACAGTCC  
 CCTTCGGTGTTCGGGCTTATGTTGAGATGATGCAATGTGCTCGGGAACCTGAGCCGCTCGTGGAGTCTCGTTAATGAC  
 CGTGTATTCCGCTGCACGGTTGCCCGGTGGATAAACTGGCCGTTGTGCGCGTCTGATTTCTGTAAGGGGCTTACTTT  
 CGCACGCTCTGGCGGCGACTGGGCCAGGTGTATAAA

## FIG. 2

CTTVDDGGYQCNSLSHKWGQYSPYFSLSEESSISNEVPHDCQITFAQVISRHGARFPSAKKSKVYAKLIENIQANATAYN  
 GNTKFLRSYKYTMGGDDLVPFGVNQTVDSGTKFYQRYEALAKKAVPPIRSDSGRVVASGVNFIKGFQQAQLDDKNANHR  
 QPSPKTNVIISEESGTNNLNLHSEICPKFEDNELGDKVEEKYMKIFVPPIRARLEADLPGVKLEDIDVVS LMDICPFETV  
 SSSDDAAELSPFCDLFTPEWSQYDYLQSLSKYYGYGAGNPLGPTQGVGFVNELIARLTRHPVRDHTSTNRALDAPGAAT  
 FPLNYTMYADPTHNGMIPEFFALGLYNGTAPLSLTHVQSPSQTDFSSAWTVPPGARAYVEMMQCRREPEPLVRVLVND  
 RVIPLHGCFVDKLGRCRRRDFVKGLTFARSGGDWARCYK

### FIG. 3

ASRNQSTCTTVDGGYQCNSLSHKWGQYSPYFSLSEESSISNEVPHDCQITFAQVLSRHGARFPPSAKSKVYAKLIENIQ  
 ANATAYNGNTKFLRSYKYTMGGDDLVPFGVNOQTVDSGTFKYQRYEALAKKAVPFIRSSDSGRVVASGVNFIKGFQOAKLD  
 DKNANHRQPSPKTNVILSEESGTNNLNLHSEICPKFEDNELGDKVEEKYMKIFVPPIRARLEADLPGVKLEDIDVVSIMD  
 ICPFETVSSDDAAEELSPFCDLFTTEWSQYDYLQSLSKYYGYGAGNPLGPTQGVGFVNELIARLTRHPVRDHTSTNRAL  
 DAPGAATFPLNYTMYADFTHDNGMIPFFALGLYNGTAPLSLTHVQSPSQTDGFPSSAWTVPPGARAYVEMMQCRREPEPL  
 VRVLVNDRVIPLHGCPVDKLGRCRRRDFVKGLTFARSGGDWARCYK

### FIG. 4

TGTGAGTATGACGGGAGCTGTAATGACATCTCTCGGCTCTGGGGACAGTACTCTGCATACTTCCCAATCCCGTCTGAGCT  
 TGATGCCTCAACACCAGACGATTGTGATGTGACTTTTGCACTCGTCTTGTCCCGCCATGGAGCCAGGTACCCAACGGACA  
 GCAAGTCTGCAGCATAACAAGCTACCATGCCCCGATTCAAAAGTCTGCTACCATGTACGGCAAGAATAACAAGTGGCTT  
 AAGGAGTATACCTACAGTCTCGGCGCTGAAGACCTGACTGAGTTTGGCCAGCGGCAGATGGTCGACTCTGGTAGGGCCTT  
 TTATGAGCGGTACATGAGTCTCGCTGAGAAGACTGAGCCTTTTGTTCGGGCATCGGGCTCAGATCGGGTCATCATGTCTGT  
 CTTACAATTTTACGCAAGGCTTTTACGCATCGCGAGGAGAGTCTGGAGACGATTATACTCAGGATGTTCTTATCATCCCT  
 GAAGAACCCTGGCATCAACAACACCATGTTGCATGGATCGTCCGCTCATTGAAAGCGACAGAGTTCCTAAAGACGCAGA  
 TGAAAAGGCCGAGGTTGCATGGGGAGCAAGATTCCTCCCGAGATTGAAATAGGTTGAACCACCACCTGCCAGGAGTCA  
 ACCTGACGCTGGAGGAAACCATCTACATGATGGACATGTGTCCGTTCTCGCGGCTGACACACCTGATGGCGCTGGTCAC  
 TCGAGGTTCTGCGACCTCTTCAACAAGGCAGACTGGCGAAGTTACGACTACTACATGACTCTGAGCAAGTTCTACAAGTT  
 TGGCAATGGCAATGCCATGGGACCGACACAAGGTGTTGCATATGTCAACGAACTCATCTCAGCTTGACTGGGAAGCCTG  
 TTGACGACCACACCAGACCAACAGCACATTGGACTCATCGCCAAAGACGTTCCCTCTTGACAGGGCTCTATATGCGGAT  
 TTTAGCCACGACAACAGCATGGTCTCCATCTTCTCAGCACTGGGCTTGTACAACCTCGACTACCCCTGCTACCAAAGGACCA  
 TATTGTGCCCGCATCAAGGCGCACGGCTACTCATCGACATGGGTAGTCCCCTTTGGAGCCAGAATGTACGTCGAGAAGC  
 TCGAGTGTGGTCCAGCAGGAATGAAAAGAGAGACGAGTACCTGCGAGTCCCTGGTCAACGACCGAGTGATGTCTGCTCGAA  
 ACCTGCGGAGGCGACGAGTACGGGCTCTGCAGACTAGAAAACCTTTGTGGAGAGTCTGTCTGTTGCCGCTCGGGAGGAAA  
 CTGGGATCAATGCCGGTGA

## FIG. 5

CEYDGCNDISRLWGQYSAYFPIPELDASTPDDCDVTFALVLSRHGARYPTDSKSAAYNATIARIQKSATMYGKNYKWL  
KEYTYSLGAEDLTEFGQRQMVDSGRAFYERYMSLAEKTEPFVVRASGSDRVIMSSYNFTQGFYASRGESGDDYTQDVLIIIP  
EPPGINNTMLHGSCASFESDRVPKDADEKAEVANGARFLPEIRNRLNHHLPGVNLLEETIYMMDMCPFLAADTPDGAGH  
SRPCDLFTKADWRSYDYMTLSKFYKFGNGNAMGPTQGVGYVNELISRLTGKPVDDHTTTNSTLDSSPKTFPLDRALYAD  
FSHDNSMVSIFPSALGLYNSTLLPKDHI VPAIKAHGYSSTWVVPFGARMYVEKLECGASRNEKRDEYVRVLVNDRVMSLE  
TCGGDEYGLCRLENFVESLSFAASGGNWDQCGG

## FIG. 6

ASRNQSTCEYDGCNDISRLWGQYSAYFPIPELDASTPDDCDVTFALVLSRHGARYPTDSKSAAYNATIARIQKSATMY  
GKNYKWLKEYTYSLGAEDLTEFGQRQMVDSGRAFYERYMSLAEKTEPFVVRASGSDRVIMSSYNFTQGFYASRGESGDDYT  
QDVLIIPEPPGINNTMLHGSCASFESDRVPEKDADEKAEVANGARFLPEIRNRLNHHLPGVNLLEETIYMMDMCPFLAAD  
TPDGAGHSRPCDLFTKADWRSYDYMTLSKFYKFGNGNAMGPTQGVGYVNELISRLTGKPVDDHTTTNSTLDSSPKTFPL  
DRALYADFSHDNSMVSIFPSALGLYNSTLLPKDHI VPAIKAHGYSSTWVVPFGARMYVEKLECGASRNEKRDEYVRVLVN  
DRVMSLETGGDEYGLCRLENFVESLSFAASGGNWDQCGG

## FIG. 7

GCGGATTTAGGCACGATAATAGTCTGACCTCGATATAACGCTGCTCTTGGTCTGTATAACGGCACAAAGCAACTATCCAA  
ATCGAGGATAGAATCGACAAACCAGACAAATGGCTATTCTGCTGGCTGGACAGTTCCATTTGGAGCAAGGGCGTATGTTG  
AGATGATGCAATGCCCTCGGGGATGAACCTCTGATTCTGAGTTCTGGTGAACGATCGCGTCAT

## FIG. 8

ADFRHDNSLTSIYAALGLYNGTKQLSKSRIESTNQTNGYSAGWTVPPGARAYVEMMQCPSGDEPLIRVLVNDRV

## FIG. 9

TGCGACTCTGTGACAGAGGCTTCTGGTGCGCCGCGACATCTCCCCTCCTGGGGACGTAICTACCATACTTCTCCGT  
 CCCCTCTGACATTGACCCGGGTTTCCCCAAGGGCTGCAATGTGACGTTGCGACAGGTCCTCTCACGCCACGGCGCCCGC  
 CCCCAACTACGGGCCGGGCCCGCTACTACGTGACGTTGACCGGTCACGCTCAGGCGACCTCGTACGGCCCCGGC  
 CACGCGTTCCTGCGCTCCTACCGTACACCTCGGGCGCAACGAGCTTACCCCGATGGGAGAGCGGCAGCTGGCGTATTC  
 CGGCGCAAGGTTTTACCATCGCTATCGCGAACTTGCGCGCGTTCGAGGCGCCCTTCGTGCGGTCCAGTGGCGTAAGCCGCG  
 TTGTAGCCTCAGCTGTCAATTTCAACCAGGGCTTCCACCAGGCGGGCTCGCCGACCGCGCGCCACGTTGCCCCCGCCA  
 ACACTGCCCTATGACATGGTGATCATCTCGTCAGACGACACCGCCAACAACACTTGCACCACGGTCTCTGCAOGGTCTT  
 CGAGGAGGGCCCTATGCCGACATGGCGACAAGGCGCAGAAAGAATACTCTCCAAGTTTGTCCGTTCCCATCGTGGAGC  
 GCATTAACGCGCAGCTGCCCGCGGAATCTCAACGCGACGGACATCATCGCGCTGATGGACCTGTGCCCGTTCGAGAGC  
 GTCGCGTTCCCAGAAGGCACGAAGCTGTGCCCTTCTGCGCGCTCTTACGGCCGCGGAATGGCGGGCCTACGACCGGTA  
 CCAGGACGTCGGCAATGGTTCCGCTACGGCCCGGCAATCCGCTCGGCCCGACTCAGGGGTCGGGTTTCGTCAACGAGC  
 TGATCGCGCGGCTGTCCGGCCAGCGGTGAGCGATGGGACCAGCACGAACCGCACGCTGGATGAGAACCCTGGAGACCTTC  
 CCGCTCGGGAGGAGGCTGTATGCGGATTTAGCCATGATAACGACATGGTGGGCATCCTCAGCGCCTTGGGGTTGTGGGA  
 CAACCATGAAGAACCTGGGAATGAAATGCCCGCTGAGGGGGAGGAGGACGACAATGGTCCGTTCTCGACTGCTAGGGCCG  
 TGCCGTTCCGGGCGCGGGTGTATGTGAAAAGCTGCGGTGTGGGGATCGGAGGAGGATGAAGAAATGGTGCCTGTGTTG  
 GTCAATGACCGGTTGATGCCCTTGCACAGTGGGAGGGGACAAGAGGGGAATGTGCACCTCAGCCGTTTCGTTGAAAG  
 CTTGAAGTTTGGCGGAACAACGGGAGGTGGGACATGTGTTTTGAA

## FIG. 10

CDSVDRGFWCAADISHSWGQYSPYFVSPDIDPGFPGKCNVTFAQVLSRHGARAPTTGRAAYYVDVIDRVQRQATSYGPG  
 HAFLRSYRYTLGANELTPMGERQLAYSGARFYHRYRELARVEAPFVRSVSRVVASAVNFTQGFHQARLADRGATLPPP  
 TLPYDMV I I SDDTANNTLHHGLCTVFEETPYADIGDKAQKEYLSKFVGPIVERINAQLPGANLNATDI IALMDLCPFET  
 VAFPEGTKLSPFCRLFTAAEWRAYDRYQDVGKWFYGPNGNPLGPTQGVGFVNELIARLSGQFVSDGTSNRTLDENPET  
 PLGRRLYADFSHDNDMVGILSALGLWDNHEEPGNEMPAEGEDDNGRFSSTARAVPFGARVYVEKLRCCGSEEDDEMVRVL  
 VNDRVMPLOACGGDKRGMCTLSRFVESLKFARNNGRWDMCPE

## FIG. 11

ASRNQSTCDSVDRGFWCAADISHSWGQYSPYFSVPSDIDPGFPKGCNVTFAQVLSRHGARAPTTGRAAYYVDVIDRVQRQ  
ATSYGPGHAFRLRSYRYTLGANELTPMGERQLAYSGARFYHRYRELARVEAPFVRSSGVSRVVASAVNFTQGFHQARLADR  
GATLPPPTLPYDMVIISDDTANNTLHHGLCTVFEEGYPYADIGDKAQKEYLSKFVGPIVERINAQLPGANLNATDIIALM  
DLCPFETVAFPEGTKLSPFCRLFTAAEWRAYDRYQDVGKWFYGGYGGNPLGPTQGVGFVNELIARLSGQPVSDGTSTNRTL  
DENPETFPLGRRLYADFSDNDMVGILSALGLWDNHEEPGNEMPAEGEEDDNGRFSTARAVPFGARVYVEKLRCGGSEED  
EEMVRVLVNDRVMPLAQCGGDKRGMCTLSRFVESLKFARNNGRWDMCFE

## FIG. 12

ATGGGCCTCTCTGCTGTCTFACTTCCTTTGTATCTCCTAGCTGGGTATGCTAAGCACCGCTATCTAAGTCTGATAAGGAC  
CCTCTCTGCCGAGGGCCCCCTGAAGCTCGGACTGTGTGGGACTACTGATCGCTGACAACTCTGTGCAGAGTCACCTCCGGAC  
TGGCAGTCCCCGCCTCGAGAAATCAATCCACT

## FIG. 13

MGVSAVLLPLYLLAGVTSGLAVPASRNQST



# FIG. 14B

(P.c.): 1 ASRNQSTCTTVDGGYQCNSLSHKWQYSPYFSLSEESSISNEVPHDCQITFAQVISRHG 60  
 +S +C TVD GYQC+ SH WGOYSP+FSL +E S+S+++P DC+IT QV+SRHG  
 (A.f.): 407 SSAGSKSCDTVDLGYQCSPATSHLWGOYSPFFSLEDELSVSSKLPKDCRITLVQVLSRHG 586

: 61 ARFPSAKKSKVYAKLIENIQANATAYNGNTKFLRSYKYTMGGDDLVPFGVNQTVDSGTFK 120  
 AR+P++ KSK Y KL+ IQANAT + G FL++Y YT+G DDL PFG Q V+SG KF  
 : 587 ARYPTSSKSKYKLVTAIQANATDFKGFAPLKTNYNYTLGADDLTPFGEQQLVNSGIKF 766

: 121 YQRYEALAKKAVPFIRSSDSGRVVASGVNFIKGFQOAKLDDKKNANHRQSPKTNVIIEE 180  
 YQRY+ALA+ VPFIR+S S RV+ASG FI+GFQOAKL D A +R +P +VII E  
 : 767 YQRYKALARSVVPFIRASGSDRVIASGEKFIKGFQOAKLADPGATNR-AAPAISVIIPES 943

: 181 SGTNNTLNHSEICPKFEDNELGDKVEEKYMKIFVPPIRARLEADLPGVKLEDDVVSMLMD 240  
 NNTL+H +C KFE ++LGD+V + +F P IRAR E LPGV L D DVVSMLMD  
 : 944 ETFMNTLDHG-VCTKFEASQLGDEVAANFTALFAPDIRARAEEKHLPGVTLTDEDVVSMLMD 1120

: 241 ICPFETVSSDDAELSPFCDLFTPTFEWSQYDYQLQSLSKYYGYGAGNPLGPTQGVGFVNE 300  
 +C F+TV+ + DA++LSPFC LFT EW +Y+YLOSL KYGYGAGNPLGP QG+GF NE  
 : 1121MCSFDTVARTSDASQLSPFCQLFTHNEWKKYNYLQSLGKYGYGAGNPLGPAQGIGFTNE 1300

: 301 LIARLTRHPVRDHTSTNRALDAPGAATFFELNYTMYADFTHDNGMIPFFALGLYNGTAPL 360  
 LIARLTR PV+DHTSTN L ATFPLN TMY DF+HDN M+ FFALGLYNGT PL  
 : 1301LIARLTRSPVQDHTSTNSTL-VSNPATFPLNATMYVDFSHDMSMVSIFALGLYNGTEPL 1477

: 361 SLTHVQSPSQTDGFSSAWTVPFGARAYVEMMQCRREPEPLVRVLVNDRVIPLHGCPVDKL 420  
 S T V+S + DG+S++W VPFGARAY E MQC+ E EPLVR L+NDRV+PLHGC VDKL  
 : 1478SRTSVESAKELDGYSASWVVPFGARAYFETMQCKSEKEPLVRALINDRVVPLHGCDVDKL 1657

: 421 GRCRRRDFVKGLTFARSGGDWARCY 445  
 GRC+ DFVKGL++ARSGG+W C+  
 : 1658GRCKLNDVFKGLSWARSGGNWGECE 1732

# FIG. 14C

(P.c.): 4 NQSTCTTVDGGYQCNSSELSHKWGQYSPYFSLSESSISNEVPHDCQITFAQVISRHGARF 63  
 N S CT+VD GYQC ELSHKWG Y+PYFSL +ES +VP DC ITF QV++RHGAR

(A.t.): 411 NHSDCTSVDRGYQCFPELSHKWGLYAPYFSLQDES PFPLDVPDDCHITFVQVLARHGARS 590

: 64 PSAKSKVYAKLIENIQANATAYNGNTKFLRSYKYTMGGDDLVPFGVNQTVDSGTFYQR 123  
 P+ K+K YA I IQ NATA G FL+SY Y+MG ++L PFG NQ D G +FY+R

: 591 PTDSKTKAYAATIAAIQKNATALPGKYAFLKSYNYSMGSENLNPFGRNQDLGAQFYRR 770

: 124 YEALAKKAVPFIRSSDSGRVVASGVNFIKGFQQAALDDKNANHRQPSKTNVIIEESGT 183  
 Y+ L + PF+R++DS RV S F++GFQ A+ D +AN QPSP+ +V+I E +

: 771 YDTLTRHINPFVRAADSSRVHESAEEKFVEGFQONARQGDPHANPHQPSRVDVVIPEGTAY 950

: 184 NNTLNHSEICPKFEDNELGDKVEEKYMKIFVPPIRARLEADLPGVKLEDIDVVSIMDIPC 243  
 NNTL HS IC FE + +GD + + +F P I RLEADLPGV+L DVV+LM +CP

: 951 NNTLEHS-ICTAFEASTVGDAADNFTAVFAPAIKRLEADLPGVQLSADDVVNLMAMCP 1127

: 244 FETVSSSDAELSPPCDLFTPTSEWSQYDYLOSLSKYYGYGAGNPLGPTQGVGVNELIA 303  
 FETVS +DDA LSPFCDLFT EW+QY+YL SL KYGYG GNPLGP QGVG+ NELIA

: 1128FETVSLTDDAHTLSPPCDLFTAAEWTQYNYLLSLDKYYGYGGNPLGPVQGVGWANELIA 1307

: 304 RLTRHPVRDHTSTNRALDAPGAATFPLNYTMYADFTHDNGMIPFFALGLYNGTAPLSLT 363  
 RLTR PV DHT N LDA ATFPLN T+YADF+HD+ ++ F+ALGLYNGT PLS T

: 1308RLTRSPVHDHTCVNNTLDA-NPATFPLNATLYADFSHDSNLVSI FWALGLYNGTKPLSQT 1484

: 364 HVQSPSQTDFSSAWTVPFGARAYVEMMQCRREPEPLVRVLVNDRVIPLHGCPVDKLGRC 423  
 V+ ++TDG+++AWTVPF ARAY+EMMQCR E +PLVRVLVNDRV+PLHGC VD LGRC

: 1485TVEDITRTDGYAAAWTVPFAARAYIEMMQCRAEKQPLVRVLVNDRVMLHGCAVDNLGRC 1664

: 424 RRRDFVKGLTFARSGGDWARCY 445  
 +R DFV+GL+FAR+GG+WA C+

: 1665KRDDFVEGLSFARAGGNWAECF 1730

# FIG. 14D

```

(P.c.): 7 TCTTVDGGYQCNSLSESHKWQYSPYFSLSEESSISNEVPHDCQITFAQVISRHGARFPSA 66
+C T DGGYQC +SH WGQYSPYFS+ +ES+IS +VPH C++TF QV+SRHGAR+P+
(E.n.): 293 SCNTADGGYQCFFPNVSHVWGQYSPYFSIEQESAISEDPVPHGCEVTFVQVLSRHGARYPTE 472

: 67 KSKVYAKLIENIQANATAYNGNTKFLRSYKYTMGGDDLVPFGVNQTVDSGTFYQRYEA 126
KSK Y+ LIE IQ NAT++ G FL SY YT+G DDL FG NQ VDSG KFY+RY+
: 473 SKSKAYSGLIEAIQKNATSPWGYAFLESYNYTLGADDLTIFGENQMVDSGAKFYRRYKN 652

: 127 LAKKAVPFIRSSDSGRVVASGVNFIKGFQQAQLDDKNANHRQPSKTNVIIEESGTNNT 186
LA+K PFIR+S S RVVAS FI GF++A+L D + ++ +P NVII E G NNT
: 653 LARKNTPFIRASGSDRVVASAEKFINGFRKAQLHDHGS--KRATPVVNVIIPEIDGFNNT 826

: 187 LNHSEICPKFEDNELGDKVEEKYMKIFVPPIRARLEADLPGVKLEDIDVVS LMDICPFET 246
L+HS C FE++E D++E + I PFIR RLE DLPG+KL + +V+ LMD+C P+T
: 827 LDHS-TCVSFENDERADEIEANFTAIMGPPIRKRENDLPGIKLTNENVIYLMDCSFDT 1003

: 247 VSSDDAAELSPFCDLFTPTIEWSQYDYLOLSKYYGYGAGNPLGPTQG VGFVNELIARLT 306
++ + ELSPPC +FT EW QYDYLOLSKYYGYGAG+PLGP QG+GF NELIARLT
: 1004MARTAHGTELSPFCAIFTEKEWLQYDYLOLSKYYGYGAGSPLGPAQGIPTNELIARLT 1183

: 307 RHPVRDHTSTNRALDAPGAATFPLNYTMYADFTHONGMIPFFALGLYNGTAPLSLTHVQ 366
+ FV+D+TSTN LD+ ATFPL+ +YADF+HDN MI FFA+GLYNGT PLS+ V+
: 1184QSPVQDNTSTNHTLDS-NPATFPLDRKLYADFSHDNSMISIFFAMGLYNGTQPLSMDSVE 1360

: 367 SPSQTDGFSSAWTVPFGARAYVEMMQCRREPEPLVRVVLVNDRVIPLHGCPVDKLGRCRRR 426
S + DG++++WTVPFGARAY E+MQC ++ EPLVRVVLVNDRV+PLHGC VDK GRC
: 1361SIOEMDGYAASWTVPFGARAYFELMQCEKK-EPLVRVVLVNDRVVPLHGCAVDKFGRCRLD 1537

: 427 DFVKGLTFARSGGDWARCY 445
D+V+GL FARSGG+W C+
: 1538DWVEGLNFARSGGNWKTCF 1594
    
```





# FIG. 15C

(F.j.): 17 ISRLWGQYSAYFFPIPELSDASTPDDCDVTFALVLSRHGARYPTDSKSAAYNATTARIQKS 76  
 IS WGQYS YF +PSELDAS PDDC+VTFA VLSRHGAR PT ++A+Y I RI

(M.t.): 2379 ISHFWGQYSPYFSVPSELDASIPDDCEVTFQVLSRHGARAPTLKRAASYVDLIDRIHHG 2558

: 77 ATMYGKNYKWLKEYTYSLGAEDLTEFGQRQMVDSGRAFYERYMSLAEKTEPFVRASGSDR 136  
 A YG Y++L+ Y Y+LGA++LT GQ+QMV+SG FY RY +LA K+ PFVR +G DR

: 2559 AISYGPGEFLRTYDYTLGADELTRTGOQQMVNSGIKFYRRYRALARKSIPFVRTAGQDR 2738

: 137 VIMSSYNFTQGFY----ASRGES-GDDYTQDVLIIPPEPGINNTMLHGSCASFESDRVPK 191  
 V+ S+ NPTQGF+ A RG + D+++IPE G NNT+ + C +PE

: 2739 VVHSAENFTQGFHSALLADRGSTVTRPTLPYDMVVIPETAGANNTLHNDLCTAFEEGPYST 2918

: 192 DADEKAEVANGARFLPEIRNRLNHHLPGVNLTLEETIYMMDMCPF--LAADTPD----- 243  
 D+ A+ + + F I R+N +LPG NLT +T+ +MD+CPF +A+ + D

: 2919 IGDD-AQDTYLSTFAGPITARVNANLPGANLTDADTVALMDLCPFETVASSSSDPATADA 3095

: 244 GAGHSR----FCDLFTKADWRSYDYMTLSKFYKFGNGNAMGPTQGVGVNELISRLTGK 299  
 G G+ R FC LF++++WR+YDY ++ K+Y +G GN +GPTQGVG+VNEL++RL G

: 3096 GGGNGRPLSPFCRLFSESEWRAYDYLQSVGKWKYGYGPGNPLGPTQGVGVNELLARLAGV 3275

: 300 PVDDHTTTNSTLDSSPKTFPLDRALYADFSDNSMVSIFSAALGLYNSTLLPKDHIVPAI 359  
 PV D T+TN TLD P+TFPL R LYADFSDN M+ + ALG Y+ L K

: 3276 FVRDGTSTNRTLGDGDPRTFELGRPLYADFSDNDMMGVLGALGAYDGVPLDKTARRDPE 3455

: 360 KAHYSSTWVVPFGARMYVEKLEC-----GASRNEKRDEYVRVLVNDRVMSLETG 410  
 + GY+++W VPF AR+YVEK+ C G R EK +E VRVLVNDRVML+L+ CG

: 3456 ELGGYAASWAVPFAARIYVEKMRCSGGGGGGGGEGRQEKDEEMVRVLVNDRVMTLKGGC 3635

: 411 GDEYGLCRLENFVESLSFAASGGNWDQC 438  
 DE G+C LE F+ES++FA G WD C

: 3636 ADERGMCTLERFIESMAFARGNGKWDLC 3719

# FIG. 16A

H. grisea	1	.....ASRNQSTCDSVDRGFWCAADISHSWGQYSPYF	32
		.	
M. thermophila	1	MTGLGVMVVMVGFIAIASLQSESRPCDTPDLGFQCGTAISHFWGQYSPYF	50
	33	SVPSDIDPGFPPKGCNVTFAQVLSRHGARAPTTGRAAYVVDVIDRVQRQAT	82
		:                          :	
	51	SVPSELDASIPDDCEVTFAQVLSRHGARAPTLKRAASYVDLIDRIHGGAI	100
	83	SYGPGHAFRLRSYRYTLGANELTPMGERQLAYSGARFYHRYRELARVEAPF	132
		:    .        .     .:     :	
	101	SYGPGYEFLRTYDYTLGADELTRTGQQQMVNSGIKFYRRYRALARKSIPF	150
	133	VRSSGVSRRVVASAVNFTQGFHQARLADRGATLPPPTLPYDMVVISSDDTA	182
		.	
	151	VRTAGQDRVVHSAENFTQGFHSALLADRGSTV.RPTLPYDMVVI PETAGA	199
	183	NNTLHHGLCTVFEEGPYADIGDKAQKEYLSKFVGPIVERINAQLPGANLN	232
		.           .	
	200	NNTLHNDLCTAFEEGPYSTIGDDAQDTYLSTFAGPITARVNNANLPGANLT	249
	233	ATDIIALMDLCPFETVAFP.....EGTKLSPFCRLFTA EWRA	270
		:	
	250	DADTVALMDLCPFETVASSSSDPATADAGGGNGRPLSPFCRLFSESEWRA	299
	271	YDRYQDVGKWFYGYGPGNPLGPTQGVGFVNELIARLSGQPVSDGTSTNRTL	320
	300	YDYLSVVGKWFYGYGPGNPLGPTQGVGFVNELLARLAGVPVRDGTSTNRTL	349
	321	DENPETFPLGRRLYADFSHDNDMVGILSALGLWDNHEEPGNEMPAEGEED	370
		.                    .   :       :     :     :	
	350	DGDPRTFPLGRPLYADFSHDNDMMGVLGALGAYDG..VPPLDKTARRDPE	397
	371	DNGRFSTARAVPPGARVYVEKLRCGG.....SEEDEEMVRVLVN	409
		:   : .            :      :	
	398	ELGGYAASWAVPFAARIYVEKMRCSGGGGGGGGEGRQEKDEEMVRVLVN	447
	410	DRVMPLAQCGGDKRGMCTLSRFVESLKFARNNGRWD MCFE	449
	448	DRVMTLKGCGADERGMCTLERPIESMAFARGNGKWDLCFA	487



# FIG. 16C

```

(H.g.): 8   CDSVDRGFWCAADISHSWGQYSPYFSVPSDIDPGFPKGCNVTFAQVLSRHGARAPTGRA 67
           CD+ D GF C  ISH WGQYSPYFSVPS++D  P C VTFAQVLSRHGARAPT RA
(M.t.): 2340 CDTPLDGFQCCTAISHFWGQYSPYFSVPSSELDASIPDDCEVTFAQVLSRHGARAPTLKRA 2519

: 68   AYYVDVIDRVQRQATSYGPGHAFILRSYRYTLGANELTPMGERQLAYS GARFYHRYRELAR 127
           A YVD+IDR+  A SYGPG+ FLR+Y YTLGA+ELT  G++Q+  SG +FY RYR LAR
: 2520 ASYVDLIDRIHGAISYGPYBFLRITYDTLGADELTRTQQQMVNSGIKFYRRYRALAR 2699

: 128   VEAPFXXXXXXXXXXXXXXXXNFTQGFHQARLADRGATLPPPTLPYDMVIISSDDTANNTLH 187
           PF                               NFTQGFH A LADRG+T+  PTLPYDMV+I  ANNTLH
: 2700 KSIPFVRTAGQDRVHSAENFTQGFHSALLADRGSTV-RPTLPYDMVVI PETAGANNTLH 2876

: 188   HGLCTVFEFGPYADIGDKAQKEYLSKFVGPIVERINAQLPGANLNATDIIALMDLCPFET 247
           + LCT FEFGPY+ IGD AQ  YLS F GPI  R+NA LPGANL  D +ALMDLCPFET
: 2877 NDLC TAFEFGPYSTIGDDAQDTYLSTFAGBITARVMANLPGANLTDADTVALMDLCPFET 3056

: 248   VAFP-----EGTKLSPFCRLFTAAEWRAYDRYQDVGKWFYGYGPNPLGPTQGV 295
           VA                               G LSPFCRLF+ +EWRAYD  Q VGKW+GYGPNPLGPTQGV
: 3057 VASSSDPATADAGGGNGRPLSPFCRLFSESEWRAYDYLSVGKWFYGYGPNPLGPTQGV 3236

: 296   GFVNELIARLSGQPVSDGTSTNRTLDENPETFPLGRRLYADFSHDNDMVGILSALGLWDN 355
           GFVNEL+ARL+G PV DGTSTNRTLD +P TFPLGR LYADFSHDNDM+G+L ALG +D
: 3237 GFVNELLARLAGVPVRDGTSTNRTLDGDPRTFPLGRPLYADFSHDNDMMCVL GALGAYDG 3416

: 356   HEEPGNEMPAEGEEDDNGRFSTARAVPFGARVYVEKLRCCG-----SEEDEEMV 404
           P + A + ++ G ++ + AVPF AR+YVEK+RC G           E+DEEMV
: 3417 --VPPLDKTARRDPEELGGYAASWAVPFAARIYVEKMRCSGGGGGGGGEGRQEKDEEMV 3590

: 405   RVLVNDRVMLAQCGGDKRGMCTLSRFVESLKFARNNGRWD MCF 448
           RVLVNDRV M L  CG D+RGMCTL RF+ES+ FAR NG+WD+CF
: 3591 RVLVNDRVMTLKGCGADERGMCTLERFIESMAFARGNGKWDLCF 3722
    
```

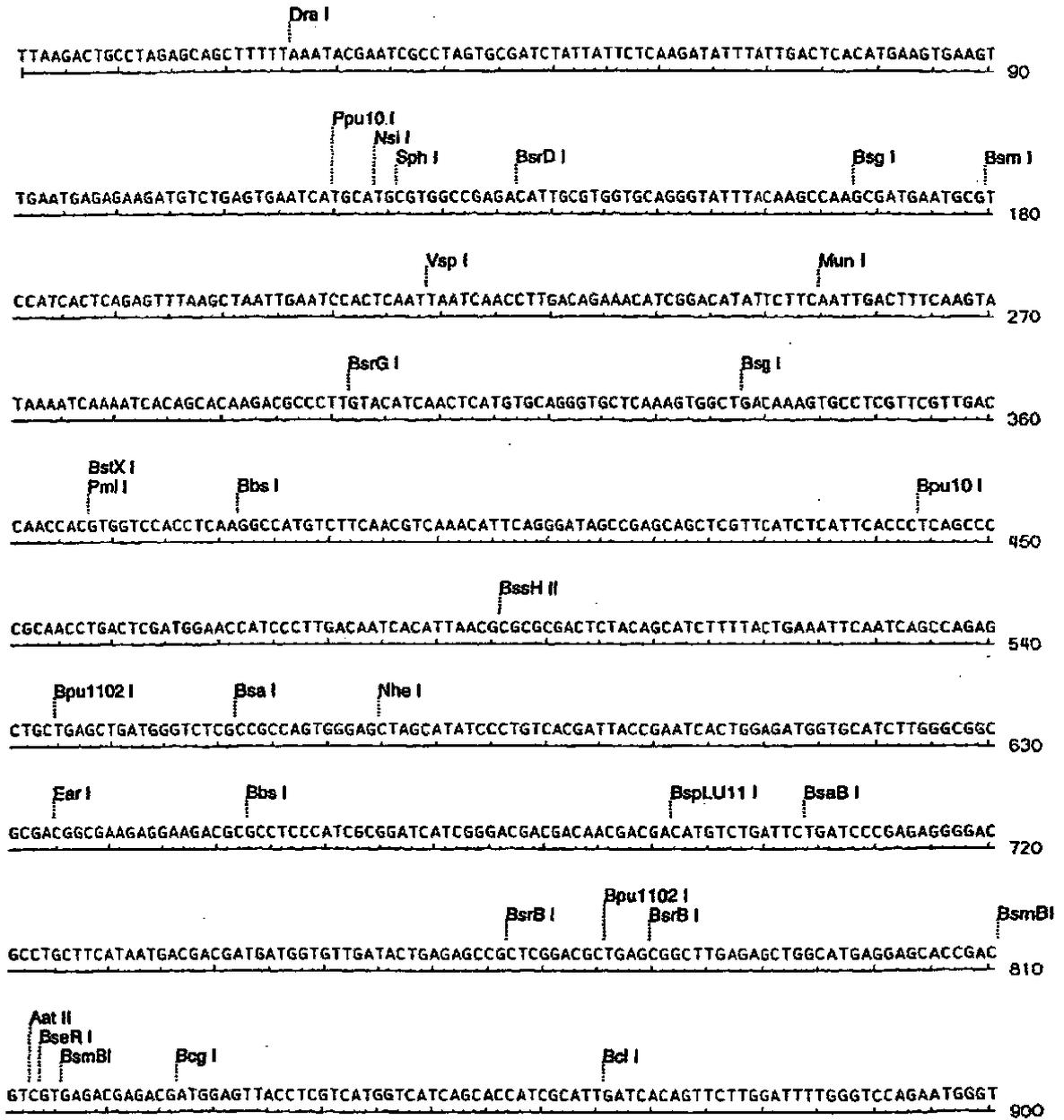
# FIG. 17A

ATGGTTCTTTTCACGGTCTCCCTTTCGCTGTACTACCTACTTACGAGGTGAGATCTCTACAGTAGCTG  
 CTTGTTTAGTTGAGTTGGTACTTACCTACACAGCGTCTCTGCTCAGGCCGTGGTGGCGCAGGAATAT  
 TCATGTAATTCGGCCGACGCTGGGTATCAATGTTTCCCAATGTCTCGCACGTCTGGGGCCAGTACT  
 CGCCGTACTTCTCACTCGAGCATGAGTCTGCCATTTCTCAGGACGTGCCTCATGGCTGTGAGGTTAC  
 CTTCTGTCAGGTGCTCTCGCGACATGGGGCTAGATATcCTTCGGAGTCAAAAAGCAAGGCCGTATGCG  
 AAGTTGATTGACGCTATCAAGAAGAATGCTACTTCGTTTTTCGGGACAGTATGCTTTTTCTGGAGAGTT  
 ATAATTACTCTCGGCGCGGAAGACTTGACTACTTTTTGGTGAGAACCAGATGGTCCGACTCGGGTGC  
 CAAGTTTTACCGGCGGTATAAGAAJTGGCCAGGAAAAAATACTCCATTCAACGTGCATCAGGGTCT  
 GACCGTGTGTTGCGTCCGCGGAGAAGTTTATTGACGGACTTCGAGACGCCAGACCCACGACCAG  
 GGCTCCAAACGTGTTGCCCCAGTTGTCAATGTGGTTATCCCTGAAACTGATGGATTTAACAACACCC  
 TGGATCATAGCACTTGCCTGCTTTTTGAGAATGATGAGCGGGCGGACGAAATTGAAGCCAACCTTCGC  
 CGCGATCATTGGACCTCCGACTCGCAAACGTCTGGAAAACGACCTTCCTGGCCTTGAGCTTACAAAT  
 GAGCATGTGGAATACTTGATGGATATGTgctcgttcgacaccatggcgcgacccgcccctggaaccgagctgtctccatt  
 ctgcgcatcttcaactgaaaaggagtggtgctgcegtacgactACCTACAATCTCTGtCAAAGTACTACGGCTACGGGTGC  
 CGGGAACCCCTTGGCCAGCTCAGGGAATTGGCTTACCAACGAGCTGATTGcCGACTGA  
 CGCAGTCCCTGTCCAGGACAACACGAGCACCAACCACACTCTAGACTCTgACCCGGCCACGTTCC  
 CCCTCGACAGGAAGCTCTACGCCGACTTCTCCACGACAATAACATGATTTCTATATTCTTCGCCAT  
 GGGCCTGTACAACGGCACCCAGCCGCTGTCCATGGACACTGTGGAGTCGATTGAGGAGATGGATGG  
 CTACGCGGCGTCTTGACTGTCCCCTTGGTGCGAGGGCTTACTTTGAGGTGATGCAGTGCCAAAAA  
 AAGAAGGAGCCACTTGTGCGGGTATTAGTGAATGATCGCGTTGTTCTCTCCATGGCTGTGCTGTTG  
 ACAAGCTCGGACGATGCACTTTGGACGATTGGGTCGAGGGCTTGAGTTTTGCGAGGGCCGGTGGGA  
 ACTGGAAGGCTTGTTTTACTGCCTAA

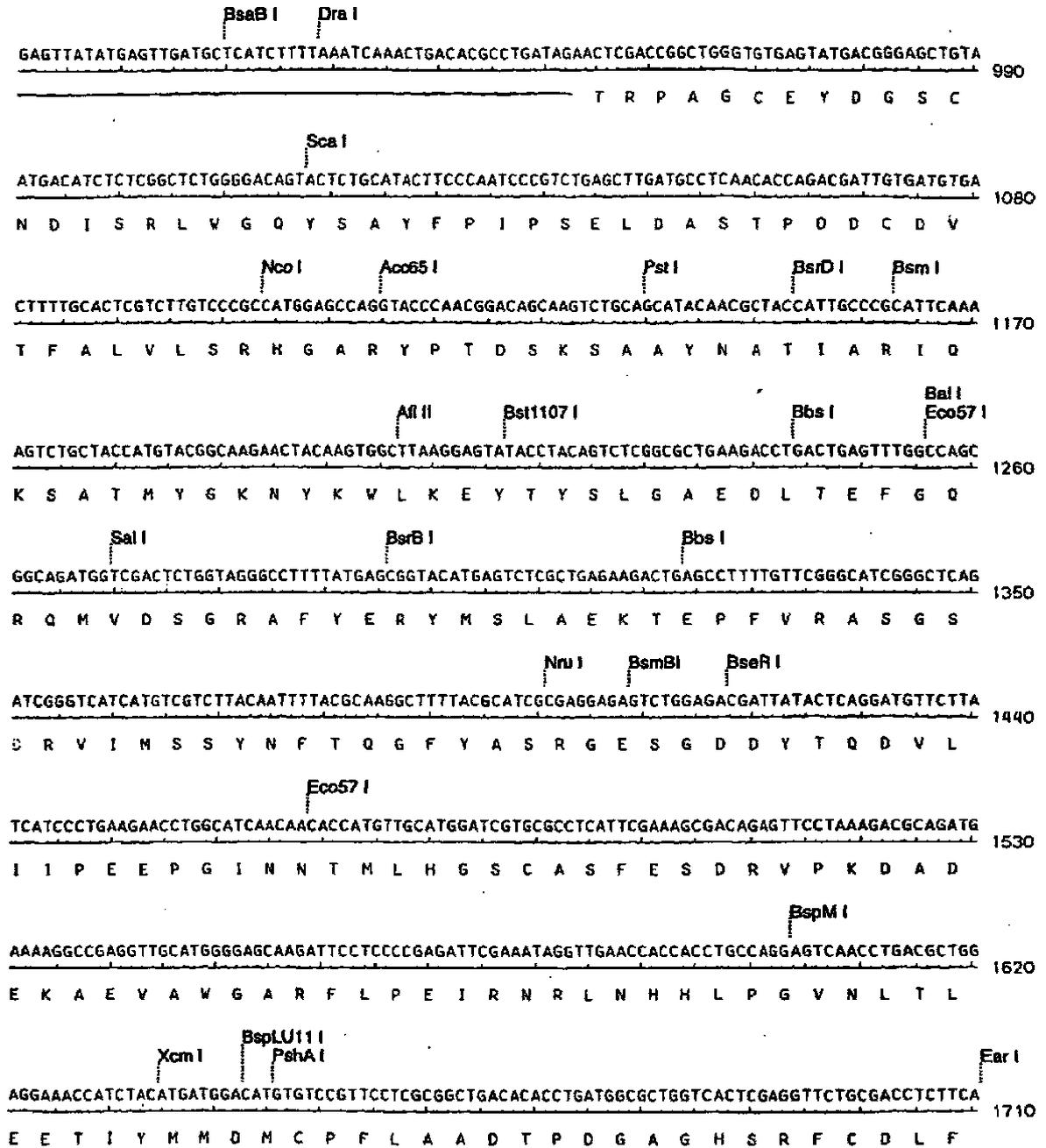
# FIG. 17B

MVLFVLSLSLYLLTSVSAQAVVAQEYSCNSADAGYQCFPNVSHVWGQYSPYFSLEHESAIQDVPFHGCE  
 VTFVQVLSRHGARYPSESKSKAYAKLIDAIKKNATSFSGQYAFLESYNYTLGAEDLTPGENQMVDSGAKF  
 YRRYKNLARKNTPFIRASGSDRVVASA EKFDGLRDAQTHDQGSKRVPVNVVPIETDGFNNTLDHSTCV  
 SFENDERADEIEANFAAIIIGPPIRKRENDLPVELTNEHVEYLMDMCSFDTMARTAHGTELSPFCAIFTEKE  
 WLQYDYLSLSKYGYGAGNPLGPAQGGFTNELIARLTQSPVQDNJSTNHJLSDPATFPLDRKLYADFS  
 HDNNMISIFFAMGLYNGTQPLSMDTVESIEEMDGYAASWTVPFGARAYFEVMQCQKKKEPLVRVLVNDR  
 VVPLHGCAVDKLRCTLDDWVEGLSFARAGGNWKACFTA

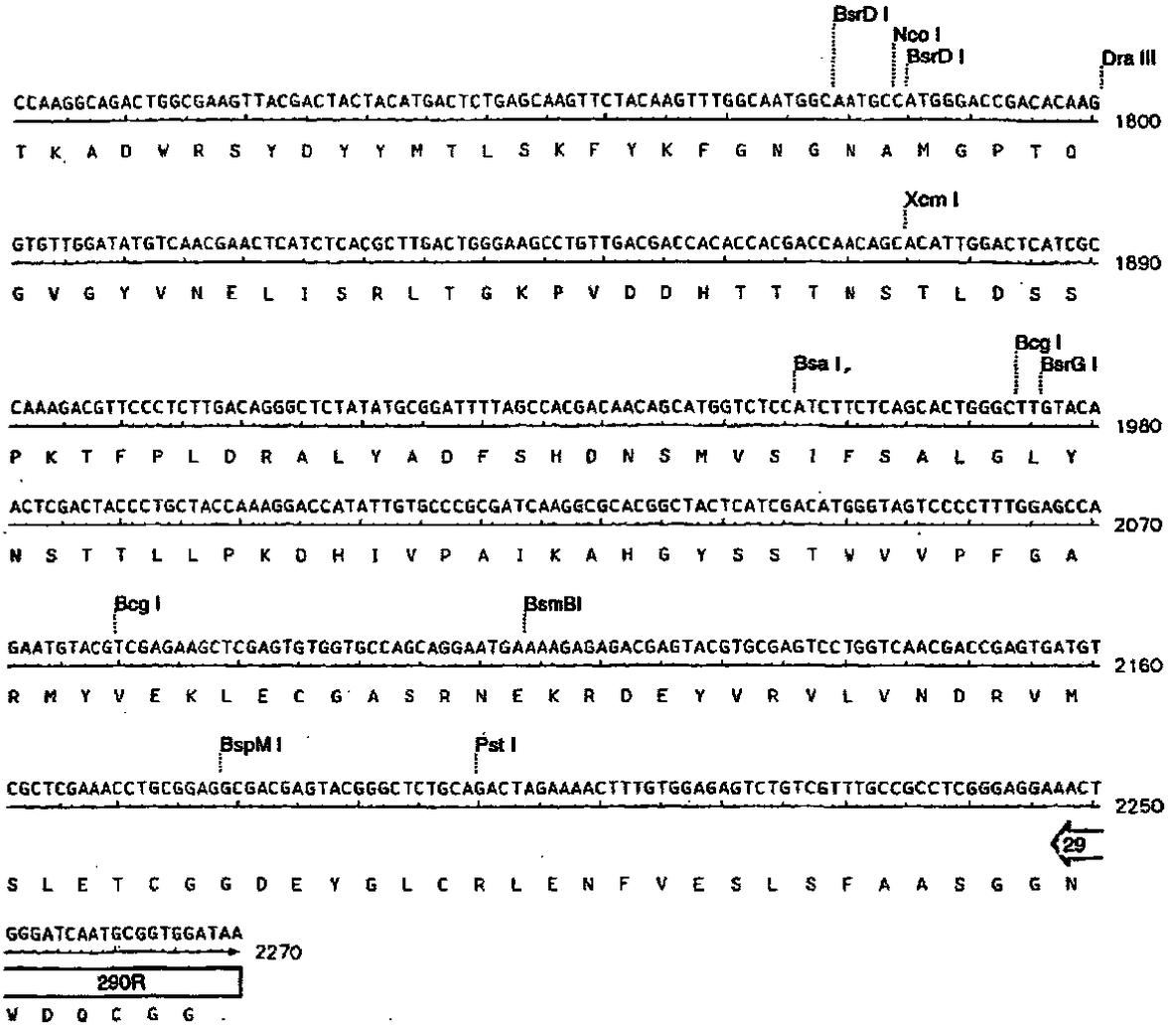
# FIG. 18A



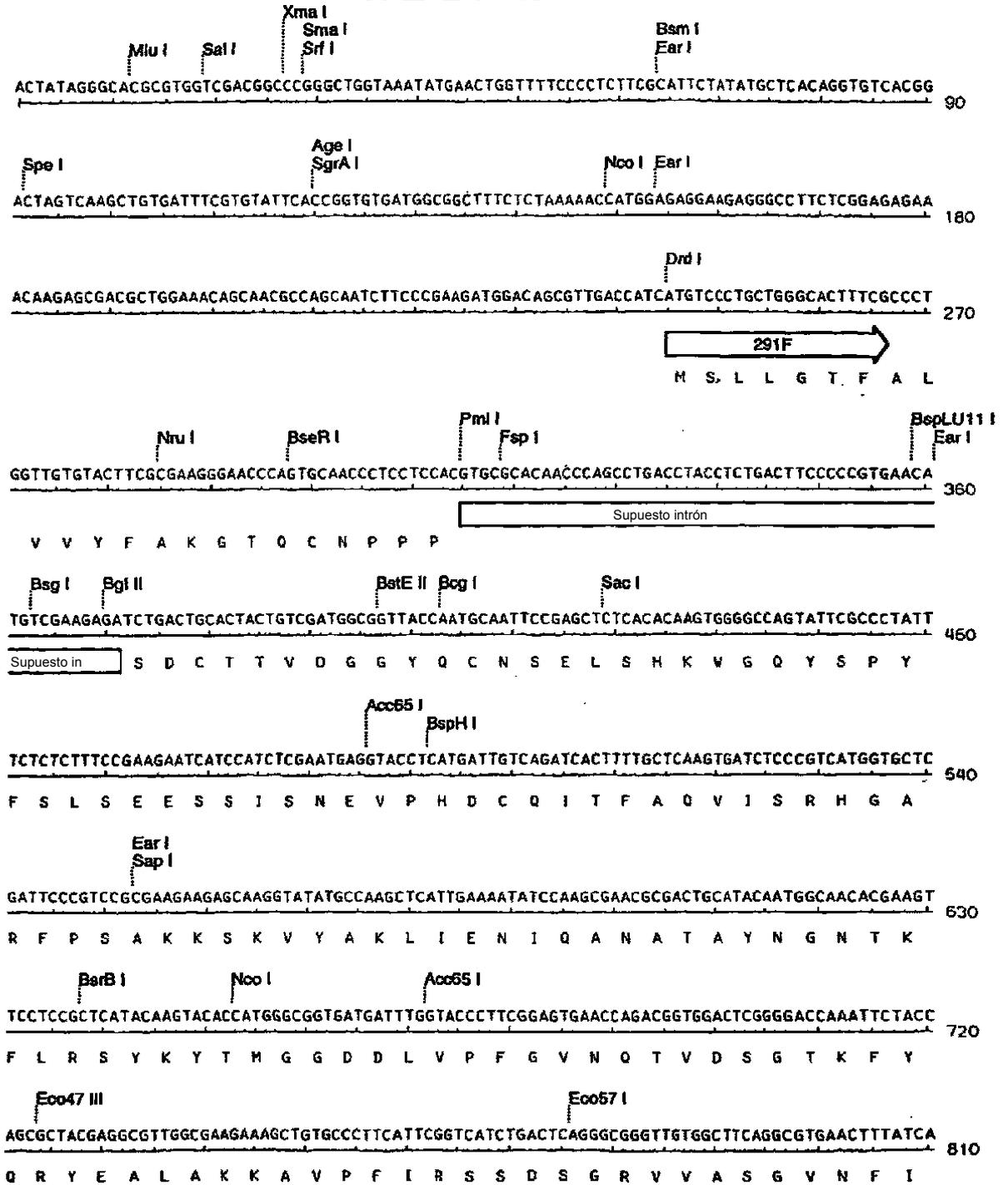
# FIG. 18B



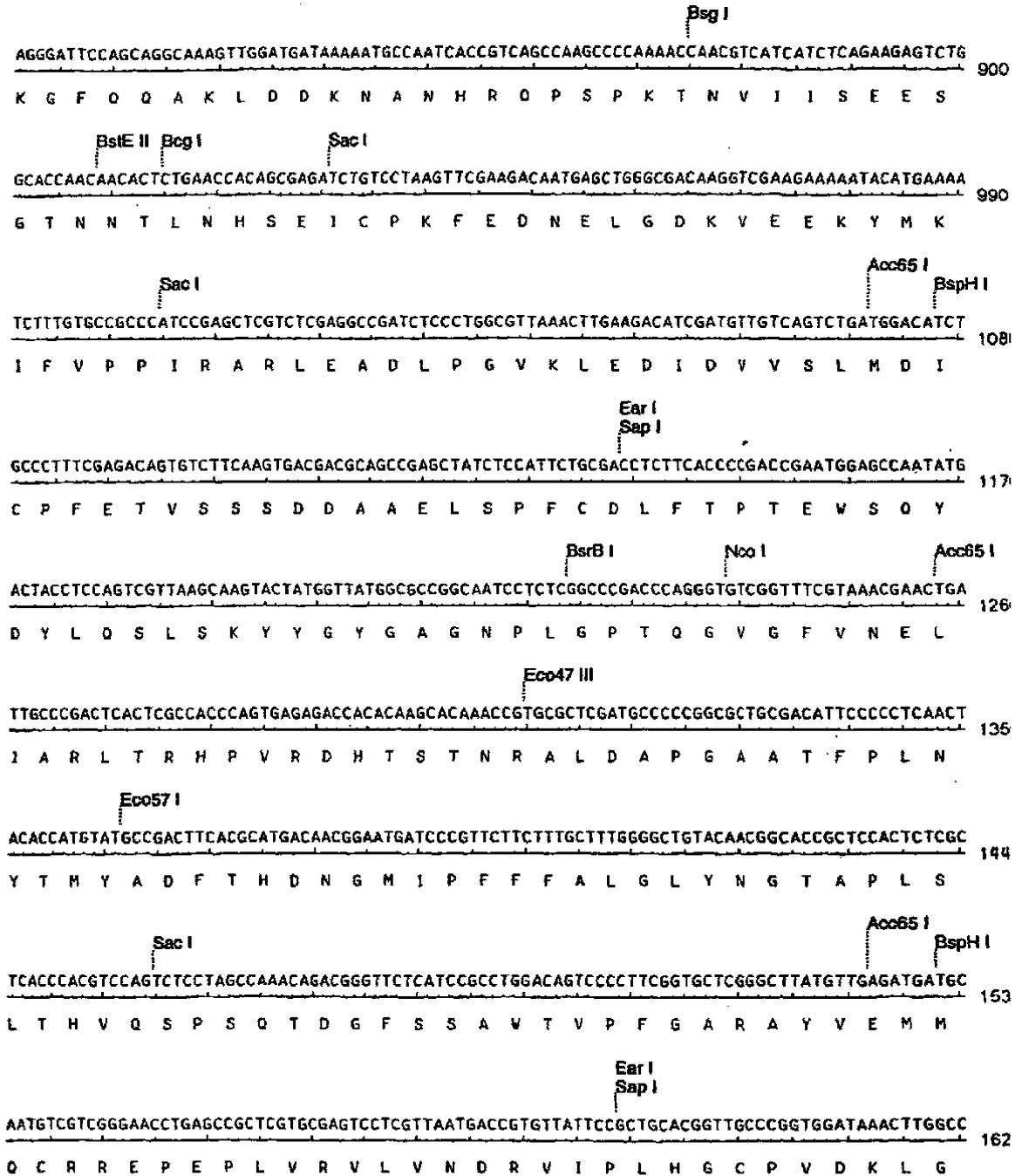
# FIG. 18C



# FIG. 19A



# FIG. 19B

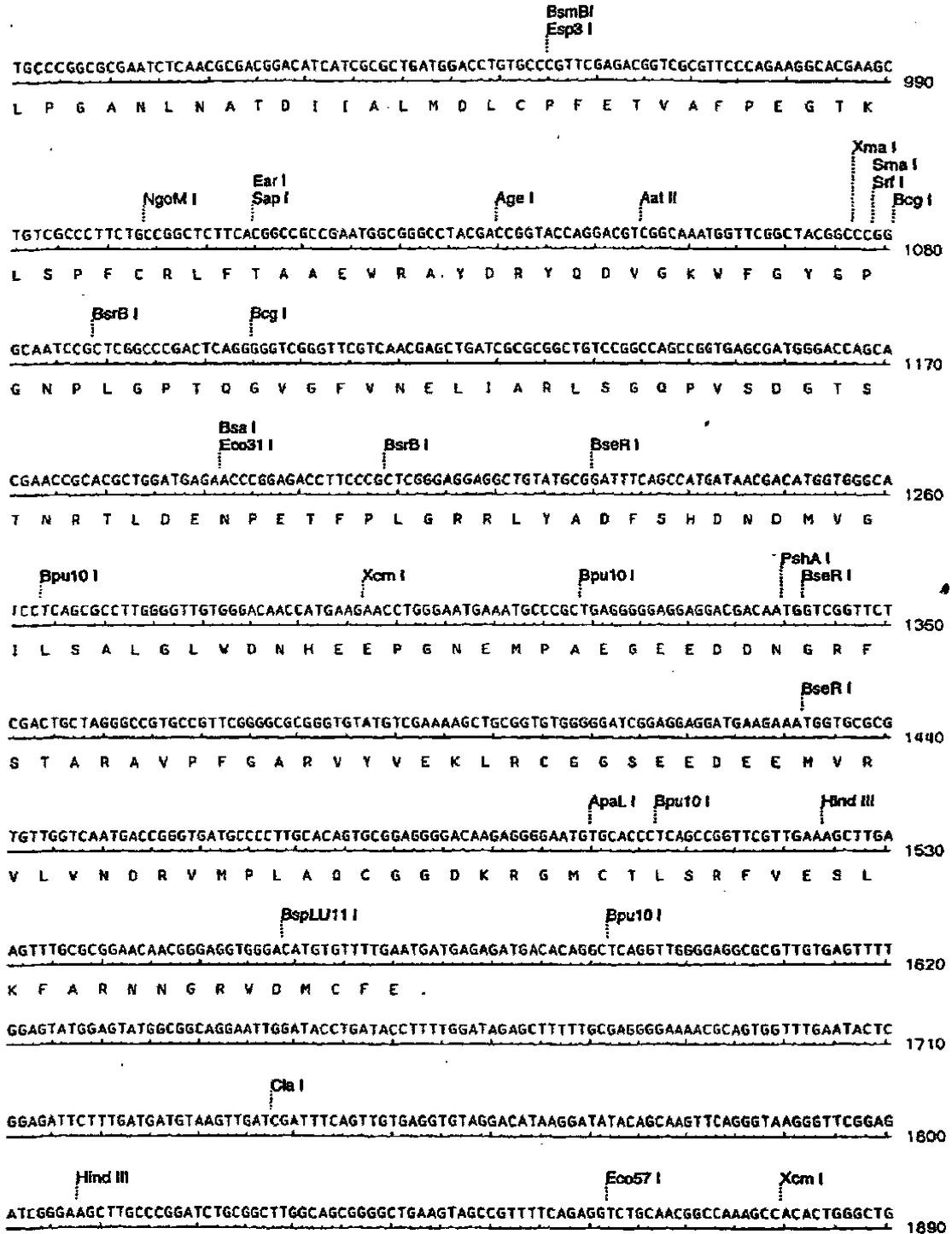


# FIG. 19C





# FIG. 20B





# FIG. 22

← GSE122v. fr1034

TATCCTTGGGAGTCAGAAAGCAAGGCCGTATGCGAAGTTGATTGACGCTATCAAGAAGAATGCTACTTCGT 70  
 Y P S E S H S K A Y A R L I D A I K K N A T S

← GSE122v. fr1037

TTTCGGGACAGTATGCTTTCTGGAGAGTTATAATTATACTCTCGGCCCGGAAGACTTGACTACTTTTGG 140  
 F S G Q Y A F L E S Y N Y T L G A E D L T T F G

TGAGAACCCAGATGGTCGACTCGGGTCCCAAGTTTACCGGCCGTATAAGAATTTGGCCAGGAAATACT 210  
 E N Q M V D S G A K F Y R R Y K N L A R K N T

CCATTTCATCGTGCATCAGGGTCTGACCGTGTGTTGCGTCCGCGGAGAAGTTTATTGACGGACTTCGAG 280  
 P P I R A S G S D R V V A S A E K F I D G L R

ACGCCACGACCCACGACCAGGGCTCCAAACGGTGTGCCCCAGTGTCAATGTGGTTATCCCTGAAACTGA 350  
 D A Q T K V D S G A K R Y R R Y N V V I P E T D

TGGATTTAACAACACCTGGATCATAGCCCTGCGTGTCTTTGAGAAATGATGACCGGGCGGACGAAAT 420  
 G F N N T L D H S T C V S F E N D E R A D S I

GAAGCCAACTTCGCCCGGATCATTGGACCTCCGATTCGCAAAACGTCTGGAAAACGACCTTCTGCGGTG 490  
 E A N F A A I I G P P I R K R L E N D L P G V

ASCITACAATGAGCAATGGAATACTTGGATGATATGTCTGCTCGACACCATGGCGCCACCCGCCA 560  
 E L T N E H V B Y L M D K C S F D T M A R T A H

TGGAACCGAGCTGTCTCCATTCTGCCCACTTCACTGAAAAGGAGTGGCTGCAGTACGACTACCTACAA 630  
 G T E L S P F C A I F T E K E W L Q Y D Y L Q

TCTCTGTCAAAGTACTACGGCTACGGTCCCGGERACCCCTTGGCCCGAGCTCAGGGAAITGGCTTACCA 700  
 E L S K Y Y G Y G A G N P L G P A Q G I G F T

ACGAGCTGATTCACCGACTGACGCGAGTCCGCTGCCAGGACAACAGAGCACCAACCACACTCTAGACTC 770  
 N E L I A R R L T Q S P V Q D N T S T N H T L D S

TGACCCGGCCAGCTTCCCTTCGACAGGAAGCTCTACGCCCACTTCTCCACGACAAATACATGATTTCT 840  
 D P A T F P L D R K L Y A D F S H D N N M I S

ATATTCTTCGCCATGGGCCTGTACAACGECACCCAGCCGCTGTCCATGGACACTGTGGAGTCGATGAGG 910  
 I P F A M G L Y N G T Q P L S M D T V E S I E

AGATGGATGGCTACGGCGGCTCTTGGACTGTCCCGTTTGGTGGAGGGCTTACTTTGAGGTGATGAGTG 980  
 E N D G Y A A S W T V P F G A R A Y F E V M Q C

CCAAAAAAGAGGAGCCACTTGTGCGGGTATTAGTGAATGATCGCGTTGTTCTCTCCATGGCTGTGCT 1050  
 Q K K K E P L V R V L V N D R V V P L H G C A

GTTGACAAGCTCGGACGATGCACTTTGGACGATTTGGGTCGAGGGCTTGGATTTTGGAGGSCCGTGGGA 1120  
 V D K L G R C F L D D M V E G G T L S F A R A G G

ACTGGAAGGCTTCTTTTACTGCCTAA 1146  
 N W K A C F T A

# FIG. 23

CSF rev. 011032

CAGTACTCTGCATACTTCCCAATCCCGTCTGAGCTTGTGCTCAACACCAGACGATTGTGATGACTT 70  
 Q Y S A Y F P I P S E L D A S T F D D C D V T

CSF rev. 111032

TTGCACTCGTCTTGTCCCGCATGGAGCCAGGTACCCAACGGACAGCAATCTGCAGCATAACAACGCTAC 140  
 F A L V L S R R C A R Y P T D E K E A A Y N A T

CATTGCCCGCATTCAAAAAGTCTGCTACCAATGTACGGCAAGAACTACAAGTGGCTTAAGGAGTATACCTAG 210  
 I A R I Q K S A T N Y G K M Y K W L K E Y T Y

ACTCTCCCGCGTGAAGACCTGACTEAGTTSGCCAGCGGCAGATGGTTCGACTCTGCTACGGCCTTTTATG 280  
 S L C A E D L T S P G Q R Q M V D S G R A F Y

AGCGGTACATGACTCTCGCTGAGAAGACTGAGCCCTTTGTTCCGGCATCGGGCTCAGATCGGGTCATCAT 350  
 E R Y N S L A S K T E P P V M R A S G S D R V I M

GTCCTTTACAATTTTACGCAAGGCTTTTACGCATCGCGAGGAGAGTCTGGAGACGATTATACTCAGGAT 420  
 S S Y N P T Q C F Y A S R G E S G D D Y T Q D

GTTCTTATCATCCCTGAAGAACCTGGCATCAACACCATGTTGCATGGATCGTCCGCTCTTCGAA 490  
 V L I I P K S A F G I N Y G K M Y K W L H G S C A S F E A

GCBACAGAGTTCCATAAAGACECAGATGAAAAGCGGAGGTTGCATGGGAGCAAGATTCCCTCCCGAGAT 560  
 S D R V P K D A D E K A E V A W G A R F L F E I

TCGAAATAGGTTGAACCACCACCTGCCAGGAGTCAACCTGACGCTGGAGGAAACCATCTACATGATGGAC 630  
 R N R L N H R L P G V N L T L E E T I Y M M D

ATGTCTCCGTTCCCTCGCGGCTGACACACCTGATBCCGCTBETCACTCCAGGTTCTGGGACCTCTTCACCA 700  
 H C P F L A A D T P D G A G R S K F C D L F T

AGGCAGACTGECGAAGTTACGACTACTACATGACTCTCAGCAABTTCTACAAGTTTGGCAATGGCAATGC 770  
 K A D W R S Y D Y Y M T L S K P Y K B G M A

CATGGGACCGACACAGGTTGTTGATATGTCACCGAAGTCTCACECTTGACTGGGAAGCCTGTTGAC 840  
 K G P T Q C V C Y V N B L I S R L T G K F V D

GACCAACACGACCAACAGCATTGGACTCATCGCCAAAGAGCTTCCCTCTTQACAGGGCTCTATATG 910  
 D E T T T N S T L D S G C P K T F F L D R A L Y

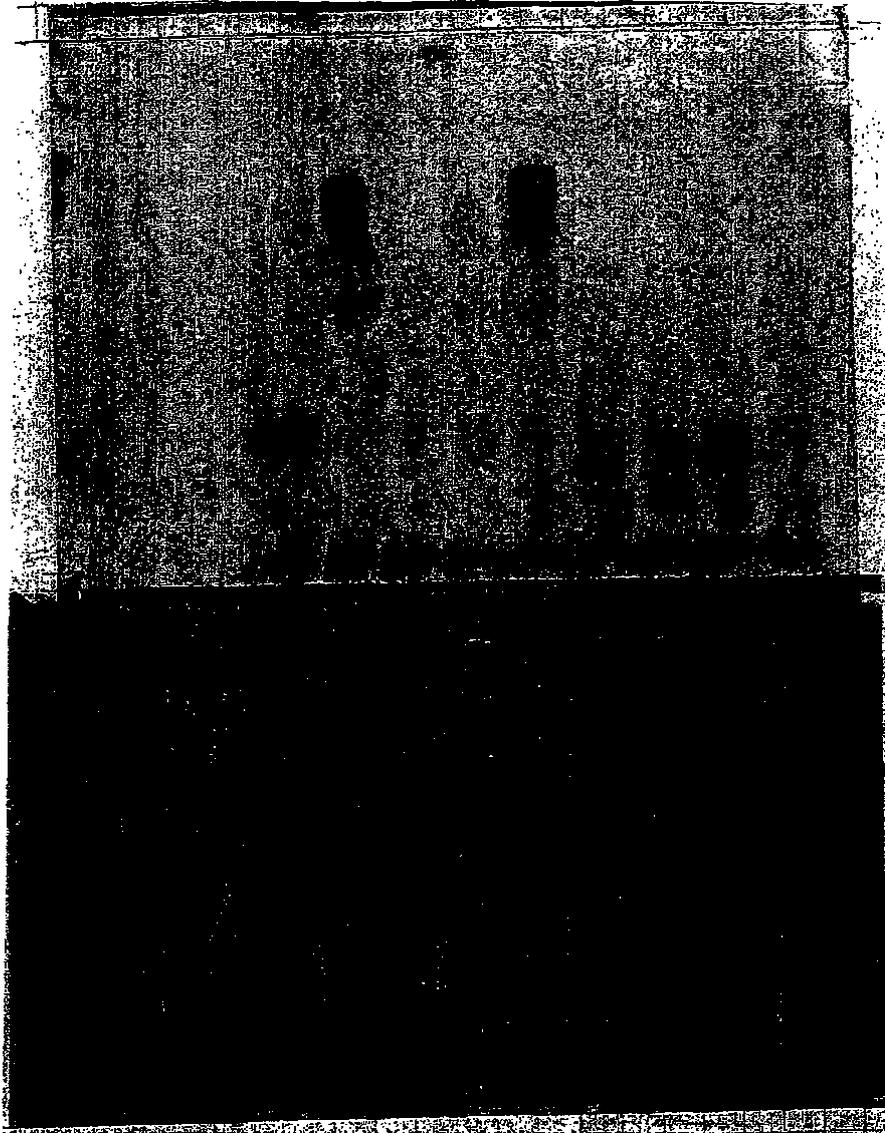
CGGATTTTAGCCACGACAACAGCATGGTCTCCATCTTCTCAGCAGCTGGGCTTCTACAACCTGACTACCTT 980  
 A D F S H D N S M V S I F S A L S L V N S T T T

GCTACCAAAGGACCATATTGTGCCCGCATCAAGCCGACGCTACTCATGGACATGGGTACTCCCTTT 1050  
 L P K D H I V P A I X A H G Y S S T H V V P F

GGAGCCAGAATGTACGTCGAGAACTCGAGTGTGGTCCACGAGGAATGAAAAGAGAGACGAGTACGTC 1120  
 G A R N Y V E K L E C G A S R N E K R D E Y V

GAGTCCTGCTCAACGACCGAGTGATGTCCCTCGAACCCTGCGGAGCGGAGTACGGGCTCTGCAGACT 1190  
 R V L V N D R V M S L E T C G G C D E Y G L C K L

AGAAAACCTTTGTTGGAGAGTCTGTCTGTTTGGCCCTCGGGAGGAAACTGGGATCAATGGGTTGGATAA 1257  
 E N F V B S L G F A A S G G N W D Q C G G



**FIG.  
24A**

**FIG.  
24B**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12