

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 513 217**

51 Int. Cl.:

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2008** **E 08725296 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014** **EP 2115143**

54 Título: **Fitasas de Buttiauxella sp. variantes que tienen propiedades alteradas**

30 Prioridad:

07.02.2007 US 900237 P

06.03.2007 US 905222 P

06.03.2007 US 714487

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2014

73 Titular/es:

**DANISCO US, INC., GENENCOR DIVISION
(100.0%)
925 PAGE MILL ROAD
PALO ALTO, CA 94304, US**

72 Inventor/es:

**CERVIN, MARGUERITE A.;
KENSCH, OLIVER;
KETTLING, ULRICH;
KIM, STEVE;
LEUTHNER, BIRGITTA;
MIASNIKOV, ANDREI;
PELLENGAHR, KLAUS y
WARD, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 513 217 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

Fitasas de *Buttiauxella sp.* variantes que tienen propiedades alteradas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a fitasas de *Buttiauxella spp.* variantes, a ácidos nucleicos que codifican para las fitasas y a un método de expresión heteróloga. Las fitasas englobadas por la invención pueden usarse en aplicaciones industriales incluyendo métodos para licuefacción de almidón, fermentaciones alcohólicas y para potenciar la digestión de fosfato en alimentos y piensos.

Antecedentes de la invención

El fósforo (P) es un elemento esencial para el crecimiento. Una cantidad sustancial del fósforo encontrado en alimento para ganado convencional, por ejemplo, granos de cereales, harina de semillas oleaginosas y subproductos que se originan a partir de semillas, está en forma de fosfato que se une covalentemente en una molécula conocida como fitato. La biodisponibilidad del fósforo en esta forma generalmente es bastante baja para animales no rumiantes, tales como aves de corral y cerdos, porque carecen de enzimas digestivas para separar el fósforo de la molécula de fitato.

Pueden indicarse varias consecuencias importantes de la incapacidad de los animales no rumiantes para utilizar fitato. Por ejemplo, se incurre en gasto cuando se añade fósforo inorgánico (por ejemplo, fosfato de dicalcio, fosfato desfluorado) o productos animales (por ejemplo, harina de carne y huesos, harina de pescado) para cumplir los requisitos nutricionales de los animales para el fósforo. Adicionalmente, el fitato puede unirse a o quelar varios minerales (por ejemplo, calcio, zinc, hierro, magnesio y cobre) en el tracto gastrointestinal, convirtiéndolos de ese modo en no disponibles para la absorción. Además, la mayoría del fitato presente en alimento para animales pasa a través del tracto gastrointestinal, elevando la cantidad de fósforo en el estiércol. Esto conduce a un aumento de la carga de fósforo ecológica en el entorno.

Se ha encontrado que la fitasa microbiana, como aditivo de alimento para animales, mejora la biodisponibilidad del fósforo de fitato en dietas típicas de animales no rumiantes (véase, por ejemplo, Cromwell, *et al*, 1993). El resultado es una disminución de la necesidad de añadir fósforo inorgánico a los piensos, así como niveles de fósforo inferiores en el estiércol excretado (véase, por ejemplo, Kornegay, *et al*, 1996). Además de un aditivo de alimento para animales, las fitasas pueden usarse para la producción de fracciones de alimento para animales con poca cantidad de fitina. Por ejemplo, pueden usarse fitasas en la molienda en húmedo de granos para la producción de, por ejemplo, líquido de maceración del maíz con poca cantidad de fitina y gluten de maíz con poca cantidad de fitina o en un procedimiento de molienda en seco en combinación con enzimas que hidrolizan almidón para la producción de glucosa y alcoholes (por ejemplo, etanol).

Pese a la ventaja de usar fitasas en estas aplicaciones, sorprendentemente pocas fitasas conocidas han obtenido aceptación generalizada en las industrias de alimento para animales, licuefacción de almidón y fermentación alcohólica. Los motivos de esto varían de una enzima a otra. Los problemas típicos se refieren a altos costes de fabricación y/o poca estabilidad/actividad de la enzima en el entorno de la aplicación deseada. Una fitasa debe cumplir diversos criterios enzimáticos si ha de ser atractiva para el uso generalizado en aplicaciones industriales. Los criterios enzimáticos más importantes incluyen una actividad específica global alta, un óptimo de pH bajo, resistencia a proteasas gastrointestinales y termoestabilidad.

La termoestabilidad es uno de los requisitos previos más importantes para la aplicación satisfactoria de fitasa como enzima de alimento para animales y para su uso en procedimientos de licuefacción de almidón porque la fitasa en el alimento para animales y/o los procedimientos se exponen a temperaturas elevadas. Por ejemplo, en los procedimientos de preparación de gránulos de alimento para animales, las temperaturas son de entre 60 y 95°C y en procedimientos de licuefacción de almidón las temperaturas son de entre 75 y 120°C.

En el documento WO 06/043178, publicado el 27 de abril de 2006, se notificó la secuencia de ADN de un gen de *Buttiauxella sp* P1-29 que codifica para una fitasa. Se hace referencia a SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y a la secuencia de aminoácidos del gen de fitasa de *Buttiauxella sp* P1-29 (SEQ ID NO: 3) notificadas en el mismo. Basándose en diversas propiedades intrínsecas, la fitasa de *Buttiauxella sp* P1-29 representaba un punto de partida excelente desde el que comenzar un programa de mutagénesis para lograr una fitasa termoestable para diversas aplicaciones comerciales. El documento WO 06/043178 da a conocer numerosas variantes de la fitasa de *Buttiauxella sp* P1-29 (véase por ejemplo la tabla 1). Al menos una variante dada a conocer en el documento WO 06/043178 y designada en el presente documento BP-11 se ha modificado adicionalmente. En el presente documento se describen variantes que tienen propiedades alteradas, tales como propiedades mejoradas, incluyendo pero sin limitarse a a) termoestabilidad mejorada, b) actividad específica aumentada y/o c) actividad específica aumentada con retención de termoestabilidad en comparación con la fitasa de *Buttiauxella sp* P1-29 o la variante BP-11.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente descripción se refiere a una fitasa que es el producto de expresión de una secuencia de ADN mutada que codifica para una fitasa, derivándose la secuencia de ADN mutada de un precursor de una fitasa de *Buttiauxella spp.* En una realización, la fitasa se deriva de *Buttiauxella sp* cepa P1-29.

En un aspecto adicional, la descripción se refiere a una variante de fitasa, comprendiendo dicha variante una sustitución que corresponde a las posiciones A122, D125, T167, F197, T209, A211, K240, A242, S281, Q289, A294 y N303 en una fitasa derivada de *Buttiauxella sp* cepa P1-29.

En el presente documento también se describe una fitasa aislada que comprende una sustitución que corresponde a las posiciones A122, D125, T167, F197, T209, A211, K240, A242, S281, Q289, A294 y N303 de SEQ ID NO: 1 y que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% que incluye las sustituciones de variante con los residuos de aminoácido 34-446 de SEQ ID NO: 1. En una realización, la sustitución comprende A122T, D125A, T167I, F197S, T209K, A211P, K240E, A242S, S281L, Q289Y, A294E y N303K de SEQ ID NO: 1. En otra realización, la sustitución corresponde a las posiciones R51, R55, T58, K59, D125, R127, K164, N239, G248, T252, E255, E276, H286, F290, M293, N303, H339, D340, T341 y/o D361 de SEQ ID NO: 1.

En el presente documento también se describe una variante de la fitasa designada BP-11, comprendiendo dicha variante una sustitución que corresponde a las posiciones R24, R28, T31, K32, D98, R100, K137, N212, G221, T225, E228, E249, H259, F263, M266, N276, H312, D313, T314 y/o D334 de SEQ ID NO: 4. En una realización, la variante BP-11 tiene una sustitución en una posición que corresponde a D98. En una realización preferida, la sustitución es D98A.

La presente invención se refiere a un polipéptido que tiene actividad fitasa que comprende SEQ ID NO: 3 (figura 1C) y que tiene actividad específica aumentada. En una realización, la invención se refiere a un polipéptido que tiene actividad fitasa que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (figura 1C).

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un ADN aislado que codifica para una variante de fitasa englobada por la invención y vectores de expresión que incluyen dicho ADN.

Aún en un aspecto adicional, la invención se refiere a una *Buttiauxella sp.* variante que tiene características de fitasa mejoradas. En una realización, la característica de fitasa mejorada será estabilidad térmica potenciada en comparación con BP-11.

En otros aspectos, la invención se refiere a composiciones enzimáticas que comprenden una proteína que tiene actividad fitasa en la que la composición enzimática se usa en aplicaciones comerciales. En una realización, la composición enzimática puede ser una composición de pienso. En otras realizaciones, la composición enzimática puede usarse en procedimientos de hidrólisis de almidón (por ejemplo, licuefacción). En realizaciones adicionales, una composición enzimática que comprende una fitasa englobada por la invención incluirá enzimas adicionales, tales como glucoamilasas, alfa amilasas, proteasa, celulasas y combinaciones de las mismas.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un medio de fermentación que incluye una variante de fitasa de *Buttiauxella* que comprende la secuencia mostrada en la figura 1C a partir de un cultivo de células de hongo filamentoso. En un aspecto, las células de hongo filamentoso son células de *Trichoderma*, tales como *T. reesei*. Además, en el presente documento se describen fitasas que tienen una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad de secuencia del 75% con SEQ ID NO: 1, tal como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a métodos para producir una fitasa en una célula huésped de hongo filamentoso transformando una célula huésped de hongo filamentoso con un constructo de ADN que incluye un promotor que tiene actividad transcripcional en la célula huésped de hongo filamentoso operativamente unido a un polinucleótido heterólogo que codifica para una fitasa que tiene actividad fitasa que comprende la secuencia mostrada en la figura 1C, cultivando la célula huésped de hongo filamentoso transformada en un medio de cultivo adecuado para permitir la expresión de dicha fitasa y produciendo la fitasa. El método también puede incluir recuperar la fitasa producida. En una realización, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Trichoderma*, tal como *T. reesei*. En un aspecto, la fitasa tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 (figura 1C). En otro aspecto, la invención es una célula de *Trichoderma* obtenida según el método explicado de manera resumida anteriormente en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A representa el polipéptido codificado por el gen de fitasa de *Buttiauxella* P1-29 (BP-WT) (SEQ ID NO: 1) que incluye la secuencia señal nativa y la proteína madura (SEQ ID NO: 2). La secuencia señal está subrayada.

La figura 1B representa la proteína madura de la BP-11 variante sin una secuencia señal pero incluyendo etiquetas de His N-terminales (SEQ ID NO: 4). La variante BP-11 tiene una sustitución de 11 residuos de aminoácido cuando

se alinea con BP-WT. Estas sustituciones están resaltadas y subrayadas en la figura.

La figura 1C representa la proteína madura de la fitasa de *Buttiauxella* variante (BP-17) (SEQ ID NO: 3). La variante BP-17 tiene las mismas sustituciones de 11 aminoácidos que BP-11 mas una (1) sustitución adicional, que está resaltada y subrayada en la figura.

La figura 2 ilustra el vector de expresión pCDP(SHOK) tal como se describe más completamente en el ejemplo 3.

La figura 3 muestra la comparación del perfil de pH de BP-17 expresada en *E. coli* y BP-WT tal como se describe adicionalmente en el ejemplo 3.

La figura 4 muestra la resistencia a la pepsina de BP-WT y del mutante BP-17 tal como se describe adicionalmente en el ejemplo 3.

La figura 5 ilustra el constructo de fusión pTREX4/fitasa tal como se comenta adicionalmente en el ejemplo 4.

La figura 6 ilustra el constructo directo pTREX4/fitasa tal como se comenta adicionalmente en el ejemplo 6.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Singleton, *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2D ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Marham, THE HARPER COLUMNS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan al experto un diccionario general de muchos de los términos usados en esta invención.

Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique de otro modo, las secuencias de ácido nucleico se escriben de izquierda a derecha en orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación de amino a carboxilo, respectivamente.

Los encabezamientos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la invención que pueden realizarse mediante referencia a la memoria descriptiva en su totalidad. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente mediante referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

Ahora se describirá la presente invención mediante la siguiente serie de párrafos numerados:

1. Una variante de fitasa aislada, comprendiendo dicha variante la secuencia mostrada en la figura 1C y que tiene actividad específica aumentada.

2. La variante de fitasa según el párrafo 1, en la que la variante tiene estabilidad térmica aumentada, estabilidad proteolítica superior o actividad específica superior que la fitasa que tiene la secuencia de residuos de aminoácido 7-419 de la secuencia mostrada en la figura 1B.

3. UN ADN que codifica para una variante de fitasa según uno cualquiera de los párrafos anteriores.

4. Un vector de expresión que comprende el ADN según el párrafo 3.

5. Una célula huésped transformada con el vector de expresión según el párrafo 4.

6. Una composición enzimática que comprende una variante de fitasa según uno cualquiera de los párrafos 1 a 2.

7. La composición enzimática según el párrafo 6, en la que dicha composición es una composición de pienso, una composición para su uso en un procedimiento de licuefacción de almidón o una composición para su uso en un procedimiento de fermentación alcohólica.

8. La composición enzimática según el párrafo 7, que comprende además una enzima seleccionada del grupo de glucoamilasa, alfa amilasa, proteasas, celulasas, xilanasas y combinaciones de las mismas.

9. Un medio de fermentación que comprende la variante de fitasa según uno cualquiera de los párrafos 1 a 2 producida a partir de un cultivo de células de hongo filamentoso.

10. El medio de fermentación según el párrafo 9, en el que las células de hongo filamentoso son células de

Trichoderma tales como células de *T. reesei*.

11. Un método para producir una variante de fitasa según uno cualquiera de los párrafos 1 a 2 en una célula huésped, que comprende:

a) transformar una célula huésped con un constructo de ADN que incluye un promotor que tiene actividad transcripcional en la célula huésped operativamente unido a un polinucleótido heterólogo que codifica para una variante de fitasa según uno cualquiera de los párrafos 1 a 2;

b) cultivar la célula huésped transformada en un medio de cultivo adecuado para permitir la expresión de dicha fitasa y

c) producir la fitasa.

12. El método según el párrafo 11:

(i) en el que la célula huésped es una célula fúngica, una célula bacteriana o una célula vegetal; o

(ii) en el que la célula es una célula de levadura o una célula de hongo filamentoso; o

(iii) que comprende adicionalmente recuperar la fitasa producida; o

(iv) en el que la célula huésped es una célula huésped de hongo filamentoso y la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Trichoderma*; o

(v) en el que la célula de *Trichoderma* es una célula de *T. reesei*.

Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, el término "fitasa" o "actividad fitasa" se refiere a una proteína o polipéptido que puede catalizar la hidrólisis de fitato a (1) mioinositol y/o (2) mono, di, tri, tetra y/o pentafosfatos del mismo y (3) fosfato inorgánico. Por ejemplo, enzimas que tienen actividad catalítica tal como se define en el número de la Comisión de Enzimas CE 3.1.3.8 o en el número de CE 3.1.3.26.

El término "una fitasa de *Buttiauxella* spp.", tal como se usa en el presente documento se refiere a una proteína fitasa obtenida de una *Buttiauxella* spp. En una realización, la fitasa de *Buttiauxella* spp. comprende la secuencia de aminoácidos de NCIMB (Colecciones Nacionales de Bacterias Marinas y Alimenticias Industriales, *National Collection of Industrial Marine and Food Bacteria*, Escocia, RU), número de registro NCIMB 41248. En una realización preferida, una fitasa de *Buttiauxella* spp. comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o los residuos de aminoácido 34 a 446 de SEQ ID NO: 1.

El término "que corresponde a una fitasa de *Buttiauxella* spp.", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una enzima que tiene las mismas características funcionales o secuencia de una fitasa de *Buttiauxella* spp., pero no obtenida necesariamente de una fuente de *Buttiauxella* spp.

El término "*Buttiauxella*" se refiere a un género de bacterias Gram negativas, facultativamente anaerobias de la familia *Enterobacteriaceae* y *Buttiauxella* spp incluye *B. agrestis*, *B. brennerase*, *B. ferragutiae*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae* y *B. warmboldiae*. Están disponibles cepas de las especies de *Buttiauxella* por ejemplo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y DSMZ, el Centro de Recursos Nacional Alemán para Material Biológico.

El término "fitasa de tipo natural" o "tipo natural" se refiere a una enzima con una secuencia de aminoácidos encontrada en la naturaleza.

El término "fitasa de *Buttiauxella* spp. variante" significa una enzima fitasa con una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de una fitasa original o fitasa precursora pero que difiere en al menos una sustitución, inserción y/o delección de aminoácido que juntas se denominan mutaciones.

El término "fitasa madura" se refiere a una fitasa tras el procesamiento de señales, tal como eliminación de las secuencias señal de secreción.

El término "BP-11" indica una fitasa que comprende la secuencia de aminoácidos de las posiciones 7-419 de SEQ ID NO: 4. BP-11 es una variante de una fitasa de *Buttiauxella* spp. de tipo natural que tiene la SEQ ID NO: 1.

El término "BP-17" indica una fitasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

"Proteína", tal como se usa en el presente documento, incluye proteínas, polipéptidos y péptidos. Tal como

apreciarán los expertos en la técnica, las secuencias de ácido nucleico de la invención, tal como se definen a continuación y se describen adicionalmente en el presente documento, pueden usarse para generar secuencias de proteína.

5 Los términos “residuo de aminoácido equivalente a”, “aminoácido que corresponde a” y equivalentes gramaticales de los mismos se usan en el presente documento para referirse a un residuo de aminoácido de una proteína que tiene la posición y efecto similares a los indicados en una secuencia de aminoácidos particular de una proteína particular. El experto en la técnica reconocerá la equivalencia de residuos especificados en proteínas fitasa comparables.

10 “Identidad de secuencia en porcentaje”, con respecto a dos secuencias de polinucleótido o aminoácidos, se refiere al porcentaje de residuos que son idénticos en las dos secuencias cuando las secuencias están alineadas de manera óptima. Por tanto, una identidad de secuencia de aminoácidos del 80% significa que el 80% de los aminoácidos en dos secuencias de polipéptido alineadas de manera óptima son idénticos. La identidad en porcentaje puede determinarse, por ejemplo, mediante una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas
15 alineando las secuencias, contando el número exacto de coincidencias entre dos secuencias alineadas, dividiendo entre la longitud de la secuencia más corta y multiplicando el resultado por 100. Pueden usarse programas informáticos fácilmente disponibles para ayudar en el análisis, tales como ALIGN, Dayhoff, M.O. en “Atlas of Protein Sequence and Structure”, M.O. Dayhoff ed., supl. 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.*
20 2:482-489 para el análisis de péptidos. Están disponibles programas para determinar la identidad de secuencia de nucleótidos en el Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 (disponible de 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 el fabricante y se describen en el Wisconsin Sequence Analysis Package al que se ha hecho referencia anteriormente. Un ejemplo
25 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 realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional para Información de Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

30 El término “propiedad” o equivalentes gramaticales del mismo en el contexto de un polipéptido, tal como se usa en el presente documento, se refieren a cualquier característica o atributo de un polipéptido que puede seleccionarse o detectarse. Estas propiedades incluyen, pero no se limitan a estabilidad oxidativa, especificidad de sustrato, actividad catalítica, estabilidad térmica, perfil de actividad de pH y capacidad para secretarse.

35 Los términos “estable térmicamente” y “termoestable” se refieren a fitasas de la presente invención que conservan una cantidad especificada de actividad enzimática tras la exposición a temperatura elevada.

El término “estabilidad potenciada” en el contexto de una propiedad tal como termoestabilidad se refiere a una actividad enzimática conservada superior a lo largo del tiempo en comparación con otras fitasas.

40 Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico”, usados de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, o bien ribonucleótidos o bien desoxirribonucleótidos. Estos términos incluyen, pero no se limitan a, un ADN mono, bi o tricatenario, ADN genómico, ADNc, ARN, híbrido de ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina, u otras bases de nucleótidos naturales, modificadas química, bioquímicamente, no naturales o derivatizadas.

45 Tal como se usa en el presente documento el término “gen” se refiere a un polinucleótido (por ejemplo, un segmento de ADN), que codifica para un polipéptido e incluye regiones anteriores y posteriores a las regiones codificantes así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

50 Tal como se usa en el presente documento, los términos “constructo de ADN”, “ADN transformante” y “vector de expresión” se usan de manera intercambiable para referirse a ADN usado para introducir secuencias en un organismo o célula huésped. El ADN puede generarse *in vitro* mediante PCR o cualquier otra técnica adecuada conocida por los expertos en la técnica. El constructo de ADN, ADN transformante o casete de expresión recombinante puede incorporarse en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN de plasto, virus o fragmento
55 de ácido nucleico. Normalmente, la parte de casete de expresión recombinante de un vector de expresión, constructo de ADN o ADN transformante incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que va a transcribirse y un promotor. En realizaciones preferidas, los vectores de expresión tienen la capacidad de incorporar y expresar fragmentos de ADN heterólogos en una célula huésped.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término “vector” se refiere a un constructo de polinucleótido diseñado para introducir ácidos nucleicos en uno o más tipos celulares. Los vectores incluyen vectores de clonación, vectores de expresión, vectores lanzadera, plásmidos, casetes y similares.

65 Tal como se usa en el presente documento en el contexto de introducir una secuencia de ácido nucleico en una célula, el término “introducido” se refiere a cualquier método adecuado para transferir la secuencia de ácido nucleico al interior de la célula. Tales métodos para la introducción incluyen pero no se limitan a fusión de protoplastos,

transfección, transformación, conjugación y transducción e incluyen la referencia a la incorporación de una secuencia de ácido nucleico en una célula eucariota o procariota en la que la secuencia de ácido nucleico puede incorporarse en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, ADN mitocondrial o de plasto), convertido en un replicón autónomo, o expresado de manera transitoria (por ejemplo, ARNm transfectado).

El término “alineación óptima” se refiere a la alineación que da la puntuación de identidad en porcentaje más alta.

Los términos “proteína” y “polipéptido” se usan de manera intercambiable en el presente documento. En la presente descripción y en las reivindicaciones, se usan los códigos convencionales de una letra y tres letras para residuos de aminoácido. El código de 3 letras para aminoácidos tal como se define de conformidad con la Comisión Conjunta de Nomenclatura Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB. También se entiende que un polipéptido puede codificarse por más de una secuencia de nucleótidos debido a la degeneración del código genético.

Las variantes de la invención se describen mediante la siguiente nomenclatura: [residuo de aminoácido original/posición/residuo de aminoácido sustituido]. Por ejemplo la sustitución de arginina (R) por ácido glutámico (E) en la posición 51 de SEQ ID NO: 1 se representa como R51E. Cuando se sustituye más de un aminoácido en una posición dada, la sustitución se representa como 1) R51E, R51A, R51H o R51W; 2) R51E, A, H, o W o c) R51/E/A/H/W. Cuando una posición adecuada para sustitución se identifica en el presente documento sin un aminoácido específico sugerido, ha de entenderse que el residuo de aminoácido presente en la posición puede sustituirse por cualquier residuo de aminoácido. Cuando una fitasa variante contiene una delección en comparación con otras fitasas, la delección se indica con “*”. Por ejemplo, una delección en la posición R51 se representa como R51*. Una delección de dos o más aminoácidos consecutivos se indica por ejemplo como (51-54)*.

Una “prosecuencia” es una secuencia de aminoácidos entre la secuencia señal y la proteína madura que es necesaria para la secreción de la proteína. La escisión de la prosecuencia dará como resultado una proteína activa madura.

El término “secuencia señal” o “péptido señal” se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos que puede participar en la secreción de las formas maduras o precursoras de la proteína. Esta definición de secuencia señal es una definición funcional, que pretende incluir todas las secuencias de aminoácidos codificadas por la parte N-terminal del gen de la proteína, que participan en llevar a efecto la secreción de la proteína. A menudo, pero no de manera universal, se unen a la parte N-terminal de una proteína o a la parte N-terminal de una proteína precursora.

“Cepa huésped” o “célula huésped” se refiere a un huésped adecuado para un vector de expresión que comprende ADN según la presente invención.

Los términos “derivada de” y “obtenida de” se refieren no sólo a una fitasa producida o que puede producirse mediante una cepa del organismo en cuestión, sino también a una fitasa codificada por una secuencia de ADN aislada de tal cepa y producida en un organismo huésped que contiene tal secuencia de ADN. Adicionalmente, el término se refiere a una fitasa que está codificada por una secuencia de ADN de origen de ADNc y/o sintético y que tiene las características de identificación de la fitasa en cuestión.

El término “aislado”, “recubierto” o “purificado” se refiere a un material que se retira de su entorno original.

Un “alimento para animales” y un “alimento”, respectivamente, significa cualquier dieta, comida o similar, natural o artificial, o componentes de tales comidas destinados a o adecuados para comerse, tomarse, digerirse, por un animal y un ser humano, respectivamente.

Un “aditivo de alimento o de alimento para animales” es un compuesto esencialmente puro o una composición de múltiples componentes destinado a o adecuado para añadirse a alimento o alimento para animales. Habitualmente comprende uno o más compuestos tales como vitaminas, minerales o enzimas de potenciación de alimento para animales y portadores y/o excipientes adecuados, y habitualmente se proporciona en una forma que es adecuada para añadirse al pienso.

El término “licuefacción de almidón” se refiere a un procedimiento mediante el cual el almidón se convierte en dextrinas menos viscosas y de cadena más corta.

El término “fitasa de *Buttiauxella* nativa (fitasa de *Buttiauxella*-n)” se refiere a una fitasa de *Buttiauxella* producida a partir de la expresión endógena de la fitasa de *Buttiauxella*. Por ejemplo, el término “fitasa de *Buttiauxella*-n” significa la expresión endógena de una fitasa de *Buttiauxella* (es decir, SEQ ID NO: 1) a partir de una especie de *Buttiauxella*.

Los términos “fitasa de *Buttiauxella* recombinante (fitasa de *Buttiauxella*-r)”, “fitasa de *Buttiauxella* expresada de manera recombinante” y “fitasa de *Buttiauxella* producida de manera recombinante” se refieren a una secuencia de proteína fitasa de *Buttiauxella* madura o variante que se produce en una célula huésped a partir de la expresión de un polinucleótido heterólogo. Por ejemplo, el término “fitasa de *Buttiauxella*-r” significa que la fitasa de *Buttiauxella* (es decir, SEQ ID NO: 1, 2 ó 3) se expresa en un huésped en el que se ha introducido un polinucleótido que codifica

para la fitasa de *Buttiauxella* o una variante.

Un “promotor” es una secuencia reguladora que está implicada en la unión a ARN polimerasa para iniciar la transcripción de un gen.

“Bajo el control transcripcional” es un término bien entendido en la técnica que indica que la transcripción de una secuencia de polinucleótido, habitualmente una secuencia de ADN, depende de si está operativamente unida a un elemento que contribuye al inicio de, o promueve la transcripción.

“Bajo el control de la traducción” es un término bien entendido en la técnica que indica un proceso regulador que se produce una vez formado el ARNm.

Tal como se usa en el presente documento cuando se describen proteínas y genes que codifican para las mismas, el término para el gen está en cursiva, (por ejemplo, el gen que codifica para la fitasa de *Buttiauxella*). El término para la proteína generalmente no está en cursiva y la primera letra generalmente está en mayúsculas.

El término “operativamente unido” se refiere a la yuxtaposición en la que los elementos están en una disposición que les permite relacionarse funcionalmente. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia.

El término “marcador selectivo” se refiere a un gen que puede expresarse en un huésped que permite una fácil selección de los huéspedes que contienen un ácido nucleico o vector introducido. Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen pero no se limitan a agentes antimicrobianos (por ejemplo, higromicina, bleomicina o cloranfenicol) y/o genes que confieren una ventaja metabólica, tal como una ventaja nutricional sobre la célula huésped.

El término “heterólogo” con referencia a un polinucleótido o proteína se refiere a un polinucleótido o proteína que no se produce de manera natural en una célula huésped.

El término “endógeno” con referencia a un polinucleótido o proteína se refiere a un polinucleótido o proteína que se produce de manera natural en la célula huésped.

Los términos “recuperado”, “aislado” y “separado” tal como se usan en el presente documento se refieren a un compuesto, proteína, célula, ácido nucleico o aminoácido que se retira de al menos un componente con el que está asociado de manera natural.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “transformado”, “transformado de manera estable” y “transgénico” usados en referencia a una célula significan que la célula tiene una secuencia de ácido nucleico no nativa (por ejemplo, heteróloga) integrada en su genoma o como un plásmido episómico que se mantiene a través de múltiples generaciones.

Tal como se usa en el presente documento, el término “expresión” se refiere al proceso por el cual se produce un polipéptido basándose en la secuencia de ácido nucleico de un gen. El proceso incluye tanto transcripción como traducción.

Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la presente invención, ahora se describen métodos y materiales a modo de ejemplo y preferidos.

A lo largo de la memoria descriptiva pueden aparecer otras definiciones de términos. Antes de que se describan las realizaciones a modo de ejemplo en más detalle, ha de entenderse que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que naturalmente éstas pueden variar. También ha de entenderse que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende ser limitativa, puesto que el alcance de la presente invención quedará limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que también se da a conocer específicamente cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente otra cosa, entre los límites superior e inferior de ese intervalo. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor establecido o valor intermedio en un intervalo establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en el intervalo establecido está englobado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo, y cada intervalo en el que se incluye cualquiera, ninguno o ambos límites en los intervalos más pequeños también está englobado dentro de la invención, sujeto a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, también se incluyen en la invención intervalos que excluyen cualquiera o ambos de aquellos límites incluidos.

Debe indicarse que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “un gen” incluye una pluralidad de tales agentes candidatos y la referencia a “la célula” incluye la referencia a una o más células y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la técnica, etc.

Las publicaciones comentadas en el presente documento se facilitan únicamente por su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento ha de interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder a tal publicación en virtud de la invención anterior.

Enzimas fitasas/variantes:

Las enzimas fitasas usadas como enzimas originales o precursoras incluyen una fitasa de *Buttiauxella sp.* y aquellas enzimas que corresponden a una fitasa de *Buttiauxella sp.*. En algunas realizaciones, la fitasa de *Buttiauxella sp.* original comprende la secuencia de aminoácidos de NCIMB (Colecciones Nacionales de Bacterias Marinas y Alimenticias Industriales, Escocia, RU) número de registro NCIMB 41248. En algunas realizaciones, la fitasa de *Buttiauxella sp.* original comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o los residuos de aminoácido 34 a 446 de SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, la fitasa de *Buttiauxella sp.* original se deriva de *B. agrestis*, *B. brennerase*, *B. ferragutiae*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae* y *B. warmboldiae*. Se hace referencia al documento WO 2006/043178, que describe fitasas que pueden obtenerse de o derivarse de una *Buttiauxella sp.* original y fitasas que corresponden a una enzima fitasa de *Buttiauxella sp.* En algunas realizaciones, una fitasa de *Buttiauxella sp.* de tipo natural tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 93%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, y al menos el 99% con respecto al polipéptido de SEQ ID NO: 1 o al polipéptido de SEQ ID NO: 2.

La presente invención se refiere a fitasas variantes (por ejemplo, fitasas de *Buttiauxella sp.* variantes). Específicamente, el documento WO 2006/043178 describe la mutagénesis de una enzima fitasa de tipo natural que tiene la secuencia dada a conocer en el mismo como SEQ ID NO: 3 y se denomina en la presente solicitud SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. En el documento WO 2006/043178 se enseñan varias mutaciones preferidas. Una fitasa variante contendrá al menos una sustitución, delección o inserción de aminoácidos, prefiriéndose particularmente las sustituciones de aminoácidos. La sustitución, inserción o delección de aminoácidos puede producirse en cualquier residuo dentro del péptido de fitasa. Una variante de fitasa de la presente invención es una variante que no tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en el presente documento.

En realizaciones preferidas de la presente descripción, la variante comprenderá una sustitución que corresponde a las posiciones A122, D125, T167, F197, T209, A211, K240, A242, S281, Q289, A294 y N303 en una fitasa de *Buttiauxella sp.* y más específicamente que corresponde a dichas posiciones equivalentes en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la sustitución comprende cualquiera de los 19 aminoácidos restantes que corresponden a A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y. En algunas realizaciones, la variante comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos A122T, D125A, T167I, F197S, T209K, A211P, K240E, A242S, S281L, Q289Y, A294E y N303K que corresponden a SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, la fitasa es una variante de la fitasa designada BP-11, comprendiendo dicha variante BP-11 los residuos de aminoácido 7-419 de SEQ ID NO: 4. BP-11 es una variante de la BP-WT (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2).

En algunas realizaciones, dicha variante de la fitasa BP-11 comprende al menos una sustitución que corresponde a las posiciones R24, R28, T31, K32, D98, R100, K137, N212, G221, T225, E228, E249, H259, F263, M266, N276, H312, D313, T314 y/o D334 de SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% y al menos el 99% inclusive de las sustituciones de variante de los residuos de aminoácido 7-419 de SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la variante incluirá más de una sustitución, por ejemplo dos, tres, cuatro o más sustituciones. En otra realización, la variante de BP-11 tiene una sustitución en una posición que corresponde a D98. Aunque la sustitución puede ser en cualquiera de los 19 aminoácidos restantes, en una realización preferida, la sustitución es D98A. En realizaciones adicionales, la variante BP-11 que tiene una sustitución que corresponde a la posición D98 incluirá una o más sustituciones del grupo que corresponde a las posiciones R24, R28, T31, K32, R100, K137, N212, G221, T225, E228, E249, H259, F263, M266, N276, H312, D313, T314 y/o D334 de SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la variante tiene la misma actividad o mayor que la de la fitasa BP-11.

En una realización particularmente preferida, la variante de fitasa comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 3. En otra realización, la variante de fitasa consiste en el polipéptido de SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, una variante según la descripción que incluye una sustitución de aminoácido en las

posiciones A122, D125, T167, F197, T209, A211, K240, A242, S281, Q289, A294 y N303 de SEQ ID NO: 1 comprenderá además una fitasa que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94% y al menos el 95% inclusive de las sustituciones de variante con los residuos de aminoácido 34-446 de la fitasa de tipo natural de SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, una variante según la descripción incluirá además de una sustitución que corresponde a las posiciones A122, D125, T167, F197, T209, A211, K240, A242, S281, Q289, A294 y N303 en SEQ ID NO: 1, una o más sustituciones que corresponden a los residuos de aminoácido 59, 70, 193, 204, 221, 223, 225, 268, 336 y 351. En algunas realizaciones, la variante incluirá las sustituciones que corresponden a K59E, N70Y, H193R, T204I, S221N, D223E, G225A, A268V, I336F y N351D de SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, una descripción de variante en el presente documento incluirá un fragmento funcional. Un fragmento funcional significa una parte de la fitasa de *Buttiauxella spp.* que conserva la función enzimática, preferiblemente el fragmento conserva esencialmente la misma cantidad de función enzimática o una cantidad mayor de función enzimática en comparación con el polipéptido de fitasa del que se derivó. En algunas realizaciones, la variante que es un fragmento incluirá una sustitución que corresponde a las posiciones A122, D125, T167, F197, T209, A211, K240, A242, S281, Q289, A294 y N303 de SEQ ID NO: 1 y al menos 350, al menos 375 o al menos 400 residuos de aminoácido de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una variante descrita en el presente documento (por ejemplo SEQ ID NO: 3) será un fragmento que tiene al menos 350, al menos 375 o al menos 400 residuos de aminoácido.

Las variantes pueden prepararse mediante mutagénesis al azar, mutagénesis de saturación de sitio y mutagénesis específica de sitio de nucleótidos en el ADN que codifica para la proteína fitasa, usando mutagénesis de casete o PCR u otras técnicas bien conocidas en la técnica, para producir variantes, que pueden producirse después en cultivo celular. Se hace referencia a Morinaga *et al.*, (1984) *Biotechnology* 2: 646-649; Nelson y Long, (1989) *Analytical Biochem.*, 180:147-151 y Sarkar y Sommer (1990) *Biotechniques* 8: 404-407. También pueden prepararse fragmentos de proteína fitasa variante mediante síntesis *in vitro* usando técnicas establecidas.

Polinucleótidos:

La presente invención engloba adicionalmente polinucleótidos que codifican para las fitasas variantes según la invención. Un experto en la técnica es consciente de que, debido a la degeneración del código genético, pueden producirse secuencias de nucleótidos en las que se ha cambiado el uso del codón triplete para algunos de los aminoácidos codificados por una secuencia original produciendo de ese modo una secuencia de nucleótidos diferente, pero una que codifica para la misma fitasa que la secuencia de nucleótidos original. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que tiene un cambio en la tercera posición en el codón triplete para todos los codones tripletes sería idéntica en aproximadamente el 66% a la secuencia original, sin embargo, la secuencia de nucleótidos modificada codificaría para la misma fitasa (por ejemplo, que tiene la misma secuencia de aminoácidos primaria).

Pueden obtenerse polinucleótidos mediante procedimientos convencionales conocidos en la técnica a partir de, por ejemplo, ADN clonado (por ejemplo, una "biblioteca" de ADN), mediante síntesis química, mediante clonación de ADNc, mediante PCR (documento USP 4.683.202 o Saiki *et al.*, (1988) 239:487-491), mediante métodos establecidos sintéticamente (Beucage *et al.*, (1981) *Tetrahedron Letters* 22: 1859-1869 y Matthes *et al.*, (1984) *EMBO J.* 3:801-895) o mediante la clonación del ADN genómico, o fragmentos del mismo, purificados sustancialmente de una célula deseada, tal como una *Buttiauxella sp.* (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, y derivados de las mismas, pueden contener regiones reguladoras además de regiones codificantes.

Tabla 1. Secuencia de polinucleótido de BP-WT

TTTCACATAGCAAACAACGAGACGAACTCGACGTTACCGCTTTGCTT
CTGGAGTATATTTATCAGACTCAAACACCCCAAAGAAAAGAGGCTGTAAA
TGACGATCTCTGCGTTTAACCGCAAAAAACTGACGCTTCACCCTGGTCTG
TTCGTAGCACTGAGCGCCATATTTTCATTAGGCTCTACGGCCTATGCCAA
CGACACTCCCGCTTCAGGCTACCAGGTTGAGAAAGTGGTAATACTCAGCC
GCCACGGGGTGCGAGCACCAACCAAAATGACACAGACCATGCGCGACGTA
ACACCTAATACCTGGCCCGAATGGCCAGTAAAATTGGGTTATATCACGCC
ACGCGGTGAGCATCTGATTAGCCTGATGGGCGGGTTTTATCGCCAGAAGT
TTCAACAACAGGGCATTTTATCGCAGGGCAGTTGCCCCACACCAAACCTCA
ATTTATGTCTGGGCAGACGTTGATCAGCGCACGCTTAAAACTGGCGAAGC
TTTCCTGGCAGGGCTTGCTCCGGAATGTCATTTAACTATTCACCACCAGC
AGGACATCAAAAAAGCCGATCCGCTGTTCCATCCGGTGAAAGCGGGCACC
TGTTCAATGGATAAAACTCAGGTCCAACAGGCCGTTGAAAAAGAAGCTCA
AACCCCCATTGATAATCTGAATCAGCACTATATTCCCTTTCTGGCCTTGA
TGAATACGACCCTCAACTTTTCGACGTCGGCCTGGTGTGAGAAACACAGC
GCGGATAAAAGCTGTGATTTAGGGCTATCCATGCCGAGCAAGCTGTCGAT
AAAAGATAATGGCAACAAAGTCGCTCTCGACGGGGCCATTGGCCTTTTCGT
CTACGCTTGCTGAAATTTTCCTGCTGGAATATGCGCAAGGGATGCCGCAA
GCGGCGTGGGGGAATATTCATTCAGAGCAAGAGTGGGCGTCGCTACTGAA
ACTGCATAACGTCCAGTTTGATTTGATGGCACGCACGCCTTATATCGCCA
GACATAACGGCACGCCTTTATTGCAGGCCATCAGCAACGCGCTGAACCCG
AATGCCACCGAAAGCAAACCTGCCTGATATCTCACCTGACAATAAGATCCT
GTTTATTGCCGGACACGATACCAATATTGCCAATATCGCAGGCATGCTCA
ACATGCGCTGGACGCTACCTGGGCAACCCGATAACACCCCTCCGGGCGGC
GCTTTAGTCTTTGAGCGTTTGGCCGATAAGTCAGGGAAACAATATGTTAG
CGTGAGCATGGTGTATCAGACTCTCGAGCAGTTGCGCTCCCAAACACCAC
TTAGCCTTAATCAACCTGCGGGAAGCGTACAGCTAAAAATTCCTGGCTGT
AACGATCAGACGGCTGAAGGATACTGCCCGCTGTGACGTTCACTCGCGT
GGTTAGCCAAAGCGTGGAACCAGGCTGCCAGCTACAGTAAATATCAGACA
AAAAAATGCCGCTCGCGATTAAGCGAACGGCATTACTTCCTAGCTTCCC
AGCTCGGATTAGCATGGCGAGAGCCGAAAAACTT (SEQ ID NO:5)

Se apreciará que las secuencias de polinucleótido proporcionadas en el documento WO 2006/043178 (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) serán útiles para obtener fragmentos de polinucleótidos idénticos u homólogos de otras cepas que codifican para enzimas que tienen actividad fitasa. La secuencia de polinucleótido (SEQ ID NO: 5) que comprenden el gen de fitasa de *Buttiauxella* P1-29 (BP-WT) se ilustra a continuación en la tabla 1. La secuencia de polinucleótido (SEQ ID NO: 14) que comprende el gen de fitasa de la variante BP-17 se muestra en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Secuencia de polinucleótido de BP-17

AACGAGACCCCGCCAGCGGCTACCAGGTCGAGAAGGTCGTCATCCTCAGCCGCCA
CGGCGTCCGCGCCCCTACCAAGATGACCCAGACCATGCGCGACGTCACCCCCAACA
CCTGGCCCGAGTGGCCCGTCAAGCTCGGCTACATCACCCCTCGCGGCGAGCACCTC
ATCAGCCTCATGGGCGGCTTCTACCGCCAGAAGTTCCAGCAGCAGGGCATCCTCAG
CCAGGGCTCGTGCCCCACCCCCAACAGCATCTACGTCTGGACTGACGTCGCCCAGC
GCACCCTCAAGACCGGCGAGGCCTTCTCGCCGGCCTCGCCCCCAGTGCGGCCTC
ACCATCCACCACCAGCAGAACCTCGAGAAGGCCGACCCCCCTCTTCCACCCCGTCAA
GGCCGGCATCTGCAGCATGGACAAGACCCAGGTCCAGCAGGCCGTCGAGAAGGAGG
CCCAGACCCCCATCGACAACCTCAACCAGCACTACATCCCCAGCCTCGCCCTCATG
AACACCACCCTCAACTTCAGCAAGAGCCCCTGGTGCCAGAAGCACAGCGCCGACAA
GAGCTGCGACCTCGGCCTCAGCATGCCCAGCAAGCTCAGCATCAAGGACAACGGCA
ACGAGGTCTCCCTCGACGGCGCTATCGGCCTCAGCTCCACCCTCGCCGAGATCTTC
CTCCTCGAGTACGCCAGGGCATGCCTCAGGCCGCCTGGGGCAACATCCACAGCGA
GCAGGAGTGGGCCCTCCTCCTCAAGCTCCACAACGTCTACTTCGACCTCATGGAGC
GCACCCCTACATCGCCCGCCACAAGGGCACCCCTCCTCCAGGCCATCAGCAAC
GCCCTCAACCCCAACGCCACCGAGAGCAAGCTCCCCGACATCAGCCCCGACAACAA
GATCCTCTTCATCGCCGGCCACGACACCAACATCGCCAACATCGCCGGCATGCTCA
ACATGCGCTGGACCCTCCCCGGCCAGCCCGACAACACCCCCCTGGCGGCGCTCTC
GTCTTTGAGCGCCTCGCCGACAAGTCCGGCAAGCAGTACGTCAGCGTCAGCATGGT
CTACCAGACCTCGAGCAGCTCCGCAGCCAGACCCCCCTCAGCCTCAACCAGCCTG
CCGGCAGCGTCCAGCTCAAGATCCCCGGCTGCAACGACCAGACCGCCGAGGGCTAC
TGCCCCCTCAGCACCTTCACCCGCGTCGTCAGCCAGAGCGTCGAGCCCGGCTGCCA
GCTCCAGTAA (SEQ ID NO:14)

Propiedades:

En algunas realizaciones, una fitasa variante según la invención tendrá propiedades alteradas. Preferiblemente, una variante según la invención tendrá propiedades mejoradas. En algunas realizaciones, las propiedades alteradas, por ejemplo, mejoradas serán especificad de sustrato, actividad catalítica, estabilidad térmica, perfil de actividad de pH, actividad específica y/o capacidad para liberar grupos fosfato a partir de fitato.

En algunas realizaciones, una variante descrita en el presente documento tendrá estabilidad térmica aumentada en comparación con una fitasa original (por ejemplo, BP-WT o BP-11). En algunas realizaciones, la variante tendrá una diferencia de estabilidad térmica (TD) de al menos 1,5, al menos 2,0, al menos 2,5, al menos 3,0, al menos 5,0, al menos 8,0, al menos 10,0, al menos 15,0, al menos 18,0 y al menos 20,0 en comparación con o bien BP-WT o bien BP-11.

En algunas realizaciones, una variante englobada por la invención (por ejemplo BP-17) tendrá un aumento de termoestabilidad de al menos 3°C, al menos 5°C, al menos 10°C, al menos 12°C, al menos 15°C y al menos 20°C a un pH de 4,5, 5,0, 5,5 ó 6,0. Más específicamente, una variante de la invención (por ejemplo BP-17) será termoestable a aproximadamente 65°C, a aproximadamente 70°C, a aproximadamente 75°C, a aproximadamente 80°C o superior. En algunas realizaciones, una fitasa según la invención se considera termoestable si la enzima conserva más del 50% de su actividad tras la exposición a una temperatura especificada durante 10 minutos a pH 5,5.

En algunas realizaciones, una variante tendrá una estabilidad proteolítica superior (actividad residual). La estabilidad proteolítica puede determinarse mediante los métodos dados a conocer en el documento WO 2006/043178 y se hace referencia específica al ejemplo 12 en el mismo. En algunas realizaciones, la variante englobada por la invención tendrá una actividad residual de al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70% y al menos el 85%.

En algunas realizaciones, la variante de fitasa tendrá una actividad específica mayor del 100%, mayor del 105%, mayor del 110%, y también mayor del 120% de una fitasa original o una variante termoestable de la misma (por ejemplo, BP-WT, SEQ ID NO: 2 o BP-11) a un pH 4,0, a un pH 4,5 y a un pH 5,0. En algunas realizaciones, la variante tendrá una actividad específica superior en al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20% y al menos el 25% en comparación con la fitasa BP-11 o la fitasa BP-WT (SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, una variante descrita en el presente documento conservará esencialmente el mismo nivel de termoestabilidad que BP-WT o BP-11 pero tendrá un aumento en la actividad específica esencialmente en las mismas condiciones (por ejemplo, pH).

En algunas realizaciones, la fitasa variante según la invención tendrá una actividad específica de al menos 100 U/mg, al menos 200 U/mg, al menos 300 U/mg, al menos 350 U/mg, al menos 400 U/mg, al menos 450 U/mg, al menos 500 U/mg, al menos 600 U/mg, al menos 700 U/mg, al menos 800 U/mg, al menos 900 U/mg, al menos 1000 U/mg y al menos 1200 U/mg, en la que la actividad específica se determina incubando la fitasa en una disolución que contiene fitasa 2 mM, CaCl₂ 0,8 mM en tampón acetato de sodio 200 mM a pH 3,5, tal como se detalla en el ejemplo 1 del documento WO 2006/043178. En algunas realizaciones, la actividad específica se determina a un pH 4,0 óptimo.

En algunas realizaciones, una fitasa variante englobada por la invención tendrá una razón de actividad específica cuando se compara con la fitasa codificada por SEQ ID NO: 5 de al menos 110, al menos 120 y al menos 130.

En algunas realizaciones, el máximo de actividad de pH será de al menos 0,1, al menos 0,15, al menos 0,2, al menos 0,25, al menos 0,3, al menos 0,5, al menos 0,6 al menos 0,7, al menos 0,8 y al menos 1,0 unidades de pH inferior que la fitasa de *Buttiauxella sp* correspondiente (por ejemplo SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2) o al menos 0,1, al menos 0,15, al menos 0,2, al menos 0,25, al menos 0,3, al menos 0,5, al menos 0,6, al menos 0,7, al menos 0,8 y al menos 1,0 unidades de pH inferior que la fitasa BP-11. En algunas realizaciones, una variante englobada por la invención tendrá actividad en el intervalo de pH 2,0 a 6,0 y en algunas realizaciones una actividad máxima en torno a de pH 4,0 a pH 5,5 y también en torno a de pH 4,0 a pH 4,5.

En algunas realizaciones, la variante englobada por la invención puede usarse en un método de producción de un compuesto de fosfato que comprende tratar un fitato con una fitasa variante englobada por la invención (por ejemplo, BP-17). El fitato puede ser mioinositol di, tri, tetra y/o penta fosfatos. Otros fosfatos orgánicos adecuados incluyen inositol-tetrafosfatos e inositol-oligofosfatos.

Producción de fitasa en células huésped:

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método de producción de una enzima que tiene actividad fitasa, que comprende: (a) proporcionar una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica para una enzima fitasa variante según la invención, comprendiendo dicha variante al menos una modificación de al menos un residuo de aminoácido tal como se describe en el presente documento; (b) cultivar la célula huésped transformada en condiciones adecuadas para que la célula huésped produzca la fitasa; y (c) recuperar la fitasa.

En algunas realizaciones, el vector de expresión comprenderá un polinucleótido que codifica para una fitasa que comprende SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones de la invención, la cepa huésped se modifica mediante ingeniería genética para que

expresen fitasas o variantes heterólogas que tienen actividad fitasa según la invención en el presente documento.

Células huésped

- 5 Las células huésped útiles para la producción de una fitasa englobada por la invención incluyen células bacterianas, células fúngicas y células vegetales. Las células huésped incluyen tanto las células como la progenie de las células y los protoplastos creados a partir de las células que pueden usarse para producir una fitasa variante según la invención.
- 10 En algunas realizaciones, las células huésped son células fúngicas y preferiblemente células huésped de hongos filamentosos. El término "hongos filamentosos" se refiere a todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycotina (véase, Alexopoulos, C. J. (1962), *INTRODUCTORY MYCOLOGY*, Wiley, Nueva York). Estos hongos se caracterizan por un micelio vegetativo con una pared celular compuesta por quitina, celulosa y otros polisacáridos complejos. Los hongos filamentosos de la presente invención son morfológica, fisiológica y genéticamente distintos de las levaduras. La célula original de hongo filamentoso puede ser una célula que incluye, pero sin limitarse a,
- 15 *Trichoderma* sp., (por ejemplo, *Trichoderma reesei*, el morfo asexual de *Hipocrea jecorina*, clasificado previamente como *T. longibrachiatum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum*); *Penicillium* sp., *Humicola* sp. (por ejemplo, *H. insolens*, *H. lanuginosa* y *H. grisea*); *Chrysosporium* sp. (por ejemplo, *C. lucknowense*), *Gliocladium* sp., *Aspergillus* sp. (por ejemplo, *A. oryzae*, *A. niger*, *A. sojae*, *A. japonicus*, *A. nidulans* y *A. awamori*), *Fusarium* sp., (por ejemplo *F. roseum*, *F. graminum*, *F. cerealis*, *F. oxisporum* y *F. venenatum*), *Neurospora* sp., (*N. crassa*), *Hipocrea* sp., *Mucor* sp., (*M. miehei*), *Rhizopus* sp. y *Emericella* sp. (Véase también, Innis *et al.*, (1985) *Sci.* 228:21 -26). Cepas de *Aspergillus* útiles para la expresión de las fitasas (y/o alfa amilasas) de la invención se dan a conocer en, por ejemplo, Ward *et al.* (1993) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:738-743 y Goedegebuur *et al.*, (2002) *Curr Gene* 41:89-98. En algunas realizaciones, el huésped es una cepa de *Trichoderma*,
- 20 y particularmente una cepa de *T. reesei*. Se conocen cepas de *T. reesei* y los ejemplos no limitativos incluyen por ejemplo, ATCC n.º 13631, ATCC n.º 26921, ATCC n.º 56764, ATCC n.º 56765, ATCC n.º 56767 y NRRL 15709. En algunas realizaciones, la cepa huésped es un derivado de RL-P37. RL-P37 se da a conocer en Sheir-Neiss *et al.* (1984) *Appl. Microbiol. Biotechnology* 20:46-53.

- 30 En algunas realizaciones, las células huésped serán células bacterianas Gram positivas. Los ejemplos no limitativos incluyen cepas de *Streptomyces*, (por ejemplo, *S. lividans*, *S. coelicolor* y *S. griseus*) y *Bacillus*. Tal como se usa en el presente documento, "el género *Bacillus*" incluye todas las especies dentro del género "*Bacillus*", tal como conocen los expertos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amiloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus* y *B. thuringiensis*.

En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula bacteriana Gram negativa, tal como *E. coli* o *Pseudomonas* sp.

- 40 En otras realizaciones, las células huésped pueden ser células de levadura tales como *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* sp, *Pichia* sp. o *Candida* sp.

- En algunas realizaciones, la cepa huésped puede haberse manipulado previamente a través de ingeniería genética. En algunas realizaciones, se habrán inactivado diversos genes nativos de las células huésped fúngicas. Estos genes
- 45 incluyen, por ejemplo genes que codifican para enzimas celulolíticas, tales como endoglucanasas (EG) y exocelobiohidrolasas (CBH) (por ejemplo *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2* y *egl3*). Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.650.322 da a conocer cepas derivadas de RL-P37 que tienen delecciones en el gen *cbh1* y el gen *cbh2*. (Véanse, por ejemplo, los documentos USP 5.847.276 y WO 05/001036).

- 50 En otras realizaciones, la célula huésped puede ser una célula vegetal y la invención puede aplicarse tanto a plantas dicotiledóneas (por ejemplo, tomate, patata, soja, algodón y tabaco) como a plantas monocotiledóneas, incluyendo, pero sin limitarse a monocotiledóneas gramíneas tales 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.).

Vectores

- Se conocen bien en la técnica vectores útiles incluyendo constructos de ADN que comprenden un polinucleótido que codifica para una fitasa de la invención y métodos de transformación de células huésped y pueden usarse
- 60 metodología y técnicas convencionales.

- Según la invención, se construye un constructo de ADN que comprende ácido nucleico que codifica para una fitasa variante englobada por la invención para transferir y/o expresar la variante en una célula huésped. En una
- 65 realización, el constructo de ADN se transfiere a una célula huésped mediante un vector de expresión que comprende secuencias reguladoras (por ejemplo promotores, sitios de unión a ribosomas, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción, potenciadores, secuencias

activadoras, secuencias de expresión específicas de célula, secuencias señal y/o terminadores) operativamente unidas a la secuencia que codifica para la fitasa variante.

Un vector de expresión que comprende un constructo de ADN con un polinucleótido que codifica para la fitasa variante puede ser cualquier vector que pueda replicarse de manera autónoma en un organismo huésped fúngico dado o integrarse en el ADN del huésped. En algunas realizaciones, el vector de expresión es un plásmido o un bacteriófago. En algunas realizaciones, el vector de expresión se ensambla previamente y contiene secuencias requeridas para la transcripción de alto nivel y un marcador seleccionable. En algunas realizaciones, la región codificante para el gen de fitasa variante o parte del mismo se inserta en este vector de expresión de uso general de manera que esté bajo el control transcripcional de las secuencias de promotor y terminador del constructo de expresión. En algunas realizaciones, se insertan genes o parte de los mismos en el sentido de 3' del promotor fuerte *cbh1*.

En resumen, con respecto a la producción de una fitasa en células huésped fúngicas se hace referencia a Sambrook *et al.*, (1989) citado anteriormente, Ausubel (1987) citado anteriormente, van den Hondel *et al.* (1991) en Bennett y Lasure (Eds.) MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press (1991) págs. 70-76 y 396-428; Nunberg *et al.*, (1984) Mol. Cell Biol. 4:2306-2315; Boel *et al.*, (1984) EMBO J. 3:1581-1585; Finkelstein en BIOTECHNOLOGY OF FILAMENTOUS FUNGI, Finkelstein *et al.* Eds. Butterworth-Heinemann, Boston, MA (1992), cap. 6; Kinghorn *et al.* (1992) APPLIED MOLECULAR GENETICS OF FILAMENTOUS FUNGI, Blackie Academic and Professional, Chapman y Hall, Londres; Kelley *et al.*, (1985) EMBO J. 4:475-479; Penttilä *et al.*, (1987) Gene 61:155-164; y patente estadounidense n.º 5.874.276. Puede encontrarse una lista de vectores adecuados en el Fungal Genetics Stock Center Catalogue of Strains (FGSC, www.fgsc.net). Los vectores adecuados incluyen los obtenidos de por ejemplo Invitrogen Life Technologies and Promega. Los vectores específicos adecuados para su uso en células huésped fúngicas incluyen vectores tales como pFB6, pBR322, pUC18, pUC100, pDONTM201, pDONRTM221, pENTRTM, pGEM[®]3Z y pGEM[®]4Z.

En algunas realizaciones, el vector puede ser cualquier vector que, cuando se introduce en una célula huésped fúngica, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica. Algunos ejemplos no limitativos de tales vectores se proporcionan en el Fungal Genetics Stock Center Catalogue of Strains (FGSC, <www.fgsc.net>). Se proporcionan ejemplos adicionales de vectores de expresión y/o integración adecuados en Sambrook *et al.*, (1989) citado anteriormente, Ausubel (1987) citado anteriormente, van den Hondel *et al.* (1991) en Bennett y Lasure (Eds.) MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press págs. 396-428 y patente estadounidense n.º 5.874.276. Los vectores particularmente útiles incluyen pTREX, pFB6, pBR322, pUC 18, pUC 100 y pENTR/D. Los plásmidos adecuados para su uso en células bacterianas incluyen pBR322 y pUC 19 que permiten la replicación en *E. coli* y pE 194 por ejemplo que permite la replicación en *Bacillus*.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican para fitasa variante englobada por la invención se unen operativamente a un promotor adecuado, que muestra actividad transcripcional en la célula huésped. En general, la expresión de la fitasa variante se logra bajo cualquier promotor adecuado conocido o descubierto posteriormente en la técnica. En algunas realizaciones, la fitasa variante se expresa bajo un promotor nativo para el huésped. En algunas realizaciones, la variante de fitasa se expresa bajo un promotor heterólogo que es activo en la célula huésped. Por ejemplo, si se usa una célula de *Trichoderma* como célula huésped, preferiblemente, el promotor es activo en una célula huésped de *Trichoderma*.

En algunas realizaciones, el promotor es un promotor constitutivo o inducible. Un "promotor constitutivo" es un promotor que es activo en la mayoría de las condiciones medioambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" o "reprimible" es un promotor que es activo en regulación medioambiental o de desarrollo. En algunas realizaciones, los promotores son inducibles o reprimibles debido a cambios en factores medioambientales incluyendo pero sin limitarse a, disponibilidad de carbono, nitrógeno u otro nutriente, temperatura, pH, osmolaridad, la presencia de metal(es) pesado(s), la concentración de inhibidor(es), estrés o una combinación de los anteriores, tal como se conoce en la técnica. En algunas realizaciones, los promotores inducibles o reprimibles son inducibles o reprimibles por factores metabólicos, tales como el nivel de determinadas fuentes de carbono, el nivel de determinadas fuentes de energía, el nivel de determinados catabolitos, o una combinación de los anteriores tal como se conoce en la técnica. En una realización, el promotor es uno que es nativo para la célula huésped. Por ejemplo, cuando *T. reesei* es el huésped, el promotor es un promotor de *T. reesei* nativo tal como el promotor *cbh1* que está depositado en GenBank con el número de registro D86235.

Los ejemplos no limitativos adecuados de promotores incluyen *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2*, *egl3*, *egl4*, *egl5*, *xyn1* y *xyn2*, promotor del gen de la fosfatasa ácida (*phoA*) reprimible de *P. chrysogenus* (véase por ejemplo, Graessle *et al.*, (1997) Appl. Environ. Microbiol., 63:753-756), promotor de PCK1 reprimible por glucosa (véase por ejemplo, Leuker *et al.*, (1997), Gene, 192:235-240), promotor de MET2 inducible por maltosa, reprimible por glucosa (véase Liu *et al.*, (2006), Eukary. Cell, 5:638-649), promotor de pKi y promotor de *cpc1*. Otros ejemplos de promotores útiles incluyen promotores de genes de glucoamilasa de *A. awamori* y *A. niger* (véase por ejemplo, Nunberg *et al.*, (1984) Mol. Cell Biol. 4:2306-2315 y Boel *et al.*, (1984) EMBO J. 3:1581-1585). Además, pueden ser útiles los promotores del gen *xln1* de *T. reesei* (véase por ejemplo, el documento EPA 137280A1).

En algunas realizaciones, el promotor es un promotor sensible a la temperatura. Preferiblemente, la actividad del promotor sensible a temperatura se reprime por temperatura elevada. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor reprimido por catabolito o un promotor reprimido por cambios en la osmolaridad. En algunas realizaciones, el promotor es inducible o reprimible por los niveles de polisacáridos, disacáridos o monosacáridos presentes en el medio de cultivo.

En algunas realizaciones, la secuencia que codifica para la fitasa variante está operativamente unida a una secuencia señal. La secuencia señal no es crítica para la invención, sino que puede ser cualquier secuencia señal que sea activa como secuencia señal en la célula huésped. El ADN que codifica para la secuencia señal puede ser el que se asocia de manera natural con la célula huésped, promotor o fitasa. En algunas realizaciones, la secuencia señal se asocia de manera natural con el gen de la fitasa variante que va a expresarse. En realizaciones adicionales, una secuencia señal y una secuencia de promotor que comprende un constructo de ADN o vector que va a introducirse en una célula huésped fúngica se derivan de la misma fuente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la secuencia señal es la secuencia señal de *cbh1* que está operativamente unida a un promotor *cbh1*.

En algunas realizaciones, el vector de expresión también incluye una secuencia de terminación de la transcripción en el sentido de 3' del gen estructural para proporcionar una terminación eficaz. En algunas realizaciones, la secuencia de terminación y la secuencia de promotor se derivan de la misma fuente. En otras realizaciones, la secuencia de terminación es homóloga para la célula huésped. Una secuencia terminadora particularmente adecuada es *cbh1* derivada de una cepa de *Trichoderma* y particularmente *T. reesei*. Otros terminadores fúngicos útiles incluyen el terminador del gen de glucoamilasa de *A. niger* o *A. awamori* (véase por ejemplo, Nunberg *et al.* (1984) citado anteriormente, y Boel *et al.*, (1984) citado anteriormente).

En algunas realizaciones, un vector de expresión incluye un marcador seleccionable. Los ejemplos de marcadores seleccionables preferidos incluyen los que confieren resistencia antimicrobiana (por ejemplo, higromicina y bleomicina). Los marcadores selectivos nutricionales también encuentran uso en la presente invención incluyendo aquellos marcadores conocidos en la técnica como *amdS*, *argB* y *pyr4*. Se conocen en la técnica marcadores útiles en los sistemas de vectores para la transformación de *Trichoderma* (véase, por ejemplo, Finkelstein, capítulo 6 en BIOTECHNOLOGY OF FILAMENTOUS FUNGI, Finkelstein *et al.* Eds. Butterworth-Heinemann, Boston, MA (1992), capítulo 6.; y Kinghorn *et al.* (1992) APPLIED MOLECULAR GENETICS OF FILAMENTOUS FUNGI, Blackie Academic and Professional, Chapman y Hall, Londres). En algunas realizaciones, el marcador selectivo es el gen *amdS*, que codifica para la enzima acetamidasa, que permite que las células transformadas crezcan sobre acetamida como fuente de nitrógeno. El uso de un gen *amdS* de *A. nidulans* como marcador selectivo se describe en, por ejemplo, Kelley *et al.*, (1985) EMBO J. 4:475-479 y Penttilä *et al.*, (1987) Gene 61:155-164.

Los métodos usados para ligar el constructo de ADN que comprende un polinucleótido que codifica para la variante de fitasa, un promotor, un terminador y otras secuencias y para insertarlas en un vector adecuado se conocen bien en la técnica: La unión se logra generalmente mediante ligamiento en cualquier sitio de restricción conveniente. Si tales sitios no existen, se usan ligadores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional. (Véanse, por ejemplo, Sambrook (1989) citado anteriormente, y Bennett y Lasure, MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press, San Diego (1991) págs. 70-76.). Adicionalmente, pueden construirse vectores usando técnicas de recombinación conocidas (por ejemplo, Invitrogen Life Technologies, Gateway Technology).

Transformación, expresión y cultivo de células huésped

La introducción de un vector o constructo de ADN en una célula huésped incluye técnicas tales como transformación; electroporación; microinyección nuclear; transducción; transfección, (por ejemplo, transfección mediada por lipofección y mediada por DEAE-Dextrina); incubación con precipitado de ADN por fosfato de calcio; bombardeo a alta velocidad con microproyectiles recubiertos con ADN; y fusión de protoplastos.

Se describen métodos de transformación para *Aspergillus* y *Trichoderma* en, por ejemplo, Yelton *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1470-1474; Berka *et al.*, (1991) en Applications of Enzyme Biotechnology, Eds. Kelly y Baldwin, Plenum Press (NY); Cao *et al.*, (2000) Sci. 9:991-1001; Campbell *et al.*, (1989) Curr. Genet. 16:53-56; Penttilä *et al.*, (1987) Gene 61:155-164; de Groot *et al.*, (1998) Nat. Biotechnol. 16:839-842; documento USP 6.022.725; documento USP 6.268.328 y documento EP 238 023. La expresión de proteína heteróloga en *Trichoderma* se describe en los documentos USP 6.022.725; USP 6.268.328; Harkki *et al.* (1991); Enzyme Microb. Technol. 13:227-233; Harkki *et al.*, (1989) Bio Technol. 7:596-603; documentos EP 244.234; EP 215.594; y Nevalainen *et al.*, "The Molecular Biology of *Trichoderma* and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes", en MOLECULAR INDUSTRIAL MYCOLOGY, Eds. Leong and Berka, Marcel Dekker Inc., NY (1992) págs. 129-148). También se hace referencia al documento WO96/00787 y Bajar *et al.*, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2802-28212 para la transformación de cepas de *Fusarium*.

También se conocen métodos para preparar constructos de ADN útiles en la transformación de plantas y métodos para la transformación de plantas. Algunos de estos métodos incluyen transferencia génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens*; bombardeo con microproyectiles, transformación de protoplastos mediada por PEG, electroporación y similares. Se hace referencia a, por ejemplo, los documentos USP 5.780.708; USP 6.803.499;

USP 6.777.589; Fromm *et al* (1990) Biotechnol. 8:833-839; Potrykus *et al* (1985) Mol. Gen. Genet. 199:169-177; Brisson *et al.*, (1984) Nature 310:511-514; Takamatsu *et al.*, (1987) EMBO J 6:307-311; Coruzzi *et al*, (1984) EMBO J 3:1671-1680; Broglie *et al* (1984) Science 224:838-843; Winter J y Sinibaldi RM (1991) Results Probl Cell Differ 17:85-105; Hobbs S o Murry LE (1992) en McGraw Hill Yearbook of Science and Technology, McGraw Hill, Nueva York, N.Y., págs. 191-196; y Weissbach y Weissbach (1988) Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, Nueva York, N.Y., págs. 421-463. Las células transformadas pueden cultivarse usando técnicas convencionales en condiciones adecuadas en cultivo en frascos de agitación, fermentaciones a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, discontinuas y semicontinuas) en fermentadores de laboratorio o industriales, con medio adecuado que contienen nutrientes y sales fisiológicas (véanse, por ejemplo, Pourquie, J. *et al.*, BIOCHEMISTRY AND GENETICS OF CELLULOSE DEGRADATION, eds. Aubert, J. P. *et al.*, Academic Press, págs. 71-86, 1988 e Ilmen, M. *et al.*, (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63:1298-1306). Los medios preparados comercialmente comunes (por ejemplo, caldo de extracto de levadura-malta (YM), caldo Luria Bertani (LB) y caldo dextrosa Sabouraud (SD)) encuentran uso en la presente invención. Se conocen en la técnica condiciones de cultivo preferidas para las células de hongo filamentosas y pueden encontrarse en la bibliografía científica y/o a partir de la fuente de hongos tal como la Colección Americana de Cultivos Tipo y Fungal Genetics Stock Center.

En algunas realizaciones, se construyen transformantes genéticamente estables con sistemas de vectores mediante los cuales el ácido nucleico que codifica para una variante de fitasa se integra de manera estable en el cromosoma de una cepa huésped. Entonces se purifican los transformantes mediante técnicas conocidas.

En un ejemplo no limitativo, se distinguen transformantes estables que incluyen un marcador *amdS* de transformantes inestables por su velocidad de crecimiento más rápida y la formación de colonias circulares con un esquema uniforme, en vez de irregular, en medio de cultivo sólido que contiene acetamida. Adicionalmente, en algunos casos, se realiza una prueba adicional de estabilidad haciendo crecer los transformantes en medio no selectivo sólido (es decir, medio que carece de acetamida), recogiendo esporas de este medio de cultivo y determinando el porcentaje de estas esporas que germinan y crecen posteriormente en medio selectivo que contiene acetamida. Alternativamente, pueden usarse otros métodos conocidos en la técnica para seleccionar transformantes.

En una realización específica, la preparación de *Trichoderma sp.* para la transformación implica la preparación de protoplastos a partir de micelios fúngicos. (Véase, Campbell *et al.*, (1989) Curr. Genet. 16:53-56). En algunas realizaciones, los micelios se obtienen de esporas vegetativas germinadas. Los micelios se tratan con una enzima que digiere la pared celular dando como resultado protoplastos. Los protoplastos se protegen entonces mediante la presencia de un estabilizador osmótico en el medio en suspensión. Estos estabilizadores incluyen sorbitol, manitol, cloruro de potasio, sulfato de magnesio y similares. Habitualmente, la concentración de estos estabilizadores varía entre 0,8 M y 1,2 M. Es preferible usar aproximadamente una disolución 1,2 M de sorbitol en el medio de suspensión.

Una vez establecido el crecimiento fúngico, se exponen las células transformadas a condiciones eficaces para provocar o permitir la expresión de variantes de fitasa tal como se define en el presente documento. En los casos en que la secuencia que codifica para la variante de fitasa está bajo el control de un promotor inducible, el agente de inducción (por ejemplo, un azúcar, sal metálica o agente antimicrobiano) se añade al medio a una concentración eficaz para inducir la expresión.

Ensayos para determinar la expresión/actividad de fitasa

Con el fin de evaluar la expresión de variantes de fitasa que tienen actividad fitasa por una línea celular que se ha transformado con un polinucleótido heterólogo que codifica para una variante de fitasa que tiene actividad fitasa englobada por la invención, pueden llevarse a cabo ensayos al nivel de proteína, al nivel de ARN o mediante el uso de bioensayos funcionales particulares para la actividad y/o producción de fitasa. En general, los ensayos empleados incluyen transferencia de tipo Northern, transferencia puntual (análisis de ADN o ARN), RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada apropiadamente (basándose en la secuencia codificante de ácido nucleico) y transferencia de tipo Southern convencional y autorradiografía.

Además, la producción y/o expresión de una variante de fitasa que tiene actividad fitasa puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo, mediante ensayos que miden directamente la actividad fitasa (FTU) mediante la liberación de fosfato inorgánico. El fosfato inorgánico forma un complejo amarillo con reactivo de vanadato/molibdato ácido y el complejo amarillo se midió a una longitud de onda de 415 nm en un espectrofotómetro y el fosfato inorgánico liberado se cuantificó con una curva patrón de fosfato. Una unidad de fitasa (FTU) es la cantidad de enzima que libera 1 micromol de fosfato inorgánico a partir de fitato por minuto en las condiciones de reacción dadas en la norma europea (CEN/TC 327, 2005-TC327WI 003270XX).

Además, la expresión génica puede evaluarse mediante métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células, cortes de tejido o inmunoensayo de medio de cultivo tisular, por ejemplo, mediante inmunotransferencia de tipo Western o ELISA. Tales inmunoensayos pueden usarse para evaluar cualitativa y

cuantitativamente la expresión de una fitasa. Los detalles de tales métodos los conocen los expertos en la técnica y muchos reactivos para poner en práctica tales métodos están disponibles comercialmente.

Se conocen bien en la técnica ensayos para determinar la actividad fitasa y un ejemplo es el ensayo clásico para la 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 alternativo en FOOD CHEMICALS CODEX, 4ª edición, Committee on Food Chemicals Codex, Institute of Medicine, National Academy Press, Washington, DC, 1996 en las páginas 809-810. En varios de estos ensayos se realiza entonces colorimetría usando un espectrofotómetro y se compara con controles de concentración conocida de fosfato inorgánico (P_i) y/o controles producidos mediante reacciones con enzimas que tienen actividad fitasa conocida. Se determina una unidad de actividad como la cantidad de muestra enzimática requerida para liberar 1 μ mol de P_i por minuto a partir de fitato en condiciones de reacción definidas. También se hace referencia a los documentos USP 6.221.644 y USP 6.139.902.

En algunas realizaciones de la invención, las variantes de fitasa que tienen actividad fitasa expresadas por un huésped de *Trichoderma* o *Aspergillus* será mayor de 1 gramo de proteína por litro (g/l), mayor de 2 g/l, mayor de 5 g/l, mayor de 10 g/l, mayor de 20 g/l, mayor de 25 g/l, mayor de 30 g/l, mayor de 50 g/l y también mayor de 100 g/l de medios de cultivo.

Recuperación de proteínas

Los polipéptidos producidos tras la expresión de las secuencias de ácido nucleico de esta invención pueden recuperarse o aislarse a partir de la fermentación de cultivos celulares y purificarse sustancialmente en una variedad de modos según técnicas bien establecidas en la técnica. Un experto en la técnica puede seleccionar las técnicas de aislamiento y purificación más apropiadas. La fitasa de la invención puede recuperarse del medio de cultivo o de lisados de células huésped. Si está unida a la membrana, puede liberarse de la membrana usando una disolución de detergente adecuado (por ejemplo Triton-X 100) o mediante escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión de fitasa pueden romperse mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica o agentes de lisado celular. Puede desearse purificar la fitasa de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A Sepharose para eliminar contaminantes; y columnas de quelación de metales para unir formas etiquetadas con epítopo de la fitasa. Pueden emplearse diversos métodos de purificación de proteínas y tales métodos se conocen 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(s) etapa(s) de purificación seleccionada(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción usado y de la forma particular de fitasa producida.

En general, una variante de fitasa (incluyendo fitasa de *Buttiauxella-n* o fitasa de *Buttiauxella-r*) producida en cultivo celular se secreta al medio y puede purificarse o aislarse, por ejemplo, eliminando componentes no deseados del medio de cultivo celular. En algunos casos, la variante de fitasa puede producirse en una forma celular que necesita recuperación a partir de un lisado celular. En tales casos, la enzima se purifica de las células en las que se produjo usando técnicas empleadas de manera rutinaria por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de afinidad (véase por ejemplo, Tilbeurgh *et al.*, (1984) *FEBS Lett.* 16:215); métodos cromatográficos de intercambio iónico (véase por ejemplo Goyal *et al.*, (1991) *Biores. Technol.* 36:37; Fliess *et al.*, (1983) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17:314; Bhikhabhai *et al.* (1984) *J. Appl. Biochem.* 6:336; y Ellouz *et al.*, (1987) *Chromatography* 396:307), incluyendo intercambio iónico usando materiales con alto poder de resolución (véase por ejemplo, Medve *et al.*, (1998) *J. Chromatography A* 808:153); cromatografía de interacción hidrofóbica (véase por ejemplo, Tomaz y Queiroz, (1999) *J. Chromatography A* 865:123); reparto en dos fases (véase por ejemplo, Brumbauer, *et al.*, (1999) *Bioseparation* 7:287); precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; y/o filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

Fermentaciones -

En algunas realizaciones de la presente invención, se hacen crecer células fúngicas que expresan variantes de fitasa heterólogas en condiciones de fermentación continua o discontinua. Una fermentación discontinua clásica es un sistema cerrado, en el que la composición del medio se ajusta al comienzo de la fermentación y no se somete a alteraciones artificiales durante la fermentación. Por tanto, al comienzo de la fermentación se inocula el medio con el/los organismo(s) deseado(s). En este método, se permite que se produzca la fermentación sin la adición de ningún componente al sistema. Normalmente, una fermentación discontinua se califica como "discontinua" con respecto a la adición de la fuente de carbono y a menudo se realizan intentos de controlar factores tales como el pH y la concentración de oxígeno. Las composiciones de biomasa y metabolitos del sistema discontinuo cambian constantemente hasta el momento en el que se detiene la fermentación. Dentro de los cultivos discontinuos, las

células progresan a través de una fase de latencia estática hasta una fase logarítmica de alto crecimiento y finalmente hasta una fase estacionaria en la que la velocidad de crecimiento disminuye o se detiene. Si no se tratan, las células en la fase estacionaria mueren finalmente. En general, las células en la fase de latencia son responsables del volumen de producción de producto final.

Una variación del sistema discontinuo convencional es el sistema de “fermentación semicontinua”, que también encuentra uso con la presente invención. En esta variación de un sistema discontinuo típico, el sustrato se añade en incrementos a medida que progresa la fermentación. Los sistemas semicontinuos son útiles cuando la represión por catabolitos puede inhibir el metabolismo de las células y cuando es deseable tener cantidades limitadas de sustrato en el medio. La medición de la concentración de sustrato real en sistemas semicontinuos es difícil y se estima por tanto basándose en los cambios de factores medibles tales como pH, oxígeno disuelto y la presión parcial de gases de desecho tales como CO₂. Las fermentaciones discontinuas y semicontinuas son comunes y se conocen bien en la técnica.

La fermentación continua es un sistema abierto en el que se añade de manera continua un medio de fermentación definido a un biorreactor y se retira una cantidad igual de medio condicionado simultáneamente para el procesamiento. La fermentación continua mantiene generalmente los cultivos a una densidad alta constante en la que las células están principalmente en crecimiento en fase logarítmica.

La fermentación continua permite la modulación de un factor o cualquier número de factores que afectan al crecimiento celular y/o la concentración de producto final. Por ejemplo, en una realización, un nutriente limitante tal como la fuente de carbono o la fuente de nitrógeno se mantiene a una tasa fijada y se permite que todos los demás parámetros se moderen. En otros sistemas, varios factores que afectan al crecimiento pueden alterarse de manera continua mientras que la concentración de células, medida mediante la turbidez del medio, se mantiene constante. Los sistemas continuos tratan de mantener condiciones de crecimiento en estado estacionario. Por tanto, la pérdida de células debido al medio que está extrayéndose debe equilibrarse con la velocidad de crecimiento celular en la fermentación. Se conocen bien en la técnica de microbiología industrial métodos de modulación de nutrientes y factores de crecimiento para procedimientos de fermentación continua así como técnicas para maximizar la velocidad de formación de producto.

Aplicaciones y métodos de uso

En una realización de la invención, se proporciona una composición enzimática que comprende al menos una fitasa según la invención. Pueden prepararse composiciones según la invención según métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de un líquido o una composición seca.

Las composiciones líquidas no necesitan contener nada más que la enzima fitasa, que puede estar en una forma o bien no purificada o bien sustancialmente purificada, preferiblemente en una forma sustancialmente purificada. Sin embargo, habitualmente también se añade un estabilizador tal como glicerol, sorbitol o monopropilenglicol. La composición líquida también puede comprender uno o más otros aditivos, tales como sales, azúcares, conservantes, agentes de ajuste del pH (es decir, agentes de tamponamiento), proteínas o fitato (un sustrato de fitasa). Composiciones líquidas típicas son suspensiones acuosas o a base de aceite.

Las composiciones secas pueden ser composiciones secadas por pulverización, en cuyo caso la composición no necesita contener nada más que la enzima en una forma seca. Sin embargo, habitualmente las composiciones secas son los denominados granulados que pueden mezclarse fácilmente con por ejemplo componentes de alimentos o alimentos para animales, o más preferiblemente, forman un componente de una premezcla. El tamaño de partícula de los granulados enzimáticos preferiblemente es compatible con el de otros componentes de la mezcla.

En algunas realizaciones, una composición enzimática que incluye una fitasa variante englobada por la invención se usará opcionalmente en combinación con una cualquiera o una combinación de las siguientes enzimas - glucoamilasas, alfa amilasas, proteasas, pululanastas, isoamilasas, celulasas, hemicelulasas, xilanasas, ciclodextrina glicosiltransferasas, lipasas, fitasas, lacasas, oxidasas, esterases, cutinasas, otras fitasas y combinaciones de las mismas.

En algunas realizaciones, la composición de fitasa es una composición de alimento o pienso. Una composición de alimento o pienso puede comprender una fitasa a una concentración de 10 a 15.000 U/kg de alimento para animales o alimento (por ejemplo de 100 a 5.000 U/kg, 200 - 2.000 U/kg y también 500 - 1000 U/kg). La composición de fitasa puede usarse como aditivo que es activo en el tracto digestivo, de ganado, tal como aves de corral y cerdos, y animales de granjas acuáticas incluyendo peces y gambas. La presente invención contempla un método para la producción de un alimento o pienso, caracterizado porque se mezcla una fitasa según la invención con dicho alimento o pienso. Las composiciones líquidas pueden añadirse a un alimento o alimento para animales tras una preparación de gránulos opcional de las mismas.

En algunas realizaciones, el pienso comprenderá uno o más de los siguientes componentes: a) cereales, tales como cereales pequeños (por ejemplo, trigo, cebada, centeno, avenas y combinaciones de los mismos) y/o cereales

grandes tales como maíz o sorgo; b) subproductos de cereales, tales como harina de gluten de maíz, granos secos de destilería con solubles (*Distillers Dried Grain Solubles*, DDGS), salvado de trigo, harinillas de trigo, granzas de trigo, salvado de arroz, cascarillas de arroz, cascarillas de avena, palmiste y pulpa de cítricos; c) proteína obtenida de fuentes tales soja, girasol, cacahuete, altramuza, guisantes, habichuelas, algodón, colza, harina de pescado, proteína plasmática secada, harina de carne y huesos, proteína de patata, suero lácteo, copra, sésamo; d) aceites y grasas obtenidos de fuentes vegetales y animales; e) minerales y vitaminas; f) complementos, tales como enzimas, betaína, aromas, aceites esenciales, promotores del crecimiento antibióticos, coccidiostáticos, probióticos y prebióticos.

También se proporciona un método para la reducción de los niveles de fósforo en estiércol animal, caracterizado porque se alimenta un animal con pienso según la invención en una cantidad eficaz para convertir el fitato contenido en dicho pienso.

Además, las composiciones de fitasa englobadas por la invención pueden usarse en un método de hidrólisis de almidón. La composición de fitasa puede añadirse durante una etapa de licuefacción de almidón, una etapa de sacarificación y/o durante una etapa de fermentación. Se usan alfa-amilasas para descomponer los enlaces 1 - 4 del almidón durante procedimientos de hidrólisis de almidón industriales usando material vegetal reducido tal como cereales molidos como materia prima (por ejemplo en preparación por infusión y cocción). Se requieren amilasas para descomponer almidón y la obtención de una actividad adecuada de estas enzimas es algunas veces problemática. Se sabe desde hace algún tiempo que el fitato tiene un efecto inhibitorio sobre las amilasas. Por tanto, pueden usarse composiciones enzimáticas que comprenden una fitasa según la invención en un procedimiento de hidrólisis de almidón para reducir el efecto inhibitorio del fitato sobre alfa amilasa (documento EP 0 813607B).

Fitases, fitato y derivados de fitato de fosfato inferiores encuentran muchos otros usos en productos de cuidado personal, productos médicos y productos nutricionales y alimenticios, así como diversas aplicaciones industriales, particularmente en las técnicas de limpieza, textiles, litográficas y químicas.

Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

PARTE EXPERIMENTAL

Abreviaturas -

En la descripción y sección experimental que sigue, se aplican las siguientes abreviaturas: °C (grados centígrados); rpm (revoluciones por minuto); H₂O (agua); dH₂O (agua desionizada); dH₂O (agua desionizada, filtración Milli-Q); aa o AA (aminoácido); pb (par de bases); kb (par de kilobases); kD (kilodaltons); g o gm (gramos); µg (microgramos); mg (miligramos); µl (microlitros); ml y mL (mililitros); mm (milímetros); µm (micrómetro); M (molar); mM (milimolar); µM (micromolar); U (unidades); V (voltios); PM (peso molecular); seg(s) o s(s) (segundo/segundos); min(s) o m(s) (minuto/minutos); hr(s) o h(s) (hora/horas); disolución de AMM (H₂SO₄ 7,5 N, molibdato de amonio 15 mM y acetona (1:1:2)); ABS (absorbancia); EtOH (etanol); PPS (disolución salina fisiológica; m/v (masa/volumen); y MTP (placa de microtitulación).

Se usan los siguientes ensayos y métodos en los ejemplos proporcionados a continuación:

Se describen a continuación los métodos usados para proporcionar variantes. Sin embargo, debe indicarse que pueden usarse métodos diferentes para proporcionar variantes de una molécula original y la invención no se limita a los métodos usados en los ejemplos. Se pretende que pueda usarse cualquier medio adecuado para preparar variantes y la selección de variantes.

Se depositó la *Buttiauxella* sp cepa P1-29 en NCIMB con el n.º de registro: 41248. El aislamiento de esta cepa a partir de material vegetal y la identificación taxonómica se describen en el documento WO 2006/043178 (véanse los ejemplos 1 - 4). Además, también se describen la clonación de ADN cromosómico, la amplificación y la expresión del gen de fitasa de *Buttiauxella* sp. cepa P1-29 en *E. coli* (véanse los ejemplos 5 - 6). La fitasa de *Buttiauxella* sp. cepa P1-29 descrita en el documento WO 2006/043178 también se denomina en el presente documento BP-WT y se hace referencia a SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 en el presente documento.

Ensayo de la actividad enzimática de fitasa -

Se llevaron a cabo estos ensayos en 2 sistemas de tampón. Para pH de 4,0 a 5,5 se usaron tampones acetato de sodio. Éstos se prepararon valorando acetato de sodio 250 mM con HCl hasta el valor de pH indicado. Se prepararon los tampones para pH de 2,0 a 3,5 mediante valoración de glicina 250 mM con HCl hasta el valor de pH indicado. Se usó el ensayo a pH 4,0 como patrón. Además de tampón, la mezcla de reacción contenía fitato 6 mM y CaCl₂ 1,0 mM y BSA 0,05 mg/ml. Se permitió que avanzaran las reacciones durante 1 h a 37°C. Se midió la liberación de fosfato usando un ensayo de molibdato, tal como se da a conocer en Heinonen *et al.* (Heinonen, J.K., Lahti, R.J., Anal Biochem. 113(2), 313-317 1981)). En resumen, se añadieron 200 µl de una disolución de AMM

recién preparada a 100 µl de mezcla de reacción en cada pocillo de la placa de microtitulación. Se midió la absorbancia a 390 nm no antes de 10 min y no después de 30 min tras la adición del reactivo AMM. Se determinó la cantidad de fosfato construyendo una curva de calibración con una disolución de fosfato de concentraciones conocidas. Se calcularon los valores de absorción específica (A280) de variantes de fitasa basándose en la

Ensayo de la actividad específica -

Se determinó la actividad fitasa en placas de microtitulación usando un ensayo enzimático acoplado: Se diluyeron preparaciones enzimáticas en tampón de dilución (acetato de sodio 50 mM, Pluronic F-68 al 0,05%, BSA 1 mg/ml). A 5 µl de la disolución enzimática se le añadieron 75 µl de la mezcla de ensayo de fitasa (Glicina/HCl 500 mM, pH 4,0, fitato 10,67 mM, CaCl₂ 1 mM, Pluronic F-68 al 0,05% (p/v)). Se incubó el ensayo 1 h a 37°C. Entonces se mezclaron 10 µl del ensayo con 40 µl de la mezcla de ensayo de detección (Tris/HCl 1 M, pH 7,0, Triton X-100 al 0,01% (v/v), ADHP 25 µM (MoBiTec, Göttingen, Alemania), maltosafosforilasa 0,25 u/ml, maltosa 0,3125 mM, glucosa oxidasa 1,5625 u/ml, peroxidasa del rábano 0,3125 u/ml, EDTA 1 mM, BSA 0,35 mg/ml) y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se detuvo la reacción mediante la adición de 30 µl de catalasa 2700 u/ml en H₂O. Entonces se midió la fluorescencia a 595 nm, usando 535 nm como longitud de onda de excitación. Se determinó la cantidad de fosfato usando una curva de calibración con disoluciones de fosfato de concentraciones conocidas.

Se realizó la determinación de proteína mediante la medición de la absorción a A280 nm. Se calcularon los valores de absorción específica (A280) de variantes de fitasa basándose en las composiciones de aminoácidos de la proteína usando el método de Gill y von Hippel (Anal. Biochem. 182:319-326(1989)).

Termoestabilidad -

Se caracterizó la termoestabilidad de las variantes mediante la temperatura de inactivación de la enzima. Se determinó la temperatura de inactivación midiendo la actividad residual de la enzima fitasa tras la incubación durante 10 min a diferentes temperaturas y el posterior enfriamiento hasta temperatura ambiente. La temperatura de inactivación es la temperatura a la que la actividad residual es del 50% en comparación con la actividad residual tras la incubación durante la misma duración en las mismas condiciones a temperatura ambiente. Con el fin de determinar la temperatura correspondiente a una actividad residual del 50%, se calcularon interpolaciones y extrapolaciones a partir de los datos de actividad medidos, cuando era apropiado. Se calcularon las diferencias de termoestabilidad en °C restando las temperaturas de inactivación de dos enzimas una de la otra.

Purificación de los mutantes BP-11 -

Se realizó la purificación cultivando *Bacillus subtilis*, transformado con un plásmido que codifica para BP-11, en frascos de agitación a 37°C y 160 rpm usando medio LB convencional con adición de neomicina 20 mg/l. En esta fase, el medio de cultivo acumulaba una cantidad significativa de actividad fitasa. Se ajustaron aproximadamente 2 L del caldo de cultivo a pH 8,0, se filtraron y se aplicaron a una columna empaquetada con 10 ml de resina de Ni-NTA Sepharose (Qiagen). Se lavó la columna con tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0 hasta que la DO280 cayó por debajo de 0,05. Posteriormente, se eluyó la fitasa unida con el mismo tampón que contenía clorhidrato de imidazol 250 mM. Se dializó el eluato frente a tampón acetato de sodio 50 mM pH 5,0 y se almacenó a 4°C. Entonces se aplicó la disolución enzimática a una columna Resource S equilibrada con tampón acetato de sodio 20 mM pH 5,0 y se realizó la elución usando un gradiente de sal de NaCl 0 - 1 M a lo largo de 10 volúmenes de columna. Opcionalmente, se dializó el eluato frente a tampón acetato de sodio 20 mM pH 5,0 antes de almacenar a 4°C.

Estabilidad en pepsina -

Se caracterizó la estabilidad en pepsina de tales variantes mediante las actividades residuales medidas a pH 3,5, 37°C tras la incubación en pepsina en comparación con condiciones control (actividad residual = actividad tras la incubación en pepsina / actividad tras la incubación en condiciones control). Se realizó la incubación en pepsina durante 2 horas a pH 2,0, pepsina 0,25 mg/ml, CaCl₂ 1 mM y BSA 5 mg/ml a 37°C. Las condiciones control eran 2 horas a pH 5,0, CaCl₂ 1 mM y BSA 5 mg/ml a 37°C.

En los ejemplos que siguen, se numeran los residuos de aminoácido en la secuencia de variantes de fitasa según la secuencia de la BP-WT (SEQ ID NO: 1) a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1. Generación y caracterización de variantes de fitasa.

En general, se construyeron variantes de fitasa mediante mutagénesis de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5 usando métodos de mutagénesis tales como los métodos dados a conocer en Morinaga *et al* (Biotechnology (1984) 2, págs. 646-649); en Nelson y Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, págs. 147-151); o el protocolo de mutagénesis de umbral de error descrito en el documento WO 92/18645. Otro método adecuado para PCR

mutagénica se da a conocer por Cadwell y Joyce (PCR Methods Appl. 3(1994), 136-140).

Se caracterizaron variantes enzimáticas de fitasa tras expresión heteróloga en uno o más de los siguientes huéspedes de expresión: *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*. Se derivaron variantes de fitasa que diferían en una o más posiciones de aminoácido con respecto a SEQ ID NO: 1, incluyendo dos posiciones, tres posiciones, cuatro posiciones, cinco posiciones, seis posiciones, siete posiciones, ocho posiciones, nueve posiciones, diez posiciones, once posiciones, doce posiciones. Cuando era apropiado, se realizaron rondas iterativas de mutagénesis. Siguiendo los protocolos descritos en el documento WO 2006/043178, se realizaron diversas mutaciones en la BP-WT. En particular, se observó un mutante, A122T/D125A/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K denominado BP-11 que tenía termoestabilidad aumentada con respecto a BP-WT (véanse los residuos de aminoácido 7-419 de SEQ ID NO: 4 que corresponde a SEQ ID NO: 6).

Ejemplo 2. Variantes de BP-11.

Se usaron tres estrategias diferentes para obtener variantes de BP-11 que incluían mutagénesis al azar, mutagénesis dirigida y mutagénesis de saturación de sitio.

A. Se realizaron mutagénesis al azar y selección de alto rendimiento según las enseñanzas descritas en el documento WO 2006/043078 para obtener mutantes de BP-WT, tales como BP-11.

Una variante específica de BP-11 obtenida mediante este método se designó BP-19. BP-19 difiere de BP-11 por una sustitución en la posición 54 (Y54H), 84 (S84G), 190 (S190G), 220 (I220V) y 289 (N289D) correspondientes a SEQ ID NO: 4.

Usando el ensayo tal como se describió anteriormente para medir la actividad específica, se determinó que BP-19 tiene una actividad específica a pH 4,0 que era superior en un 26% superior a BP-11 y se hace referencia a la tabla 3.

B. Se realizó mutagénesis dirigida de tres residuos específicos en la estructura principal de BP-WT y la estructura principal de BP-11 que corresponde a las posiciones G221S, T225M y N276R de SEQ ID NO: 4. Se obtuvo el mutante BP-15 a partir de la estructura principal de BP-WT y se obtuvo el mutante BP-16 a partir de la estructura principal de BP-11. Se describe la actividad específica en relación con las fitasas originales en la tabla 3.

C. Se realizaron bibliotecas de mutagénesis de saturación de sitio basándose en la molécula BP-11 variante en diversas posiciones. Las posiciones incluían R24, R28, T31, K32, D98, R100, K137, N212, G221, T225, E228, H259, F263, M266, N276, H312, D313, T314 y D334 de SEQ ID NO: 4. Se examinaron inicialmente las bibliotecas para detectar actividad mejorada en un examen de alto rendimiento y entonces se examinaron algunas variantes para determinar la actividad específica tal como se describió anteriormente. Se purificó adicionalmente la variante seleccionada hasta aproximadamente un 97% de pureza y se analizó para determinar la actividad específica. Dos variantes en la posición D98 proporcionaron una actividad específica mejorada (D98A y D98Q). Se aisló el mutante que tenía Ala (A) en lugar de Asp (D) (D98A) y se designó como BP-17 (véase, SEQ ID NO: 3). Se aisló el mutante que tenía Gln (Q) en lugar de Asp (D) (D98Q) y se designó como BP-20.

Se sometieron a prueba todas las variantes de BP-11, que incluyen BP-16, BP-17, BP-18, BP-19 y BP-20, tal como se describió anteriormente para determinar la actividad fitasa.

TABLA 3

Actividad específica (U/mg, pH 4,0, pureza de la enzima del 97%)			
VARIANTE	Actividad específica (U/mg)	Actividad específica (% de la actividad de BP-WT)	Actividad específica (% de la actividad de BP-11)
BP-WT (P1-29)	936	100	142
BP-11	632	70	100
BP-15	790	85	121
BP-16	760	74	106
BP-17	1017	109	156
BP-18	1005	107	153
BP-19	822	88	126
BP-20	840	93	133

Ejemplo 3 - Expresión de BP-17 en *E. coli*

Se modificó la secuencia de ADN del mutante BP-17 para la expresión en *E. coli* incluyendo secuencias de ADN que codifican para la secuencia señal de la fitasa de *Buttiauxella* de tipo natural seguida por una "etiqueta de 6xHis" y la

secuencia codificante correspondiente al mutante de fitasa de *Buttiauxella* madura BP17. Usando métodos de ingeniería genética convencionales, se insertó esta secuencia de nucleótidos entre el promotor del gen *dps* de *E. coli* y el terminador de la transcripción del gen *tufA*, también derivado de *E. coli*.

- 5 Se insertó el casete de expresión entre los sitios de restricción *SacI* y *Apal* del vector de *E. coli* pCR 2.1. (Invitrogen) dando como resultado el plásmido pCDP(SHOK). Se ilustra la estructura del vector de expresión pCDP(SHOK) mediante la figura 2.

- 10 Se cultivó la cepa de *E. coli* XL-Blue MRF' transformada con pCDP(SHOK) en frascos de agitación a 37°C y 200 rpm usando medio LB convencional con adición de 50 mg/l de kanamicina. En esta fase, el medio de cultivo acumulaba una cantidad significativa de actividad fitasa que no podía detectarse en la cepa receptora transformada con pCR2.1 y cultivada en el mismo medio. Se ajustaron aproximadamente 2 l de este caldo de cultivo a pH 8,0 y se aplicaron a una columna empaquetada con 25 ml de Ni-NTA agarosa (Invitrogen). Se lavó la columna con tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 hasta que la DO_{280} cayó por debajo de 0,05 seguido por elución de la fitasa unida con el mismo
15 tampón que contenía clorhidrato de imidazol 200 mM. Se dializó el eluato frente a tampón acetato de sodio 20 mM, pH 5,5 y se almacenó o bien a 4°C o bien congelado a -20°C. No se observó pérdida de actividad tras congelación-descongelación repetida.

- 20 Se midieron los perfiles de pH de BP-17 expresado en *E. coli* y fitasa de *Buttiauxella* de tipo natural (BP-WT) tal como sigue. Se usaron disoluciones que contenían acetato de sodio 250 mM y fitato de sodio 7,5 mM ajustadas a pH 6, 5,5, 5, 4,5, 4,25, 4,0, 3,75, 3,5 con ácido clorhídrico para construir perfiles de pH en el intervalo de pH 3,5 a pH 6,0. Se midió la actividad de las enzimas a valores de pH de 3,0 y 2,5 en disoluciones de sustrato que contenían glicina 250 mM y fitasa de sodio 7,5 mM ajustadas al pH indicado con ácido clorhídrico. Se encontró (figura 3) que el perfil de pH del BP-17 producido en *E. coli* se desviaba significativamente del perfil de pH de la fitasa de *Buttiauxella*
25 de tipo natural.

- Se trataron las enzimas (diluidas hasta aproximadamente 30 U/ml) con diferentes concentraciones de pepsina en tampón clorhidrato de glicina 0,25 M, pH 2,0, que contenía BSA 3 mg/ml a 37°C durante 2 horas. Tras la incubación, se sometió a ensayo la actividad restante a pH 5,5. Tal como se muestra en la figura 4, BP-17 es esencialmente estable frente a pepsina. La alta estabilidad en pepsina de BP-17 está en contraposición con la muy baja estabilidad en pepsina de la fitasa de *Buttiauxella* de tipo natural, que se degrada de manera esencialmente completa por 1 µg/ml de pepsina (figura 4).

- 30 En los ejemplos 4-8, se expresaron fitasa de *Buttiauxella* variante y de tipo natural directamente o como proteína de fusión en *Trichoderma reesei*. En todos los casos se observaron niveles de expresión muy fuertes a más de 10 g/l.

Ejemplo 4 - Construcción y expresión de la fitasa de *Buttiauxella* de tipo natural en *T. reesei* como proteína de fusión sin un sitio Kex2

- 40 Se sintetizó ADN que codifica para el marco de lectura abierto de la fitasa de *Buttiauxella* de tipo natural por GENEART AG (BioPark Josef-Engert-Str. 11, D-93053 Regensburg, Alemania). Se incluyeron los sitios de restricción, *SpeI* y *AscI* para fines de clonación (véase la tabla 4, SEQ ID NO: 8). Se insertó el marco de lectura abierto de la fitasa (SEQ ID NO: 8) en el vector, pTrex4, en los sitios *SpeI* y *AscI* (véase la figura 5). Se transformó de manera biolística el constructo resultante en una cepa derivada de *T. reesei*, usando el sistema de suministro de partículas PDS-1000/He biolístico de Bio-Rad (Hercules, CA). El protocolo de transformación usado fue tal como se describió por Foreman (documento WO 2005/001036). Tras obtenerse transformantes estables, se hicieron crecer estos transformantes en cultivos de frasco de agitación para el análisis de la expresión de la proteína fitasa de *Buttiauxella* tal como se explica resumidamente por Foreman (documento WO2005/001036). Tras varios días de crecimiento sobre placas de acetamida MM, se inocularon los transformantes que presentaban morfología estable
50 en frascos de agitación de 250 ml que contenían 30 ml de medio Proflo. El medio Proflo contiene: α -lactosa 30 g/l; $(NH_4)_2SO_4$ 6,5 g/l; KH_2PO_4 2 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,3 g/l; $CaCl_2$ 0,2 g/l; 1000X disolución salina de oligoelementos 1 ml/l; Tween 80 al 10% 2 ml/l; harina de semilla de algodón Proflo 22,5 g/l (Traders Protein, Memphis, TN); y $CaCO_3$ 0,72 g/l. Tras dos días de crecimiento a 28°C y 225 rpm, se transfirió el 10% del cultivo de Proflo a un frasco de agitación de 250 ml que contenía 30 ml de medio definido de lactosa. La composición del medio definido de lactosa era tal como sigue: $(NH_4)_2SO_4$ 5 g/l; tampón PIPPS 33 g/l; casaminoácidos 9 g/l; KH_2PO_4 4,5 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/l; antiespumante Mazu DF60-P 5 ml/l (mazu Chemicals, Gurnee, IL); 1000X disolución salina de oligoelementos 1 ml/l; pH 5,5. Se añadieron 40 ml/l de disolución de lactosa al 40% (p/v) al medio tras la esterilización. Se incubaron los frascos de agitación con medio definido de lactosa a 28°C, 225 rpm durante 2-3 días. Se mezclaron muestras del sobrenadante de cultivo con un volumen apropiado de tampón de muestra 4X NuPAGE (Invitrogen Carlsbad, CA)
55 con agente reductor y se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) usando geles precolados de NuPAGE al 4-12%, y tampón de ejecución MOPS (Invitrogen Carlsbad, CA). Se tiñeron los geles para la detección de proteínas con Simply Blue Stain (Invitrogen Carlsbad, CA). Se observó una banda de proteínas con una masa molecular aparente de aproximadamente 96 kDa sobre el gel teñido. La masa molecular esperada de la proteína de fusión es de aproximadamente 96 kDa. Se encontró que la proteína se expresaba a más de 10 g/l.

65 Tabla 4: Secuencia de ADN de la fitasa de *Buttiauxella* de tipo natural que contiene un sitio *SpeI* en el extremo 5', y

un sitio AscI en el extremo 3'.

ACTAGTAACGACACCCCCGCCAGCGGCTACCAGGTCGAGAAGGTCGTCATCCTCAG
CCGCCACGGAGTCCGCGCCCCACCAAGATGACCCAGACCATGCGCGACGTCACCC
CCAACACCTGGCCCGAGTGGCCCGTCAAGCTCGGCTACATCACCCCCCGCGGCGAG
CACCTCATCAGCCTCATGGGCGGCTTCTACCGCCAGAAGTTCCAGCAGCAGGGGCAT
CCTCAGCCAGGGCTCGTGTCCCAACCCCAACAGCATCTATGTCTGGGCCGACGTCGA
CCAGCGCACCCCTCAAGACCGGCGAGGCCTTCCTCGCCGGCCTCGCCCCCAGTGCG
GCCTCACCATCCACCACCAGCAGAACCTCGAGAAGGCCGACCCCCCTCTTCCACCCC
GTCAAGGCCGGCACCTGCAGCATGGACAAGACCCAGGTCCAGCAGGCCGTCGAGA
AGGAGGCCAGACCCCCATCGACAACCTCAACCAGCACTACATCCCCTTCCTCGCC
CTCATGAACACCACCCTCAACTTCAGCACCAGCGCCTGGTGCCAGAAGCACAGCGC
CGACAAGAGCTGCGACCTCGGCCTCAGCATGCCAGCAAGCTCAGCATCAAGGACA
ACGGCAACAAGGTCGCCCTCGACGGCGCTATCGGCCTCAGCTCCACCCTCGCCGAG
ATCTTCCTCCTCGAGTACGCCCAGGGCATGCCTCAGGCTGCCTGGGGCAACATCCAC
AGCGAGCAGGAGTGGGCCAGCCTCCTCAAGCTCCACAACGTCCAGTTCGACCTCAT
GGCCCGCACCCCCTACATCGCCCGCCACAACGGCACCCCCCTCCTCCAGGCCATCA
GCAACGCCCTCAACCCCAACGCCACCGAGAGCAAGCTCCCCGACATCAGCCCCGAC
AACAAGATCCTCTTTCATCGCCGGCCACGACACCAACATCGCCAACATCGCCGGCAT
GCTCAACATGCGCTGGACCTCCCCGGCCAGCCCGACAACACCCCCCCCCGGCGGCG
CTCTCGTCTTTGAGCGCCTCGCCGACAAGTCCGGCAAGCAATATGTCTCTGTGTCAGCA
TGGTCTACCAGACCCTCGAGCAGCTCCGCAGCCAGACCCCCCTCAGCCTCAACCAG
CCCGCCGGCAGCGTCCAGCTCAAGATCCCCGGCTGCAACGACCAGACCGCCGAGGG
CTACTGCCCCCTCAGCACCTTACCCGCGTCTGTCAGCCAGAGCGTCGAGCCCGGCTG
CCAGCTCCAGTAAGGCGCGCC (SEQ ID NO:8)

5 Ejemplo 5 - Construcción y expresión de la fitasa de *Buttiauxella* de tipo natural en *T. reesei* como proteína de fusión con un sitio Kex2

Se amplificó el marco de lectura abierto de la fitasa de *Buttiauxella* de tipo natural mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el ADN sintetizado por GENEART como molde (véase la tabla 4, SEQ ID NO: 8). La máquina de PCR usada fue un ciclador térmico Peltier PTC-200 (MJ Research). La ADN polimerasa usada en la PCR fue HERculase (Stratagene). Los cebadores usados para amplificar el marco de lectura abierto de la fitasa fueron el cebador SK667 (directo) 5' CACTACTAGTGTGCTGTGGAGAAGCGCAACGACACCCCCGCCAG-3' (SEQ ID NO: 9) y el cebador SK664 5' GAGTTCGGCGCGCCTTACTGGA-3' (SEQ ID NO: 13). El cebador directo contenía la secuencia de aminoácidos VAVEKR (SEQ ID NO: 10) para lograr la escisión eficaz mediante la proteasa Kex2, junto con un sitio SpeI para fines de clonación. Las condiciones de PCR para amplificar el marco de lectura abierto de la fitasa de *Buttiauxella* de tipo natural fueron las siguientes: Etapa 1: 94°C durante 1 min. Etapa 2: 94°C durante 30 seg. Etapa 3: 58°C durante 30 seg. Etapa 4: 72°C durante 1 min. Se repitieron las etapas 2, 3 y 4 durante 24 ciclos adicionales. Etapa 5: 72°C durante 5 min. Etapa 6: 4°C durante el almacenamiento. Se purificó el producto de PCR usando el kit de purificación de gel Qiaquick (Qiagen), y se digirió con las enzimas de restricción SpeI y AscI (Roche). Se purificó el ADN digerido usando el kit de purificación de PCR Qiaquick, y se ligó en el vector pTrex4 en los sitios SpeI y AscI (véase la figura 5). Se transformó la reacción de ligamiento en células de *E. coli* químicamente competentes TOP 10 (Invitrogen). Véase el ejemplo 4 para la transformación e identificación de la expresión de proteínas. Se observó una banda de proteínas con una masa molecular aparente de aproximadamente 96 kDa en el gel teñido. La masa molecular expresada de la proteína de fusión es de aproximadamente 96 kDa. La proteína se expresaba a más de 10 g/l.

Ejemplo 6 - Construcción y expresión de la fitasa de *Buttiauxella* de tipo natural en *T. reesei* como constructo directo

Se amplificó el marco de lectura abierto de la fitasa de *Buttiauxella* de tipo natural mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el ADN sintetizado por GENEART como molde (véase la tabla 5, SEQ ID NO: 6). La máquina de PCR usada fue un ciclador térmico Peltier PTC-200 (MJ Research). La ADN polimerasa usada en la PCR fue HERculase (Stratagene). Los cebadores usados para amplificar el marco de lectura abierto de la fitasa fueron el cebador SK680 (directo) 5'-CACCATGCAGACCTTCGGTGCTTTTCTCGTTTCCTTCGCGCCAGCGGCCTGGCCGCGGCCAACGACACCCCCGCCAGC-3' (SEQ ID NO: 11) y el cebador SK6 5'-CCTTACTGGAGCTGGCAG-3' (SEQ ID NO: 12). El cebador directo contenía cuatro nucleótidos adicionales (secuencia - CACC) en el extremo 5' que se requerían para la clonación en el vector pENTRY/D-TOPO (Invitrogen). Las condiciones de PCR para

amplificar el marco de lectura abierto de la fitasa de *Buttiauxella* de tipo natural fueron las siguientes: Etapa 1: 94°C durante 1 min. Etapa 2: 94°C durante 30 seg. Etapa 3: 58°C durante 30 seg. Etapa 4: 72°C durante 1 min. Se repitieron las etapas 2, 3 y 4 durante 24 ciclos adicionales. Etapa 5: 72°C durante 5 min. Etapa 6: 4°C durante el almacenamiento. Se purificó el producto de PCR usando el kit de purificación de gel Qiaquick (Qiagen). Se clonó inicialmente el producto de PCR purificado en el vector pENTRY/D TOPO (Invitrogen), y se transformó en células de *E. coli* químicamente competentes TOP 10 (Invitrogen). Se recombinó un vector pENTR/D-TOPO con la secuencia correcta del marco de lectura abierto de la fitasa con el vector pTrex3g usando LR clonase II (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante (véase la figura 6). Se transformó el constructo resultante y se identificó la expresión de proteínas como en el ejemplo 4. La masa molecular expresada de la proteína de fusión es de aproximadamente 46 kDa. La proteína se expresaba a más de 10 g/l.

Ejemplo 7 - Construcción y expresión de la fitasa de *Buttiauxella* variante BP-17 en *T. reesei* como proteína de fusión con un sitio Kex2

Se sintetizó ADN que codifica para el marco de lectura abierto de la variante BP-17 por GENEART AG (BioPark Josef-Engert-Str. 11, D-93053 Regensburg, Alemania) (véase la tabla 5, SEQ ID NO: 7). Se incluyó la secuencia de aminoácidos VAVEKR (SEQ ID NO: 10) para la escisión por la proteasa Kex2 de la proteína de fusión, junto con los sitios de restricción SpeI y AscI para fines de clonación. Se insertó el marco de lectura abierto de la fitasa (SEQ ID NO: 7) en el vector, pTrex4, en los sitios SpeI y AscI (véase la figura 5). Se transformó el constructo resultante y se expresó como en el ejemplo 4. La masa molecular esperada de la proteína de fusión es de aproximadamente 96 kDa. La proteína se expresaba a más de 10 g/l.

Tabla 5: Secuencia de ADN de la variante BP-17 de la fitasa de *Buttiauxella* que contiene un sitio SpeI en el extremo 5' y un sitio AscI en el extremo 3'.

ACTAGTGTCTGCGCCGTGGAGAAGCGCAACGACACCCCCGCCAGCGGCTACCAGGTCTGA
GAAGGTCTGTCATCCTCAGCCGCCACGGCGTCCGCGCCCCCTACCAAGATGACCCAGA
CCATGCGCGACGTCACCCCAACACCTGGCCCGAGTGGCCCGTCAAGCTCGGCTAC
ATCACCCCTCGCGGCGAGCACCTCATCAGCCTCATGGGCGGCTTCTACCGCCAGAA
GTTCCAGCAGCAGGGCATCCTCAGCCAGGGCTCGTGCCCCACCCCAACAGCATCT
ACGTCTGGACCGACGTCGCCCAGCGCACCCCTCAAGACCGGCGAGGCCTTCCTCGCC
GGCCTCGCCCCCAGTGC GGCCCTCACCATCCACCACCAGCAGAACCTCGAGAAGGC
CGACCCCTCTTCCACCCCGTCAAGGCCGGCATCTGCAGCATGGACAAGACCCAGG
TCCAGCAGGCCGTCGAGAAGGAGGCCAGACCCCATCGACAACCTCAACCAGCAC
TACATCCCCAGCCTCGCCCTCATGAACACCACCCCTCAACTTCAGCAAGAGCCCCTGG
TGCCAGAAGCACAGCGCCGACAAGAGCTGCGACCTCGGCCTCAGCATGCCCAGCAA
GCTCAGCATCAAGGACAACGGCAACGAGGTCTCCCTCGACGGCGCTATCGGCCTCA
GCTCCACCCCTCGCCGAGATCTTCTCCTCGAGTACGCCAGGGCATGCCTCAGGCCG
CCTGGGGGCAACATCCACAGCGAGCAGGAGTGGGCCCTCCTCCTCAAGCTCCACAAC
GTCTACTTCGACCTCATGGAGCGCACCCCTACATCGCCCGCCACAAGGGCACCCCC
CTCCTCCAGGCCATCAGCAACGCCCTCAACCCCAACGCCACCGAGAGCAAGCTCCC
CGACATCAGCCCCGACAACAAGATCCTCTTCATCGCCGGCCACGACACCAACATCG
CCAACATCGCCGGCATGCTCAACATGCGCTGGACCTCCCCGGCCAGCCCGACAAC
ACCCCCCTGGCGGCGCTCTCGTCTTTGAGCGCCTCGCCGACAAGTCCGGCAAGCA
GTACGTCAGCGTCAGCATGGTCTACCAGACCCTCGAGCAGCTCCGCAGCCAGACCC
CCCTCAGCCTCAACCAGCCTGCCGGCAGCGTCCAGCTCAAGATCCCCGGCTGCAAC
GACCAGACCGCCGAGGGCTACTGCCCCCTCAGCACCTTCACCCGCGTCGTCAGCCA
GAGCGTCGAGCCCGGCTGCCAGCTCCAGTAAGGCGCGCC (SEQ ID NO:7).

Ejemplo 8 - Construcción y expresión de la fitasa de *Buttiauxella* variante BP-17 en *T. reesei* como constructo directo

Se amplificó el marco de lectura abierto de la fitasa de *Buttiauxella* variante BP-17 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el ADN sintetizado por GENEART como molde (véase la tabla 5, SEQ ID NO: 7). La máquina de PCR usada fue un ciclador térmico Peltier PTC-200 (MJ Research). La ADN polimerasa usada en la PCR fue HERculase (Stratagene). Los cebadores usados para amplificar el marco de lectura abierto de la fitasa fueron el cebador SK680 (directo) 5'-
CACCATGCAGACCTTCGGTGCTTTTCTCGTTTCCTTCCTCGCCGCCAGCGGCCTGGCC
GCGGCCAACGACACCCCGCCAGC-3' (SEQ ID NO: 11) y el cebador SK6 5'-CCTTACTGGAGCTGGCAG-3' (SEQ ID NO: 12). El cebador directo contenía cuatro nucleótidos adicionales (secuencia - CACC) en el extremo 5' que se

- requerían para la clonación en el vector pENTRY/D-TOPO (Invitrogen). Las condiciones de PCR para amplificar el marco de lectura abierto de la fitasa de *Buttiauxella* de tipo natural fueron las siguientes: Etapa 1: 94°C durante 1 min. Etapa 2: 94°C durante 30 seg. Etapa 3: 58°C durante 30 seg. Etapa 4: 72°C durante 1 min. Se repitieron las etapas 2, 3 y 4 durante 24 ciclos adicionales. Etapa 5: 72°C durante 5 min. Etapa 6: 4°C durante el almacenamiento.
- 5 Se purificó el producto de PCR usando el kit de purificación de gel Qiaquick (Qiagen). Se clonó inicialmente el producto de PCR purificado en el vector pENTRY/D TOPO vector (Invitrogen), y se transformó en células de *E. coli* químicamente competentes TOP 10 (Invitrogen). Se recombinó un vector pENTR/D-TOPO con la secuencia correcta del marco de lectura abierto de la fitasa con el vector pTrex3g usando LR clonase II (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante (véase la figura 6). Se transformó el constructo resultante y se identificó la expresión
- 10 como en el ejemplo 4. Se observó una banda de proteínas con una masa molecular aparente de aproximadamente 46 kDa en el gel teñido. La masa molecular esperada de la proteína de fusión es de aproximadamente 46 kDa. Se encontró que la proteína se expresaba a más de 10 g/l.

REIVINDICACIONES

1. Variante de fitasa aislada, comprendiendo dicha variante la secuencia mostrada en la figura 1C y que tiene actividad específica aumentada.
2. Variante de fitasa según la reivindicación 1, en la que la variante tiene estabilidad térmica aumentada, estabilidad proteolítica superior o actividad específica superior que la fitasa que tiene la secuencia de residuos de aminoácido 7-419 de la secuencia mostrada en la figura 1B.
3. ADN que codifica para una variante de fitasa según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
4. Vector de expresión que comprende el ADN según la reivindicación 3.
5. Célula huésped transformada con el vector de expresión según la reivindicación 4.
6. Composición enzimática que comprende una variante de fitasa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
7. Composición enzimática según la reivindicación 6, en la que dicha composición es una composición de pienso, una composición para su uso en un procedimiento de licuefacción de almidón o una composición para su uso en un procedimiento de fermentación alcohólica.
8. Composición enzimática según la reivindicación 7, que comprende además una enzima seleccionada del grupo de glucoamilasa, alfa amilasa, proteasas, celulasas, xilanasas y combinaciones de las mismas.
9. Medio de fermentación que comprende la variante de fitasa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, producida a partir de un cultivo de células de hongo filamentoso.
10. Medio de fermentación según la reivindicación 9, en el que las células de hongo filamentoso son células de *Trichoderma* tales como células de *T. reesei*.
11. Método para producir una variante de fitasa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en una célula huésped, que comprende
 - a) transformar una célula huésped con un constructo de ADN que incluye un promotor que tiene actividad transcripcional en la célula huésped operativamente unido a un polinucleótido heterólogo que codifica para una variante de fitasa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2;
 - b) cultivar la célula huésped transformada en un medio de cultivo adecuado para permitir la expresión de dicha fitasa y
 - c) producir la fitasa.
12. Método según la reivindicación 11:
 - (i) en el que la célula huésped es una célula fúngica, una célula bacteriana o una célula vegetal; o
 - (ii) en el que la célula es una célula de levadura o una célula de hongo filamentoso; o
 - (iii) que comprende adicionalmente recuperar la fitasa producida; o
 - (iv) en el que la célula huésped es una célula huésped de hongo filamentoso y la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Trichoderma*; o
 - (v) en el que la célula de *Trichoderma* es una célula de *T. reesei*.

FIG.1A - Polipéptido del gen de fitasa de *Buttiauxela* P1-29 (SEQ ID NO:1).

MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
TQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYYITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYV
WADVQDRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIIHHQQDIKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE
KEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNTTLNFS TSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNK
VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIA
RHNGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQP
DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ
TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

FIG. 1B – Fitasa BP-11 variante con etiquetas de His en el extremo N-terminal (SEQ ID NO:4)

HHHHHHNDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYYITPRGE
HLISLMGGFYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVDQDRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTI
HHQQNLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTPIDNLNQHYIPSLALMNTTLNF
SKSPWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQ
AAWGNHSEQEWALLKLHNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDI
SPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSM
VYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

FIG. 1C – Fitasa BP-17 variante (SEQ ID NO:3)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYYITPRGEHLISLM
GGFYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNL
EKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTPIDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWC
QKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNH
HSEQEWALLKLHNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKI
LFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLE
QLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

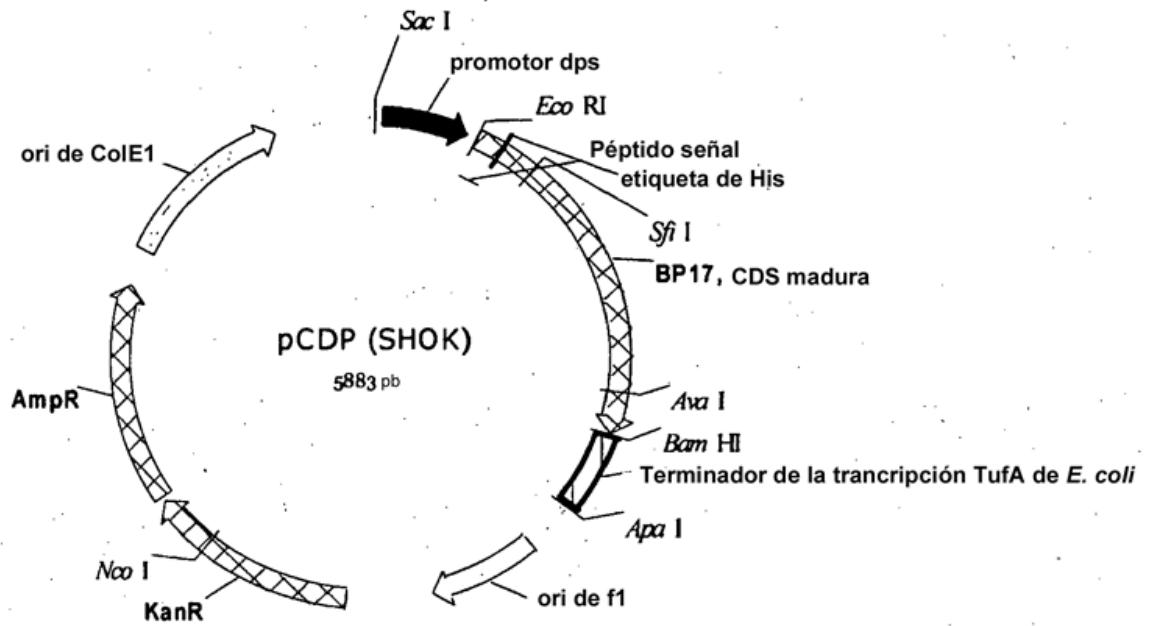


Fig. 2. Estructura del vector de expresión pCDP(SHOK)

FIG. 3 Perfil de pH

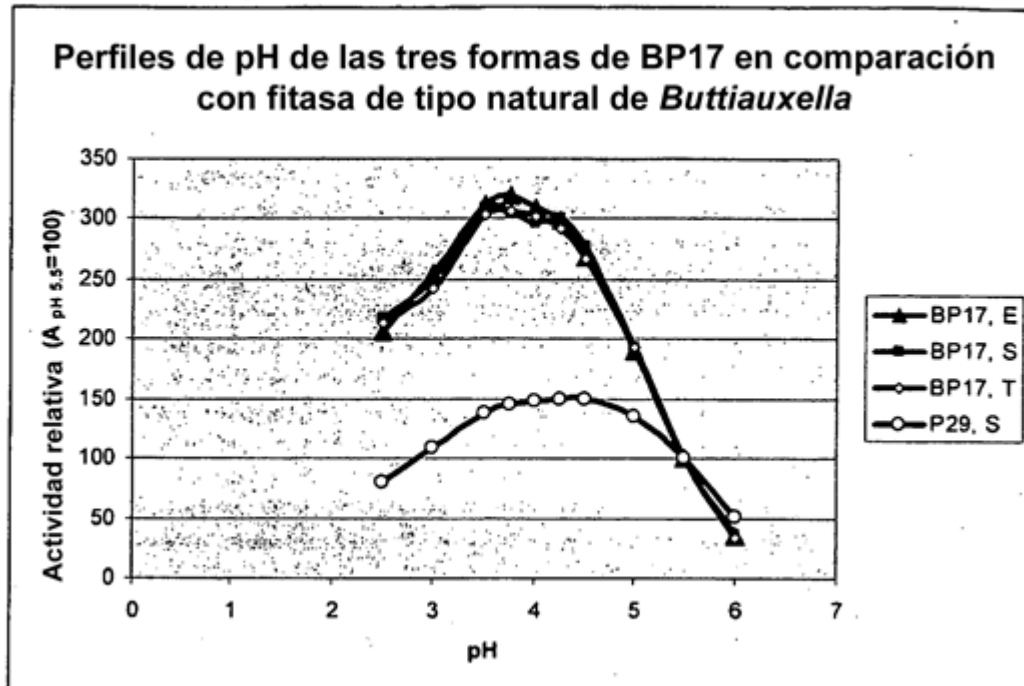
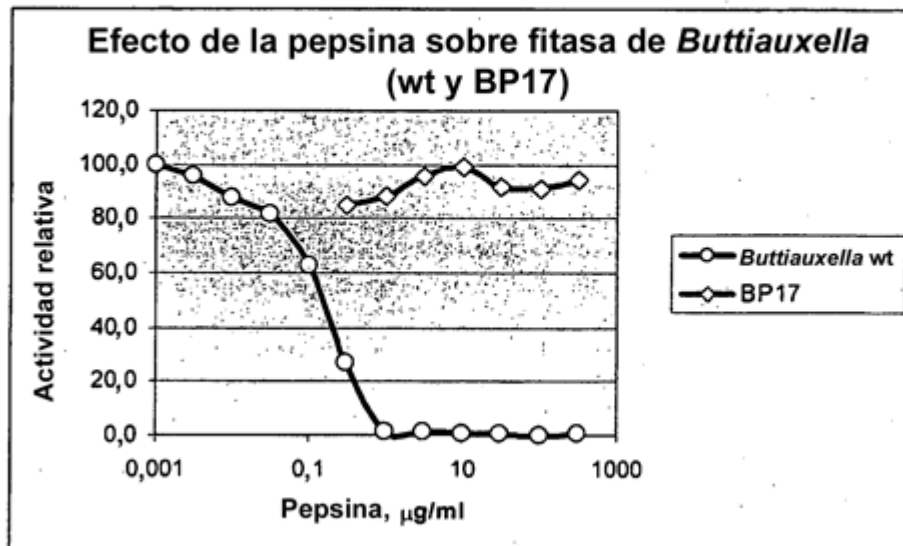
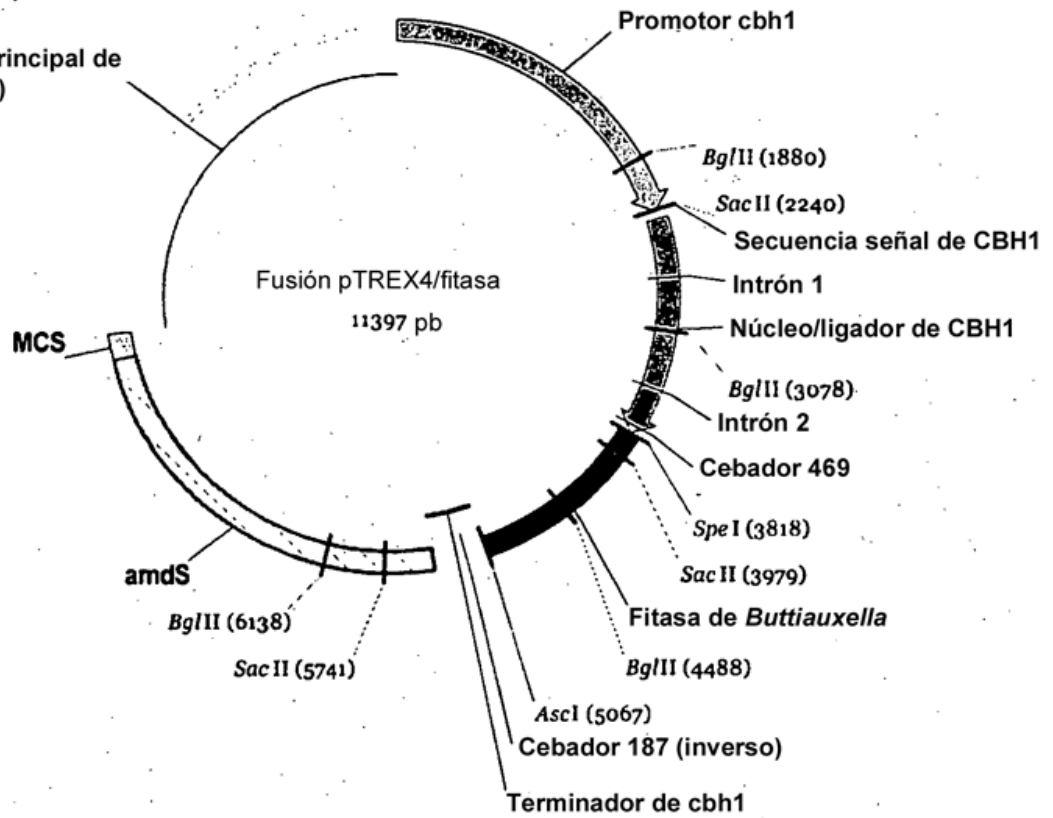


FIG. 4 – Resistencia a la pepsina de fitasa de *Buttiauxella* de tipo natural y mutante BP17



**Construto de fusión de fitasa de *Buttiauxella*
(figura n.º 5)**

Estructura principal de
pS1180 (ampR)



Construeto directo de fitasa de *Buttiauxella*
(figura n.º 6)

