

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 434**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A23J 3/34 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

A01K 67/033 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2007 E 11155829 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2365064**

54 Título: **Variantes de fitasa**

30 Prioridad:

04.04.2006 DK 200600484

25.04.2006 DK 200600581

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

16.03.2015

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)

Krogshøjvej 36

2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

DE MARIA, LEONARDO;

ANDERSEN, CARSTEN;

SKOV, LARS KOBBEROEE y

SOERENSEN, MIKAEL BLOM

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 531 434 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

Variantes de fitasa

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a una fitasa que tiene al menos el 74% de identidad a la fitasa derivada de *Citrobacter braakii* ATCC 51113 y comprende al menos una alteración respecto a esta fitasa (es decir, es una variante de la misma). La invención también se refiere al ADN que codifica estas fitasas, a métodos de su producción, así como al uso de las mismas, por ejemplo, en el alimento para animales y aditivos de alimento. La parte madura de la fitasa *Citrobacter braakii* ATCC 51113 está incluida en el listado de secuencias como SEC ID NO:2.

15 **Antecedentes de la invención**Antecedentes de la técnica

[0002] La secuencia del gen *phyA* de *Citrobacter freundii* ha sido presentada por Zinin *et al.* a las bases de datos EMBL/GenBank/DDBJ con número de acceso AY390262. La secuencia de aminoácidos de fitasa correspondiente se encuentra en las bases de datos UniProt/TrEMBL con número de acceso Q676V7. La parte madura prevista de Q676V7 se incluye en el presente listado de secuencias como SEC ID NO:4.

[0003] La publicación WO-2004/085638 divulga, como SEC ID NO:7, la secuencia de aminoácidos de una fitasa de *Citrobacter braakii* YH-15, depositada como KCCM 10427. La parte madura de esta secuencia de aminoácidos se incluye en este documento como SEC ID NO: 3. Esta secuencia se encuentra también en la base de datos Geneseqp con número de acceso ADU50737. Esta fitasa (YH-15) fue más tarde clonada en y expresada en *Saccharomyces cerevisiae* mostrando un modelo de glicosilación modificada y un cambio en la termoestabilidad, cuando se expresa en *Saccharomyces cerevisiae*, Kim *et al.*: "Molecular cloning of the phytase gene from *Citrobacter braakii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*." Biotechnology Letters 2006, vol. 28, n°. 1.

[0004] La publicación WO 2006/037328 divulga la fitasa de tipo salvaje de *Citrobacter braakii* ATCC 51113 (es decir, SEC ID NO:2 en este documento), así como una variante de la misma, la cual también se incluye en el presente listado de secuencias, a saber, como SEC ID NO:6.

[0005] Las publicaciones WO 2006/038062 y WO 2006/038128 revelan ambas la secuencia de aminoácidos del gen de fitasa de *Citrobacter freundii* P3-42, depositada con número de acceso NCIMB 41247. Esta secuencia de aminoácidos se incluye en este documento como SEC ID NO:9.

[0006] Es un objetivo de la invención proporcionar fitasas de propiedades modificadas, preferiblemente, de propiedades mejoradas. Ejemplos no limitativos de tales propiedades son: termoestabilidad, perfil de temperatura, perfil de pH, actividad específica, rendimiento en el alimento para animales, sensibilidad de proteasa, y/o modelo de glicosilación.

45 **Resumen de la invención**

[0007] La presente invención se refiere a una fitasa que tiene una identidad de al menos el 85% a la SEC ID NO:2, que tiene una termoestabilidad mejorada indicada como actividad residual determinada dividiendo un sobrenadante en dos partes, una parte se incuba durante 30 minutos a 60°C, y la otra parte durante 30 minutos a 5°C, tras lo cual la actividad de ambas se determina en el fosfato de p-nitrofenilo a 37°C y pH 5,5, donde la actividad residual de la fitasa es la actividad de la muestra que ha sido incubada a 60°C dividida por la actividad de la misma muestra incubada a 5°C, donde la actividad residual de la fitasa es al menos 105% de la actividad residual de la fitasa de referencia SEC ID NO:2, medida en las mismas condiciones, y dicha fitasa comprende al menos una alteración y no más de 4 alteraciones en comparación con la SEC ID NO:2 de la cual se selecciona al menos uno de los siguientes: G52C/A99C, K141C/V199C, G59C/F100C, Q91C/W46C, N31C/E176C, N31C/T177C, y/o S162C/S247C, donde el grado de identidad entre secuencias, se determina por el programa "Needle" utilizando la matriz de sustitución BLOSUM62, la penalización de abertura de gap es 10, y la penalización de extensión de gap es 0.5.

[0008] La invención también se refiere a tales fitasas donde los aminoácidos en la posición 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, y 186 han sido sustituidos por QADKP, GEDKP, NGISA, IAGKS, KEKHQ, KEKQQ, KEKKV, o KTDKL, y tales fitasas, que comprenden una alteración seleccionada de las siguientes: 4P, 5P, 111P, 137P, 161P, 52E, 57Y, 76G, 107D, 107G, 109A, 1*, 1*/2*, 1*/2*/3*, 121T, 273L, 285G, 286Q, 299L, 362K, 331K/55D, 107E, 46E, 82E, 119R, 119K, 164E, 223E, 276R, 276K, 362R, 379R, 379K, 385D, 410D, 410E, 411 R, 411 K, 53V, 121 D, 167Q, 196Q, 200K, 202N, 218Q, 241 Q, 285N, 314N, 314G, 406A, 179K/180E/181 K/182H/183Q/184*/185*/186*, 179K/180E/181 K/182Q/183Q/184*/185*/186*, 179K/180T/181 D/182K/183L/184*/185*/186*, 111 P/241 Q, 1 K, 114T/115Q/116A/117D/118T/119S/120S/121 P/122D/123P/124L, y 114T/115Q/116T/117D/118T/119S/120S/121 P/122D/123P/124L,

donde el símbolo "*" significa que el residuo de aminoácido en la posición indicada es eliminado.

[0009] La invención también se refiere al ADN que codifica estas fitasas, métodos de su producción, así como el uso del mismo, por ejemplo, en el alimento para animales y aditivos de alimento.

5

Breve descripción de los dibujos

[0010]

10 La Fig. 1 corresponde a la Tabla 2 de la publicación WO 2006/038062 y divulga varias variantes de la fitasa *Citrobacter freundii* NCIMB 41247 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:9 y la Fig. 2 es una alineación de las fitasas de la SEC ID NO:2 y 9.

15 [0011] Los números de posición en la Fig. 1 se refieren a la numeración de la SEC ID NO:9. Las posiciones de la SEC ID NO:2 correspondientes se pueden encontrar por deducción de 22 (p. ej., la variante P229S de la Fig.1 significa variante P207S usando la numeración de la presente aplicación).

Descripción detallada de la invención

20

[0012] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una fitasa que tiene al menos el 85% de identidad a la SEC ID NO:2, que tiene una termoestabilidad mejorada indicada como actividad residual determinada dividiendo un sobrenadante en dos partes, una parte se incubaba durante 30 minutos a 60°C, y la otra parte durante 30 minutos a 5°C, tras lo cual la actividad de ambas se determina sobre el fosfato de p-nitrofenilo a 37°C y pH 5,5, donde la actividad residual de la fitasa es la actividad de la muestra incubada a 60°C dividida por la actividad de la misma muestra que ha sido incubada a 5°C, donde la actividad residual de la fitasa es al menos 120% de la actividad residual de la fitasa de referencia SEC ID NO:2, medida en las mismas condiciones, y dicha fitasa comprende al menos una alteración en comparación con la SEC ID NO:2 de la cual se selecciona al menos uno de los siguientes: G52C/A99C, K141C/V199C, G59C/F100C, Q91C/W46C, N31C/E176C, N31C/T177C, y/o S162C/S247C, donde el grado de identidad entre secuencias, se determina por el programa "Needle" utilizando la matriz de sustitución BLOSUM62, la penalización de abertura de gap es 10, y la penalización de extensión de gap es 0.5.

25

30

[0013] El porcentaje de identidad se determina como se describe en la sección "Polipéptidos de fitasa, porcentaje de identidad".

35

[0014] Los números de posición se refieren a la numeración de posición de la SEC ID NO:2, como se describe en la sección "Numeración de posición." Las posiciones correspondientes a estos números de posición de SEC ID NO:2 en otras fitasas se determinan como se describe en la sección "Identificación de los números de posición correspondientes."

40

[0015] La fitasa de la invención es una variante de la fitasa de la SEC ID NO:2, a saber, no es idéntica a la SEC ID NO:2, puesto que comprende al menos una alteración en comparación con la SEC ID NO:2.

45

[0016] En un segundo aspecto la invención se refiere a tales fitasas, donde los aminoácidos en la posición 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, y 186 han sido sustituidos por QADKP, GEDKP, NGISA, IAGKS, KEKHQ, KEKQQ, KEKKV, o KTDKL.

50

[0017] En tercer lugar las fitasas de la invención pueden comprender una alteración seleccionada de las siguientes: 4P, 5P, 111 P, 137P, 161 P, 52E, 57Y, 76G, 107D, 107G, 109A, 1*, 1*/2*, 1*/2*/3*, 121 T, 273L, 285G, 286Q, 299L, 362K, 331K/55D, 107E, 46E, 82E, 119R, 119K, 164E, 223E, 276R, 276K, 362R, 379R, 379K, 385D, 410D, 410E, 411 R, 411 K, 53V, 121 D, 167Q, 196Q, 200K, 202N, 218Q, 241Q, 285N, 314N, 314G, 406A, 179K/180E/181 K/182H/183Q/184*/185*/186*, 179K/180E/181 K/182Q/183Q/184*/185*/186*, 179K/180E/181 K/182K/183V/184*/185*/186*, 179K/180T/181 D/182K/183L/184*/185*/186*, 111P/241Q, 1K, 114T/115Q/116A/117D/118T/119S/120S/121P/122D/123P/124L, y 114T/115Q/116T/117D/118T/119S/120S/121P/122D/123P/124L, donde el símbolo "*" significa que el residuo de aminoácido en la posición indicada es eliminado.

55

[0018] Las fitasas de la invención pueden ser variantes de las fitasas de SEC ID NO:2, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:6, o SEC ID NO:9, y pueden además comprender una sustitución o una combinación de sustituciones seleccionadas de entre las sustituciones y combinaciones de sustituciones catalogadas en cada fila de Fig.1.

60

[0019] La nomenclatura usada en este documento para alteraciones se describe en detalle en la sección "Alteraciones, tales como sustituciones, deleciones, inserciones."

65 [0020] La fitasa de la invención puede ser una variante de cualquier tipo salvaje o variante de fitasa. En formas de realización particulares, es una variante de la fitasa de la SEC ID NO:2, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:6,

SEC ID NO:9, o una variante de cualquiera de las variantes de fitasa relacionadas con la SEC ID NO:9 y listada en la Fig.1.

5 [0021] La fitasa de la invención puede además comprender al menos una alteración (sustitución) o una combinación de alteraciones (sustituciones) seleccionadas de entre las alteraciones (sustituciones) y combinaciones de alteraciones (sustituciones) listadas en cada fila de la Fig.1.

Estrategia para preparar variantes

10 [0022] La estructura de la fitasa *C. braakii* ATCC 51113 fue construida mediante modelado por homología, usando como molde la estructura de la fitasa AppA de *E. Coli* (Protein Data Bank id.: 1DKO; Lim *et al.*, Nat. Estruct. Biol. (2000), vol. 2, págs. 108-113).

15 [0023] La estructura fue sometida a simulaciones de dinámica molecular (DM) y cálculos electroestáticos. Las posiciones para puentes disulfuro putativos y prolinas fueron también identificadas, así como otras posiciones de importancia potencial en lo que respecta a las diversas propiedades enzimáticas deseables. Finalmente, los sitios de glicosilación putativa (tramos de NXT o NXS) fueron identificados.

20 [0024] Todas estas sugerencias fueron evaluadas en el marco de la estructura modelada y los resultados de la simulación, para la propiedad de termoestabilidad con énfasis particular en la alta temperatura final.

[0025] Las variantes de fitasa correspondientes fueron preparadas a través de métodos conocidos en la técnica y evaluadas como se describe en la parte experimental.

25 Polipéptidos de fitasa, porcentaje de identidad

[0026] En el presente contexto, una fitasa es un polipéptido con actividad de fitasa, es decir, una enzima que cataliza la hidrólisis de fitato (mioinositol hexakisfosfato) a (1) mioinositol y/o (2) mono-, di-, tri-, tetra- y/o pentafosfatos de los mismos y (3) fosfato inorgánico.

30 [0027] En el presente contexto el término sustrato de fitasa abarca, p.ej., ácido fítico y cualquier fitato (sal de ácido fítico), así como los fosfatos listados en el punto (2) más arriba.

35 [0028] El sitio web de ENZYME en internet (<http://www.expasy.ch/enzyme/>) es un repositorio de información relativa a la nomenclatura de enzimas. Está basado principalmente en las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUB-MB) y describe cada tipo de enzima caracterizada para la cual se ha proporcionado un número EC (Comisión de Enzimas), (Bairoch A. The ENZYME database, 2000, Nucleic Acids Res 28:304-305). Véase también el manual Enzyme Nomenclature de NC-IUBBM, 1992).

40 [0029] Según el sitio web de ENZYME, se conocen tres diferentes tipos de fitasas: una fitasa denominada 3-fitasa (nombre alternativo 1-fitasa; una mioinositol hexafosfato 3-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.8), una fitasa denominada 4-
45 fitasa (nombre alternativo 6-fitasa, nombre basado en el sistema de numeración 1L y no en la numeración 1D, EC 3.1.3.26), y una fitasa denominada 5-fitasa (EC 3.1.3.72). Para los fines de la presente invención, los tres tipos se incluyen en la definición de fitasa.

[0030] En una forma de realización particular, las fitasas de la invención pertenecen a la familia de fosfatasa ácidas de histidina, que incluye la fosfatasa ácida de pH 2,5 de *Escherichia coli* (gen appA) así como fitasas fúngicas tales como fitasas A y B de *Aspergillus awamorii* (EC: 3.1.3.8) (gen phyA y phyB). Las fosfatasa ácidas de histidina comparten dos regiones de similitud de secuencia, cada una centrada alrededor de un residuo de histidina conservada. Estas dos histidinas parecen estar implicadas en el mecanismo catalítico de las enzimas. La primera histidina está localizada en la sección N-terminal y forma una histidina de fósforo intermedia mientras la segunda está localizada en la sección C-terminal y posiblemente actúa como donante de protón.

50 [0031] En una forma de realización particular adicional, las fitasas de la invención tienen un motivo de sitio activo conservado, a saber, R-H-G-X-R-X-P, donde X designa cualquier aminoácido (véase aminoácidos 16 a 22 de la SEC ID NOs: 2, 3, 4, 6 y aminoácidos 38-44 de la SEC ID NO:9). En una forma de realización preferida, el motivo de sitio activo conservado es R-H-G-V-R-A-P, es decir, los aminoácidos 16-22 (por referencia a la SEC ID NO:2) son RHGVRAP.

60 [0032] Para los fines de la presente invención la actividad de fitasa se determina en la unidad de FYT, siendo un FYT la cantidad de enzima que libera 1 micromol de ortofosfato inorgánico por min. bajo las siguientes condiciones: pH 5,5; temperatura 37°C; sustrato: fitato de sodio (C₆H₆O₂₄P₆Na₁₂) en una concentración de 0,0050 mol/l. Ensayos de fitasa adecuados son los ensayos FYT y FTU descritos en el Ejemplo 1 de la publicación WO 00/20569. FTU es para determinar la actividad de fitasa en el alimento y premezclas. La actividad de fitasa también puede ser
65 determinada usando los ensayos del Ejemplo 1 ("Determinación de la actividad de la fosfatasa" o "Determinación de la actividad de la fitasa").

[0033] En una forma de realización particular la fitasa de la invención está aislada. El término "aislada" como se utiliza en este caso se refiere a un polipéptido que es al menos un 20% puro, preferiblemente al menos un 40% puro, más preferiblemente al menos un 60% puro, incluso aún más preferiblemente al menos un 80% puro, de la forma más preferible al menos un 90% puro, e incluso aún más preferible al menos un 95% puro, según lo determinado por SDS-PAGE. En particular, se prefiere que los polipéptidos estén en "forma esencialmente pura", es decir, que la preparación de polipéptido está esencialmente liberada de otro material de polipéptido con el cual está originalmente asociada. Esto se puede lograr, por ejemplo, preparando el polipéptido mediante métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación tradicional.

[0034] La relación entre dos secuencias de aminoácidos es descrita por el parámetro "identidad". Para fines de la presente invención, la alineación de dos secuencias de aminoácidos se determina mediante el uso del programa Needle del paquete EMBOSS (<http://emboss.org>) versión 2.8.0. El programa Needle implementa el algoritmo de alineación global descrito en Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453. La matriz de sustitución usada es BLOSUM62, la penalización por abertura de *gap* (hueco) es 10, y penalización por extensión de *gap* es 0,5.

[0035] El grado de identidad entre una secuencia de aminoácidos de la presente invención ("secuencia de la invención") y la secuencia de aminoácidos a la que se hace referencia en las reivindicaciones (SEC ID NO:2) se calcula como el número de coincidencias exactas en una alineación de las dos secuencias, dividido por la longitud de la "secuencia de la invención," o la longitud de la SEC ID NO:2, la que sea más corta. El resultado se expresa en porcentaje de identidad.

[0036] Una coincidencia exacta ocurre cuando la "secuencia de la invención" y la SEC ID NO:2 tienen residuos de aminoácidos idénticos en las mismas posiciones de la superposición (en el ejemplo de alineación más abajo esto está representado con "|"). La longitud de una secuencia es el número de residuos de aminoácidos en la secuencia (p. ej., la longitud de aminoácidos 1-411 de la SEC ID NO:2 es 411).

[0037] El Ejemplo 13 es un ejemplo de una alineación de la fitasa de la SEC ID NO:2 y la fitasa de la SEC ID NO:9, y el ejemplo ilustra cómo calcular el porcentaje de identidad entre estas dos cadenas principales.

[0038] En otro ejemplo de alineación, puramente hipotético, más abajo, el solapamiento es la secuencia de aminoácidos "HTWGERNL" de la Secuencia 1; o la secuencia de aminoácidos "HGWGEDANL" de la Secuencia 2. En el ejemplo un *gap* se indica con un "-".

[0039] Ejemplo de alineación hipotética:

```

Secuencia 1 :      ACMSHTWGER-NL
                   | | | | |
Secuencia 2:      HGWGEDANLAMNPS
    
```

[0040] En una forma de realización particular, el porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido con, o para, la SEC ID NO:2 es determinado i) alineando las dos secuencias de aminoácidos usando el programa Needle, con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización por abertura de *gap* de 10, y una penalización por extensión de *gap* de 0,5 ii) contando el número de coincidencias exactas en la alineación; iii) dividiendo el número de coincidencias exactas por la longitud de la secuencia de aminoácidos más corta de las dos secuencias de aminoácidos, y iv) convirtiendo el resultado de la división de iii) en el porcentaje.

[0041] En el ejemplo hipotético anterior, el número de coincidencias exactas es 6, la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos es 12; por consiguiente el porcentaje de identidad es del 50%.

[0042] En formas de realización particulares de la fitasa de la invención, el grado de identidad para SEC ID NO:2 es al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o al menos 99%. En todavía otras formas de realización particulares, el grado de identidad es al menos 98.0%, 98.2%, 98.4%, 98.6%, 98.8%, 99.0%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, o al menos 99.9%..

Numeración de posición

[0043] La nomenclatura usada en este documento para definir las posiciones de aminoácidos se basa en la secuencia de aminoácidos de la fitasa derivada de *Citrobacter braakii* ATCC 51113, cuya secuencia madura se da en el listado de secuencia como la SEC ID NO:2 (aminoácidos 1-411 de la SEC ID NO:2). Por consiguiente, en el presente contexto, la base para posiciones de numeración es la SEC ID NO:2 empezando con E1 y finalizando con E411.

[0044] Cuando en este documento se usa el término parte (o secuencia) "madura" se refiere a la parte del polipéptido que es segregada por una célula que contiene, como parte de su equipamiento genético, un polinucleótido que codifica el polipéptido. En otras palabras, la parte madura del polipéptido se refiere a la parte del polipéptido que permanece después de que la parte de péptido señal, así como una parte de propéptido, si la hay, ha sido escindida. La parte de péptido señal puede ser predicha por programas conocidos en la técnica (p. ej. SignalP). La parte de péptido señal prevista de la SEC ID NO:2 se incluye en el presente listado de secuencias como SEC ID NO:8, que es codificada por la SEC ID NO:7. La SEC ID NO:2 es la parte madura prevista. Generalmente, el primer aminoácido de la parte madura de una enzima se puede determinar mediante la secuenciación N-terminal de la enzima purificada. Cualquier diferencia entre la parte de péptido señal y la parte madura debe entonces deberse a la presencia de un propéptido.

Alteraciones, tales como sustituciones, deleciones, inserciones

[0045] Una variante de fitasa puede comprender varios tipos de alteraciones en relación a un molde (es decir, una secuencia de aminoácidos de referencia o comparativa tal como la SEQ ID NO:2): un aminoácido puede ser sustituido por otro aminoácido; un aminoácido puede ser eliminado; un aminoácido puede ser insertado; al igual que cualquier combinación de cualquier número de alteraciones de este tipo. En el presente contexto, el término "inserción" tiene como objetivo abarcar también las extensiones N- y/o C-terminal.

[0046] La nomenclatura general usada en este documento para una única alteración es la siguiente: XDcY, donde "X" e "Y" designan independientemente un código de aminoácido de una sola letra, o un "*" (deleción de un aminoácido), "D" designa un número, y "c" designa un contador alfabético (a, b, c, etcétera), que únicamente está presente en inserciones. Se hace referencia a la Tabla 1 más abajo que describe ejemplos puramente hipotéticos de la aplicación de esta nomenclatura para varios tipos de alteraciones.

Tabla 1

Tipo	Descripción	Ejemplo
Sustitución	X=Aminoácido en molde D=Posición en el molde c vacío Y=Aminoácido en variante	G80A 80 AALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSG : () AALNNSIAVLGVAPSAELYAVKVLGASGSG
Inserción	X="*" D=Posición en el molde antes de la inserción c="a" para la primera inserción en esta posición, "b" para la siguiente, etc	*80aT *80bY *85aS 80 85 AALNNSIG. . VLGVA. PSAELYAVKVLGASG () AALNNSIGTYVLGVASPSAELYAVKVLGASG
Deleción	X=Aminoácido en el molde D=Posición en el molde c vacío Y="*"	V81* 80 AALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSG AALNNSIG. LGVAPSAELYAVKVLGASGSG
Extensión N-terminal	Inserciones en posición "0".	*0aA *0bT *0cG 1 . . . AQSVPWGISRVQ (ATGAQSVPWGISRVQ
Extensión C-terminal	Inserciones después del aminoácido N-terminal	*275aS *275bT

		270 275 ATSLGSTNLYGSGLVNAEAAATR.. ATSLGSTNLYGSGLVNAEAAATRST
--	--	--

[0047] Como se explica más arriba, el número de posición ("D") se cuenta a partir del primer residuo de aminoácido de la SEC ID NO:2.

5 [0048] Las diferentes alteraciones en la misma secuencia se separan por "/" (barra), por ejemplo, la designación "1*2*3*" significa que los aminoácidos en el número de posición 1, 2, y 3 se eliminan todos, y la designación "104A/105F" significa que el aminoácido en el número de posición 104 se sustituye por A, y el aminoácido en el número de posición 105 se sustituye por F.

10 [0049] Las alteraciones alternativas se separan por "," (coma), p.ej., la designación "119R,K" significa que el aminoácido en la posición 119 se sustituye por R o K.

15 [0050] Las comas usadas en este documento en otras varias enumeraciones de posibilidades significan lo que estas normalmente hacen gramaticalmente, a saber, frecuentemente y/o. P.ej., la primera coma en el listado "53V,Q, 121 D, y/o 167Q" denota una alternativa (V o Q), mientras que las dos comas siguientes deberían ser interpretadas como opciones y/o: 53 V o Q, y/o 121 D, y/o 167Q.

20 [0051] En el presente contexto, "por lo menos uno" (p. ej. alteración) significa uno o más, p.ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 alteraciones; o 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 25, 28, o 30 alteraciones; etcétera, hasta un número máximo de alteraciones de 125, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, o de 200. Las variantes de fitasa de la invención, no obstante, todavía deben ser por lo menos un 74% idénticas a la SEC ID NO:2, siendo determinado este porcentaje como se ha descrito anteriormente.

25 [0052] Una sustitución o extensión sin ninguna indicación de qué sustituir o extender se refiere a la inserción de cualquier aminoácido natural, o no natural, exceptuando el que ocupa esta posición en el molde.

[0053] El Ejemplo 13 proporciona otra ilustración de cómo aplicar esta nomenclatura.

Identificación de los números de posición correspondientes

30 [0054] Como se ha explicado anteriormente, la fitasa madura de *Citrobacter braakii* ATCC 51113 (SEC ID NO:2) se usa como el estándar para la numeración de posición y, de ese modo, también para la nomenclatura.

35 [0055] Para otra fitasa, en particular una variante de fitasa de la invención, la posición correspondiente a la posición D en la SEC ID NO:2 se encuentra alineando las dos secuencias como se ha especificado anteriormente en la sección titulada "Polipéptidos de fitasa, porcentaje de identidad". A partir de la alineación, la posición en la secuencia de la invención correspondiente a la posición D de la SEC ID NO:2 se puede identificar claramente y sin ambigüedad (las dos posiciones en la parte superior de cada una en la alineación).

40 [0056] El Ejemplo 13 es un ejemplo de una alineación de la fitasa de la SEC ID NO:2 y la fitasa de la SEC ID NO:9, y el ejemplo ilustra cómo se identifican las posiciones correspondientes en estas dos cadenas principales.

45 [0057] A continuación, se incluyen algunos ejemplos adicionales, puramente hipotéticos, que se derivan de la anterior Tabla 1 que incluye en la tercera columna varias alineaciones de dos secuencias:

Nótese la tercera celda en la primera fila de la Tabla 1: la secuencia superior es el molde, la inferior es la variante. El número de posición 80 se refiere al residuo de aminoácido G en el molde. El aminoácido A ocupa la posición correspondiente en la variante. Por consiguiente, esta sustitución es designada G80A.

50 [0058] Nótese ahora la tercera celda en la segunda fila de la Tabla 1: la secuencia superior es otra vez el molde y la inferior, la variante. El número de posición 80 se refiere de nuevo al residuo de aminoácido G en el molde. La variante tiene dos inserciones, a saber, TY, después de G80 y antes de V81 en el molde. Mientras que la T y la Y, por supuesto, tendrían su propio número de posición "real" en la secuencia de aminoácidos variante, para los fines presentes siempre se hace referencia a los números de posición de molde, y por consiguiente se dice que la T y la Y están en el número de posición 80a y 80b, respectivamente.

55 [0059] Finalmente, nótese la tercera celda en la última fila de la Tabla 1: el número de posición 275 se refiere al último aminoácido del molde. Se dice que una extensión C-terminal de ST está en el número de posición 275a y 275b, respectivamente, aunque, nuevamente, por supuesto tienen su propio número de posición "real" en la secuencia de aminoácidos variante.

60

Propiedades modificadas, fitasa de referencia

[0060] En una forma de realización particular, la fitasa de la invención ha modificado, preferiblemente mejorado, propiedades. Los términos "modificado" y "mejorado" implican una comparación con otra fitasa. Ejemplos de otras fitasas de referencia, o comparativas son: SEC ID NO:3, y/o SEC ID NO:4. Aún más ejemplos de fitasas de referencia pueden ser la SEC ID NO:2, y/o la SEC ID NO:6. Otro ejemplo más de una fitasa de referencia puede ser la SEC ID NO:9, y las variantes de la misma descritas en la Fig. 1.

[0061] Ejemplos no limitativos de propiedades que son modificadas, preferiblemente mejoradas, son los siguientes: termoestabilidad, perfil de pH, actividad específica, rendimiento en el alimento para animales, sensibilidad de proteasa, y/o modelo de glicosilación. La fitasa de la invención puede también tener un perfil de temperatura modificado, preferiblemente mejorado, y/o puede incorporar un cambio de un sitio de escisión potencial de proteasa.

Termoestabilidad

[0062] La termoestabilidad, o estabilidad de temperatura, se puede determinar como se describe en el Ejemplo 1 bajo el título de "Determinación de estabilidad de temperatura." Por consiguiente, en una forma de realización preferida, una fitasa de la invención tiene una actividad residual que es superior a la actividad residual de una fitasa de referencia, donde la actividad residual se determina de la siguiente manera: un sobrenadante de fermentación se divide en dos partes, una parte se incuba durante 30 minutos a una temperatura elevada deseada, y la otra parte durante 30 minutos a 5°C, tras lo cual la actividad de ambos se determina en el fosfato de p-nitrofenilo a 37°C y pH 5.5, y la actividad de la muestra incubada a una temperatura elevada se divide por la actividad de la misma muestra incubada a 5°C. Las temperaturas elevadas preferidas son 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, u 85°C. Si se desea, las muestras con enzima se pueden diluir en 0,1M NaAc pH 5,5. La actividad residual de una fitasa de la invención es preferiblemente al menos un 105%, o al menos un 110%, 120%, 130%, 140%, 150% de la actividad residual de la fitasa de referencia. En todavía más formas de realización, la actividad residual de una fitasa de la invención es al menos un 200%, o al menos un 250%, 300%, 400%, o al menos un 500% de la actividad residual de la fitasa de referencia.

[0063] La termoestabilidad puede también ser determinada como se describe en el Ejemplo 5. Por consiguiente, en una forma de realización preferida, una fitasa de la invención tiene una actividad residual que es superior a la actividad residual de una fitasa de referencia, donde la actividad residual se determina de la siguiente manera: un sobrenadante de fermentación se divide en dos partes, una parte se incuba durante 30 minutos a 50°C, y la otra parte durante 30 minutos a 5°C, tras lo cual la actividad de ambos se determina en el p-nitrofenil fosfato a 37°C y pH 5,5, y la actividad de la muestra que ha sido incubada a una temperatura elevada se divide por la actividad de la misma muestra que ha sido incubada a 5°C. Si se desea, las muestras con enzimas se pueden diluir en 0,1M de NaAc pH 5,5. La actividad residual de una fitasa de la invención es preferiblemente al menos 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 10x, 15x, 20x, o al menos 25x la actividad residual de la fitasa de referencia de la SEC ID NO:3. La actividad residual de una fitasa de la invención es preferiblemente al menos un 105%, o al menos un 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, o al menos un 200% de la actividad residual de la fitasa de referencia de la SEC ID NO:2. Las siguientes sustituciones son particularmente preferidas puesto que éstas mejoran la termoestabilidad en comparación con la fitasa de la SEC ID NO:3 así como con la fitasa de la SEC ID NO:2 (véase la Tabla 3): 4P, 5P, 111P, 1*, 1*/2*, 1*/2*/3*, 273L, y/o 286Q.

[0064] La termoestabilidad puede también ser determinada como se describe en el Ejemplo 8. Por consiguiente, en una forma de realización preferida, una fitasa de la invención tiene una actividad residual que es superior a la actividad residual de una fitasa de referencia, donde la actividad residual se determina de la siguiente manera: un sobrenadante de fermentación se divide en dos partes, una parte se incuba durante 30 minutos a 60°C, y la otra parte durante 30 minutos a 5°C, tras lo cual la actividad de ambas se determina en el p-nitrofenil fosfato a 37°C y pH 5,5, y la actividad de la muestra incubada a una temperatura elevada se divide por la actividad de la misma muestra incubada a 5°C. Si se desea, las muestras con enzimas se pueden diluir en 0,1M de NaAc pH 5,5, opcionalmente incluyendo 0,005% de Tween-20. La fitasa y la fitasa de referencia se puede expresar en una cepa huésped de *Bacillus subtilis*. La cepa huésped puede ser cultivada en 100ml de PS1 medio (100g/L de sacarosa, 40g/L de copos de soja, 10g/L de Na₂HPO₄·12H₂O, 0,1ml/L de Dowfax 63N10 (Dow)) en frascos de agitación de 500ml durante cuatro días a 30°C a 300 r.p.m. La actividad residual de una fitasa es preferiblemente al menos un 32%, o al menos un 34%, 36%, 38%, o al menos un 40% de la actividad residual de la fitasa de referencia de la SEC ID NO:2. Más preferiblemente, la actividad residual de una fitasa de la invención es al menos un 50%, o al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, o al menos un 100% de la actividad residual de la fitasa de referencia de la SEC ID NO:2. Incluso más preferiblemente la actividad residual de una fitasa es al menos un 120%, 140%, 160%, 180%, o al menos un 200% de la actividad residual de la fitasa de referencia de la SEC ID NO:2. Más preferiblemente, la actividad residual de una fitasa es al menos 2x, o al menos 3x, 4x, o al menos 5x la actividad residual de la fitasa de referencia de la SEC ID NO:2. Las siguientes sustituciones son particularmente preferidas (véase la Tabla 5):

(i) 409E, 136P;

(ii) 411 K, 331 K/55D, 167Q, 179K/180T/181D/182K/183L/184*/185*/186*, 107E;

(iii) 196Q, 276R, 285G, 299L, 200K;

- (iv) 119R, 121D, 107D, 179K/180E/181K/182H/183Q/184*/185*/186*;
- (v) 314N, 161 P, 410D, 141C, 179K/180E/181K/182Q/183Q/184*/185*/186*, 285N;
- (vi) 164E, 411 R, 52C, 137P, 314G;
- (vii) 1K, 1*/2*/3*, 121T, 406A, 82E, 109A;
- 5 (viii) 5P, 57Y, 379R, 1*/2*;
- (ix) 410E, 1*, 119K, 52E;
- (x) 4P, 362K, 202N, 276K, 385D;
- (xi) 111P/241Q, 162C, 179K/180E/181K/182K/183V/184*/185*/186*, 241Q;
- (xii) 223E, 286Q, 107G, 114T/115Q/116A/117D/118T/119S/120S/121P/122D/123P/124L, 379K, 273L;
- 10 (xiii) 31C, 53V, 59C/100C;
- (xiv) 46E, 111 P, 114T/115Q/116T/117D/118T/119S/120S/121 P/122D/123P/124L, 76G, 362R;
- (xv) 141C/199C, 52C/99C.

15 [0065] La termoestabilidad puede también ser determinada como se describe en el Ejemplo 9, es decir, usando mediciones de calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) para determinar la temperatura de desnaturalización, Td, de la proteína de fitasa purificada. La Td es indicativa de la termoestabilidad de la proteína: cuanto más alta sea la Td, más alta será la termoestabilidad. Por consiguiente, una fitasa tiene una Td que es superior a la Td de una fitasa de referencia, donde la Td se determina en muestras de fitasa purificada (preferiblemente con una pureza de al menos el 95%, determinada por SDS-PAGE), después de la diálisis en 20mM de Na-acetato pH 4,0 (preferiblemente en un paso de 2-3 h seguido de un sobre paso de noche), seguido de 0,45um de filtración y dilución con tampón de diálisis para una concentración de proteína correspondiente a aproximadamente 2 unidades de absorbancia (A₂₈₀), aplicando calorimetría diferencial de barrido a una tasa de barrido de 90°C/h de 20-90°C en 20 mM de tampón de Na-acetato, pH 4,0. La Td de la fitasa es superior a la Td de la fitasa de la SEC ID NO:4. Las mediciones por calorimetría diferencial de barrido se pueden también realizar como se describe en el Ejemplo 1 ("mediciones DSC"), o Ejemplo 2 ("Termoestabilidad por DSC").

20 [0066] La termoestabilidad puede también ser determinada como se describe en el Ejemplo 12. Por consiguiente, la fitasa, tras la incubación durante 60 minutos a 70°C y pH 4,0, tiene una actividad residual mejorada en comparación con la actividad residual de una fitasa de referencia tratada de la misma manera, siendo calculada la actividad residual para cada fitasa en relación a la actividad encontrada antes de la incubación (a 0 minutos). La actividad residual es medida preferiblemente en fitato de sodio a pH 5.5 y 37°C. La incubación es preferible en 0,1 M de acetato sódico, pH 4,0. La fitasa es preferiblemente purificada, más preferiblemente a una pureza de al menos un 95%, determinada por SDS-PAGE. Un tampón de ensayo de actividad de fitasa preferida es 0,25 M de Na-acetato pH 5,5. Usando este método, la actividad residual de la fitasa es preferiblemente al menos un 105% de la actividad residual de la fitasa de referencia, más preferiblemente al menos 110%, 115%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, o al menos un 200%. En la alternativa, la actividad residual relativa a la actividad a 0 minutos es preferiblemente al menos un 31%, o al menos un 32%. Se prefieren las siguientes sustituciones que proporcionan una termoestabilidad mejorada (véase la Tabla 9): 273L, 46E, 362R, y/o 53V.

35 [0067] En una forma de realización particular, la variante de fitasa de la invención es más termoestable que la fitasa de referencia, donde la termoestabilidad es determinada usando cualquiera de las cuatro pruebas mencionadas anteriormente (basadas en los Ejemplos 1, 5, 8, 9, o 12).

40 [0068] En formas de realización particulares, una termoestabilidad mejorada se espera de las siguientes variantes de la fitasa de la SEC ID NO:2 (en orden de preferencia, dentro de cada agrupamiento):

- (i) K141C/V199C, Q91C/W46C, G52C/A99C, N31C/E176C, N31C/T177C, G59C/F100C, S162C/S247C;
- (ii) T137P, S161P, N4P, G5P;
- (iii) G52E, E57Y, K107D,G, Q109A, T76G, N121T, I362K, M273L, E285G, N286Q, E331K/V55D;
- 50 (iv) E1*, E1*/E2*, E1*/E2*/Q3*;
- (v) sustitución del bucle comprendido entre C178 y C187 con bucles más cortos seleccionados de, por ejemplo, KEKHQ, KEKQQ, KEKKV, KTDKL;
- (vi) E119R,K, E411R,K
- (vii) K107E, R164E;
- 55 (viii) I362R,K, T276R,K, I379R,K, Q223E, N385D, T410D,e, Q82E.
- (ix) sustitución del bucle entre residuos 114 y 124 (YQKDEEKNDPL) que se enfrenta al sitio activo con un bucle seleccionado de, por ejemplo, TQADTSSPDPL, TQTDTSPPDPL.

Perfil de temperatura

60 [0069] Tanto si una fitasa de la invención tiene o no un perfil de temperatura modificada en comparación con una fitasa de referencia se puede determinar como se describe en el Ejemplo 10. Por consiguiente, una fitasa tiene un perfil de temperatura modificada en comparación con una fitasa de referencia, donde el perfil de temperatura se determina como actividad de fitasa como una función de temperatura en el fitato de sodio a pH 5,5 en el intervalo de temperatura de 20-90°C (en pasos de 10°C). Un tampón preferido es en un tampón de 0,25 M de Na-acetato pH 5,5. La actividad a cada temperatura es indicada preferiblemente como actividad relativa (en %) normalizada al valor a

temperatura óptima. La temperatura óptima es la temperatura dentro de las temperaturas evaluadas (es decir, aquellas con saltos de 10°C) donde la actividad es máxima.

5 [0070] Una fitasa puede tener una actividad relativa a 70°C de al menos un 18%, o al menos un 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, o al menos un 25%. Como se ha explicado anteriormente, esto es relativo a la actividad a la temperatura óptima. Más preferiblemente, la fitasa tiene una actividad relativa a 70°C de al menos un 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, o al menos un 32%. Las sustituciones preferidas que proporcionan un perfil de temperatura modificada (en la forma de una actividad relativa mayor a 70°C) son (véase la Tabla 7): 57Y, 76G, 107G, 273L, 362K, 46E, 362R, 53V, y/o 241Q. Su actividad relativa a 70°C es más elevada en comparación con la fitasa de referencia de la SEC ID NO:3 y 4, y en algunos casos (57Y, 76G, 107G, 273L, 362K, 362R, y/o 53V) también en comparación con la fitasa de referencia de la SEC ID NO:2.

Perfil de pH

15 [0071] Tanto si una fitasa de la invención tiene o no un perfil de pH modificado en comparación con una fitasa de referencia se puede determinar como se describe en el Ejemplo 11. Por consiguiente, una fitasa tiene un perfil de pH modificado en comparación con una fitasa de referencia, donde el perfil de pH se determina como actividad de fitasa como una función de pH en fitato de sodio a 37°C en el intervalo pH de 2,0 a 7,5 (en pasos de unidad de pH de 0,5). Un tampón preferido es un cóctel de 50mM de glicina, 50mM de ácido acético y 50mM de Bis-Tris. Otro tampón preferido es 0,25M de acetato sódico. La actividad en cada pH es indicada preferiblemente como actividad relativa (en %) normalizada al valor de pH óptimo.

20 [0072] Un ejemplo de un perfil de pH modificado es donde la curva del pH (actividad relativa como función de pH) se desplaza hacia un pH más alto, o más bajo. Las sustituciones preferidas que proporcionan un cambio de 0,5 unidades de pH a un pH más alto en comparación con la fitasa de referencia de la SEC ID NO:2, 3 o 4 son (véase la Tabla 8): 46E, y/o 218Q.

30 [0073] Otro ejemplo de un perfil de pH modificado es donde el pH óptimo es cambiado, en dirección hacia arriba o hacia abajo. Las sustituciones preferidas que proporcionan un pH óptimo inferior en comparación con la SEC ID NO:2, 3, y 4 son (véase la Tabla 8): 46E, 121 D, y/o 200K. Las sustituciones preferidas que proporcionan un pH óptimo más elevado en comparación con la SEC ID NO:2,3, y 4 son (véase la Tabla 8): 218Q, y/o 241Q.

35 [0074] Un perfil de pH modificado puede también ser determinado como se describe en el Ejemplo 1 ("Perfil de pH modificado: Determinación de pH 3,5/5,5 de proporción de actividad), a saber, comparando la actividad de fosfatasa a pH 3,5 y 5,5. Alternativamente, la actividad a pH 3,5 se puede comparar con la actividad a pH 4,0; 4,5; o 5,0. En todavía otra alternativa, las actividades de fitasa se comparan en lugar de actividades de fosfatasa.

40 [0075] Una fitasa puede tener un perfil de pH modificado en comparación con una fitasa de referencia. Más en particular, el perfil de pH se modifica en el rango de pH de 3,5-5,5. Todavía más en particular, la actividad a pH 4,0; 4,5; 5,0 y/o 5,5 está a un nivel de al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o al menos un 95% de la actividad al pH óptimo (pH 3,5).

45 [0076] El perfil de pH, así como el pH óptimo, de un polipéptido se puede determinar incubándolo a varios valores de pH, usando un sustrato en una concentración predeterminada y una temperatura de incubación fija. El perfil de pH es una representación gráfica de la actividad de fitasa frente al pH, el pH óptimo es determinado a partir del perfil de pH. En una forma de realización particular, se usa el ensayo de fosfatasa o fitasa del Ejemplo 1, p. ej., el sustrato es 5mM de fitato de sodio, la temperatura de reacción 37°C, y la actividad se determina a varios valores de pH, por ejemplo pH 2-12, reemplazando el tampón de acetato de pH 5.5 por un tampón adecuado. Ejemplos de tampones adecuados son: 0,1 M de glicina/HCl (pH 2,0-3,5), 0,1 M de NaAc/Ac (pH 4,0-5,0), 0,1 M de Bis-Tris/HCl (pH 5,5-6,5), 0,1 M Tris/HCl (pH 7,0). Otros ejemplos de tampones son: 100mM de ácido succínico, 100mM de HEPES, 100mM de CHES, 100mM de CABS ajustados a valores de pH 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0; y 12,0 con HCl o NaOH.

55 [0077] En formas de realización particulares, un perfil de pH modificado se espera de las siguientes variantes de la fitasa de la SEC ID NO:2 (en orden de preferencia, dentro de cada agrupación):

(i) E218Q, N121D, E196Q, D202N, E406A, E167Q, E53V, E241Q, D314N,G, E285N;

(ii) sustitución del bucle entre residuos 114 y 124 (YQKDEEKNDPL) que se enfrenta al sitio activo con un bucle seleccionado de, por ejemplo, TQADTSSPDPL, TQTDTSSPDPL.

60

Actividad específica

65 [0078] Una fitasa puede tener una actividad específica mejorada en relación a una fitasa de referencia. Más en particular, la actividad específica de una fitasa es al menos un 105%, en relación a la actividad específica de una fitasa de referencia determinada por el mismo procedimiento. La actividad específica relativa es al menos 110, 115,

120, 125, 130, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 350 o incluso un 400%, todavía en relación a la actividad específica de la fitasa de referencia como se determina mediante el mismo procedimiento.

[0079] En la alternativa, el término actividad específica alta se refiere a una actividad específica de al menos 200 FYT/mg de proteína enzimática (PE). La actividad específica es al menos 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 o 3000 FYT/mg de PE.

[0080] La actividad específica se mide en muestras altamente purificadas (un gel de poliacrilamida SDS debería mostrar la presencia de un único componente). La concentración de proteína enzimática se puede determinar por análisis de aminoácido, y la actividad de fitasa en las unidades de FYT, determinada como se describe en el Ejemplo 1. La actividad específica es una característica de la variante de fitasa específica en cuestión, y se calcula como la actividad de fitasa medida en unidades FYT por mg de proteína enzimática de variante de fitasa. Véase el Ejemplo 7 para más detalles.

[0081] Una actividad específica modificada se espera de las siguientes variantes de la fitasa de la SEC ID NO:2, en la que, en orden de preferencia, el bucle entre residuos los 114 y 124 (YQKDEEKNDPL) que se enfrenta al sitio activo es sustituido por un bucle seleccionado de, p.ej., TQADTSSPDPL, TQTDTSSPDPL.

Rendimiento en alimento para animales

[0082] En una forma de realización particular, la fitasa de la invención tiene un rendimiento mejorado en el alimento para animales en comparación con una fitasa de referencia. El rendimiento en el alimento para animales se puede determinar por el modelo *in vitro* del Ejemplo 6. Por consiguiente, en una forma de realización preferida, la fitasa de la invención tiene un rendimiento mejorado en el alimento para animales, donde el rendimiento se determina en un modelo *in vitro*, preparando muestras de alimento compuestas por un 30% de soja triturada y 70% de harina de maíz con CaCl₂ añadido a una concentración de 5 g de calcio por kg de alimento; preincubándolos a 40°C y pH 3,0 durante 30 minutos seguidos de adición de pepsina (3000 U/g de alimento) y fitasa; incubando las muestras a 40°C y pH 3,0 durante 60 minutos seguidos de pH 4,0 durante 30 minutos; parando las reacciones; extrayendo ácido fítico y inositol fosfatos mediante adición de HCl a una concentración final de 0,5M e incubación a 40°C durante 2 horas, seguido de un ciclo de congelación-descongelación y 1 hora de incubación a 40°C; separando ácido fítico y inositol fosfatos mediante cromatografía iónica de alto rendimiento; determinando la cantidad de fósforo de fitato residual (IP6-P); calculando la diferencia en IP6-P residual entre la fitasa tratada y una muestra en blanco de una fitasa no tratada (esta diferencia es IP6-P degradado); y expresando el IP6-P degradado de la fitasa de la invención relativo al IP6-P degradado de la fitasa de referencia (p.ej., las fitasas con la SEC ID NO:3 y 4).

[0083] La fitasa de la invención y la fitasa de referencia son, por supuesto, dosificadas en la misma cantidad, preferiblemente en base a unidades de actividad de fitasa (FYT). Una dosificación preferida es 125 FYT/kg de alimento. Otra dosificación preferida es 250 FYT/kg de alimento. Las fitasas se pueden dosificar en la forma de fitasas purificadas, o en la forma de sobrenadantes de fermentación. Las fitasas purificadas tienen preferiblemente una pureza de al menos un 95%, como se determina mediante SDS-PAGE.

[0084] En formas de realización preferidas, el valor de IP6-P degradado de la fitasa purificada de la invención, en relación al valor IP6-P degradado de la fitasa de referencia, es al menos 101%, o al menos 102%, 103%, 104%, 105%, 110%, 115%, o al menos 120%. En todavía más formas de realización preferidas, el valor IP6-P degradado de la fitasa purificada de la invención, en relación al valor IP6-P degradado de la fitasa de referencia, es al menos 125%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, o al menos 200%. Preferiblemente, el valor IP6-P degradado de la fitasa de la invención, en relación al valor degradado IP6-P de la fitasa de la SEC ID NO:2, es al menos un 105%, 110%, 113%, 115%, 120%, 125%, o al menos un 130%.

[0085] Las siguientes sustituciones proporcionan un rendimiento *in vitro* en el alimento para animales mejorado o al menos tan bueno como (ver tabla 4A) en comparación con la fitasa de la SEC ID NO:3: 4P, 5P, 111 P, 1*, 1*/2*, 1*/2*/3*, 273L, 286Q.

[0086] Las siguientes sustituciones también proporcionan un rendimiento *in vitro* en el alimento para animales mejorado o al menos tan bueno como (ver tabla 4B) en comparación con la fitasa de la SEC ID NO:3: 57Y, 76G, 107G, 362K, 362R, 121D, 196Q, 200K, 202N, 314N, 406A, y 114T/115Q/116A/117D/118TI119S/120S/121P/122D/123P/124L.

[0087] Las sustituciones incluso más preferidas en lo que se refiere al rendimiento de alimento para animales son 57Y, 76G, 362K, 362R, 121 D, 196Q, 200K, 202N, y 406A.

[0088] El rendimiento relativo de una fitasa de la invención puede también ser calculado como el porcentaje del fósforo liberado por la fitasa de referencia.

[0089] En otra forma de realización particular, el rendimiento relativo de la fitasa de la invención se puede calcular como el porcentaje del fósforo liberado por la fitasa de la invención, relativo a la cantidad de fósforo liberado por la fitasa de referencia.

5 [0090] El rendimiento relativo de la fitasa es al menos 105%, preferiblemente al menos 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, o al menos 200%.

Modelo de glicosilación

10 [0091] La glicosilación es un fenómeno que sólo se observa cuando las proteínas se expresan en eucariotas tales como hongos y plantas transgénicas, pero no en procariotas tales como bacterias. Hay varios tipos de glicosilación, pero en el presente contexto el más pertinente es la N-glicosilación, es decir la glicosilación ligada a asparagina donde los azúcares se unen a una proteína, empezando por una molécula de N-acetilglucosamina unida a asparaginas. Se ha descubierto que la N-glicosilación sólo tiene lugar en asparaginas que en la secuencia son parte
15 de los siguientes tripéptidos: N-X-T o N-X-S, donde X designa cualquier aminoácido.

[0092] Sorprendentemente, se observó una termoestabilidad inferior cuando la fitasa de la SEC ID NO:2 fue expresada en el hongo (levadura) *Pichia pastoris*, en comparación a cuando fue expresada en *Bacillus subtilis*, véase el Ejemplo 2.
20

[0093] Esta observación ha conducido a la propuesta de que la termoestabilidad se puede mejorar para fitasas expresadas en hongos alterando los sitios de glicosilación potenciales.

[0094] Las variantes de fitasa con un modelo de glicosilación modificada, tendrán lugar preferiblemente en sitios de N-glicosilación modificada. La glicosilación modificada está prevista para conferir una termoestabilidad mejorada sobre la variante de fitasa, cuando se expresa en un hongo.
25

[0095] Ejemplos de fitasas son las fitasas bacterianas, p.ej. fitasas gram-negativas, tales como *E.coli* y fitasas de *Citrobacter* y variantes de las mismas, incluidas las fitasas de la presente invención al igual que las fitasas de la SEC ID NO:2, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:6, y SEC ID NO:9 de este documento. Ejemplos de huéspedes de expresión fúngica son *Pichia*, *Saccharomyces*, y especies de *Aspergillus*.
30

[0096] En particular se espera un modelo de glicosilación modificada de las fitasas siguientes (p.ej. variantes de la SEC ID NO:2), en orden de preferencia: N31T, N74A, N171T, N203T, N281H, N316D, N308A. Los siguientes están reemplazando un patrón de tipo N-X-T: N31T, N74A, N281H. Los siguientes están reemplazando un patrón de tipo N-X-S: N171T, N203T, N308A, N316D.
35

Variantes hipoalergénicas

40 [0097] En una forma de realización específica, las fitasas de la presente invención son (también) variantes hipoalergénicas, diseñadas para recurrir a una respuesta inmunológica reducida cuando es expuesta a animales, incluyendo el hombre. El término respuesta inmunológica debe ser entendido como cualquier reacción del sistema inmunológico de un animal expuesto a la variante de fitasa. Un tipo de respuesta inmunológica es una respuesta alérgica que conduce a niveles aumentados de IgE en el animal expuesto. Las variantes hipoalergénicas pueden ser preparadas usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la variante de fitasa se puede conjugar con partes de protección de fracciones poliméricas o epítopos de la variante de fitasa implicados en una respuesta inmunológica. La conjugación con polímeros puede implicar acoplamiento químico *in vitro* del polímero a la variante de fitasa, p.ej. como se describe en las publicaciones WO 96/17929, WO 98/30682, WO 98/35026, y/o WO 99/00489. La conjugación puede además o alternativamente a estos implicar un acoplamiento *in vivo* de polímeros a la variante de fitasa. Tal conjugación se puede conseguir por ingeniería genética de la secuencia de nucleótidos que codifica la variante de fitasa, insertando secuencias de consenso que codifican sitios de glicosilación adicional en la variante de fitasa y expresando la variante de fitasa en un huésped capaz de glicosilar la variante de fitasa, véase p.ej. la publicación WO 00/26354. Otro modo de proporcionar variantes hipoalergénicas es la ingeniería genética de la secuencia de nucleótidos que codifican la variante de fitasa para provocar que las variantes de fitasa se auto-oligomericen, logrando que los monómeros de variante de fitasa puedan proteger los epítopos de otros monómeros de variante de fitasa y así reducir la antigenicidad de los oligómeros. Tales productos y su preparación se describen p.ej. en la publicación WO 96/16177. Los epítopos implicados en una respuesta inmunológica se pueden identificar por varios métodos tales como el método de visualización de fago descrito en las publicaciones WO 00/26230 y WO 01/83559, o el enfoque aleatorio descrito en la publicación EP 561907. Una vez que un epítipo ha sido identificado, su secuencia de aminoácidos se puede alterar para producir propiedades inmunológicas alteradas de la variante de fitasa mediante conocidas técnicas de manipulación de genes tales como mutagénesis de sitio dirigido (véase p.ej. las publicaciones WO 00/26230, WO 00/26354 y/o WO 00/22103) y/o la conjugación de un polímero puede realizarse con proximidad suficiente al epítipo para que el polímero proteja al epítipo.
50
55
60
65

Secuencias de ácidos nucleicos y constructos

[0098] La presente invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de fitasa de la invención.

[0099] El término "secuencia de ácido nucleico aislada" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que está esencialmente libre de otras secuencias de ácidos nucleicos, p.ej., al menos aproximadamente un 20% puro, preferiblemente al menos aproximadamente un 40% puro, más preferiblemente al menos aproximadamente un 60% puro, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 80% puro, y de la forma más preferible al menos aproximadamente un 90% puro como se determina por electroforesis de agarosa. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos aislada se puede obtener por procedimientos de clonación estándar usados en ingeniería genética para desplazar la secuencia de ácidos nucleicos de su ubicación natural a un sitio diferente donde ésta será reproducida. Los procedimientos de clonación pueden implicar escisión y aislamiento de un fragmento de ácido nucleico deseado comprendiendo la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido, la inserción del fragmento en una molécula de vector, y la incorporación del vector recombinante en una célula huésped donde múltiples copias o clones de la secuencia de ácidos nucleicos serán duplicadas. La secuencia de ácidos nucleicos puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

[0100] Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar introduciendo al menos una mutación en una secuencia codificante de fitasa de molde o una subsecuencia de la misma, donde la secuencia mutante de ácidos nucleicos codifica una fitasa variante. La introducción de una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos para intercambiar un nucleótido por otro nucleótido se puede realizar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, p.ej. por mutagénesis de sitio dirigido, por mutagénesis aleatoria, o por mutagénesis dopada, adicionada, o aleatoria localizada.

[0101] La mutagénesis aleatoria se realiza adecuadamente ya sea como mutagénesis localizada o aleatoria en una región específica en al menos tres partes del gen traduciendo a la secuencia de aminoácidos mostrada en cuestión, o en el gen entero. Cuando la mutagénesis se realiza por el uso de un oligonucleótido, el oligonucleótido puede ser dopado o adicionado con los tres nucleótidos no progenitores durante la síntesis del oligonucleótido en las posiciones que deben ser cambiadas. El dopaje o adicionado se puede realizar de modo que se eviten codones para aminoácidos indeseados. El oligonucleótido dopado o adicionado se puede incorporar al ADN que codifica la enzima de fitasa mediante cualquier técnica, usando, p.ej., PCR, LCR o cualquier polimerasa y ligasa de ADN según se estime oportuno.

[0102] Preferiblemente, el dopaje se realiza usando un "dopaje aleatorio constante", en el que el porcentaje de tipo salvaje y mutación en cada posición está predefinido. Además, el dopaje puede ser dirigido hacia una preferencia para la introducción de determinados nucleótidos, y así una preferencia para la introducción de uno o más residuos de aminoácidos específicos. El dopaje se puede realizar, p.ej., para permitir la introducción de un 90% de tipo salvaje y un 10% de mutaciones en cada posición. Una consideración adicional en la elección de un esquema de impurificación se basa en limitaciones genéticas así como estructurales de proteínas.

[0103] La mutagénesis aleatoria puede ser localizada de manera ventajosa en una parte de la fitasa progenitora en cuestión. Esto puede, p.ej., ser ventajoso cuando determinadas regiones de la enzima han sido identificadas por ser de especial importancia para una propiedad dada de la enzima.

[0104] Los métodos alternativos para suministrar variantes de la invención incluyen transposición de genes p.ej. como se describe en la publicación WO 95/22625 o en la publicación WO 96/00343, y el proceso de derivación de consenso como se describe en la publicación EP 897985.

Constructos de ácido nucleico

[0105] Un constructo de ácidos nucleicos comprende una secuencia de ácido nucleico de la presente invención enlazada de manera operativa a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. La expresión se entiende que incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional, y secreción.

[0106] El término "constructo de ácidos nucleicos" como se utiliza en este documento se refiere a una molécula de ácido nucleico, mono- o bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de un modo tal que si no fuera así no existirían en la naturaleza. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0107] El término "control de secuencias" está definido en este documento para incluir todos los componentes, que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o extranjera a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, secuencia de poliadenilación,

secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal, y terminador de transcripción. En un mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlaces con la intención de introducir sitios de restricción específicos facilitando ligación de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

[0108] El término "enlazado de manera operativa" denota en este documento una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada en relación a la secuencia codificante de la secuencia polinucleótida de manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

[0109] Cuando se usa aquí el término "secuencia codificante" (CDS) significa una secuencia de nucleótidos, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los límites de la secuencia codificante son generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que inicia normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG. La secuencia codificante puede ser una secuencia ADN, ADNc, o secuencia de nucleótidos recombinante

Vector de expresión

[0110] El término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero no de manera limitativa, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional, y secreción.

[0111] El término "vector de expresión" se define en este documento como una molécula lineal o circular de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención, y que está operativamente enlazado a nucleótidos adicionales que proveen a su expresión.

[0112] Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una variante de fitasa de la invención puede ser expresada usando un vector de expresión que incluye típicamente secuencias de control que codifican un promotor, operador, sitio de unión al ribosoma, señal de iniciación de traducción, y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores.

[0113] El vector de expresión recombinante que lleva la secuencia de ADN que codifica una variante de fitasa de la invención puede ser cualquier vector que pueda ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección de vector dependerá frecuentemente de la célula huésped en la cual ha de ser introducida. El vector puede ser uno que, cuando está introducido en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se duplica junto con el(los) cromosoma(s) en el(los) cual(es) ha sido integrado.

[0114] La variante de fitasa puede también ser coexpresada junto con al menos otra enzima de interés de alimento para animales, tal como una fitasa, fosfatasa, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasa, fosfolipasa, amilasa, y/o beta-glucanasas. Las enzimas se pueden coexpresar desde distintos vectores, desde un vector, o usando una mezcla de ambas técnicas. Cuando se usan vectores diferentes, los vectores pueden tener marcadores seleccionables diferentes, y orígenes diferentes de replicación. Cuando se usa solo un vector, los genes se pueden expresar a partir de uno o más promotores. Si se clona bajo la regulación de un promotor (di- o multicistrónico), el orden en que los genes son clonados puede afectar los niveles de expresión de las proteínas. La variante de fitasa puede también ser expresada como una proteína de fusión, es decir que el gen que codifica la variante de fitasa ha sido fusionado en el marco del gen que codifica otra proteína. Esta proteína puede ser otra enzima o un dominio funcional de otra enzima.

Células huésped

[0115] El término "célula huésped", como se utiliza en este documento, incluye cualquier tipo de célula que sea susceptible de transformación, transfección, transducción, y similares con un constructo de ácidos nucleicos que comprendan un polinucleótido de la presente invención.

[0116] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención, que es usado ventajosamente en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico que se duplica como se describe anteriormente. El término "célula huésped" engloba cualquier progenie de una célula progenitora que no sea idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

[0117] La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, p.ej., un procarionta, o un microorganismo no unicelular, p.ej., un eucariota.

[0118] Los microorganismos unicelulares útiles son células bacterianas tales como bacterias gram positivas incluyendo, pero no de manera limitada, una célula de *Bacillus*, p.ej., *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*; o una célula de *Streptomyces*, p.ej., *Streptomyces lividans* y *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas tales como *E. Coli* y *Pseudomonas sp.* En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es un *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, o célula de *Bacillus subtilis*. En otro aspecto preferido, la célula de *Bacillus* es un *Bacillus* alcalofílico.

[0119] La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana puede, por ejemplo, ser efectuada mediante transformación de protoplasto (véase, p.ej., Chang y Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111-115), usando células competentes (véase, p.ej., Young y Spizizin, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221), electroporación (véase, p. ej., Shigekawa y Downen, 1988 Biotécnicas 6: 742-751), o conjugación (véase, p. ej., Koehler y Torne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5771-5278).

[0120] La célula huésped puede también ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta, o fúngica.

[0121] En un aspecto preferido, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongos" como se utiliza en este documento incluye la *phyla Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, y *Zygomycota* (como es definido por Hawksworth et al., en, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB Internacional, University Press, Cambridge, Reino Unido) así como también la *Oomycota* (como se cita en Hawksworth et al., 1995, supra, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth et al., 1995, supra).

[0122] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este documento incluye levadura ascospogénea (Endomycetales), levadura basidiosporogénea, y levadura perteneciente a los hongos imperfectos (Blastomycetes). Puesto que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe ser definida como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M., y Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Serie de simposio n°. 9, 1980).

[0123] En un aspecto aún más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*.

[0124] En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula *Kluyveromyces lactis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

[0125] En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula fúngica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (según es definido por Hawksworth et al., 1995, supra). Los hongos filamentosos están generalmente caracterizados por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por elongación hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0126] En un aspecto aún más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyptocladium*, *Trametes*, o *Trichoderma*.

[0127] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, o *Fusarium venenatum*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de la cepa *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, o *Ceriporiopsis subvermispura*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*,

Phanerochaete chrysosporium, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

5 [0128] Las células fúngicas se pueden transformar mediante un proceso que implica la formación de protoplasto, la transformación de los protoplastos, y la regeneración de la pared celular en un modo conocido per se. Los procedimientos adecuados para la transformación de las células huéspedes *Aspergillus* y *Trichoderma* están descritos en la publicación EP 238 023 y Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474. Los métodos adecuados para la transformación de especies de *Fusarium* son descritos por Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156, y WO 96/00787. La levadura puede ser transformada usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, volumen 194, págs 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

15 **Métodos de producción**

[0129] La presente invención también se refiere a métodos para producir una fitasa de la presente invención que comprende (a) cultivo de una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción de la fitasa; y (b) recuperación de la fitasa.

25 [0130] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción de los polipéptidos usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación, y fermentación a gran o pequeña escala (incluyendo fermentaciones continuas de lote, lote alimentado o en estado sólido) en el laboratorio o fermentadores industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan al polipéptido ser expresado y/o aislado. El cultivo se desarrolla en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Hay disponibles medios adecuados de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (p.ej., en catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido es secretado en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no es secretado, se puede recuperar de lisatos celulares.

35 [0131] El polipéptido resultante puede ser recuperado usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede ser recuperado del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero no de manera limitada, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación.

40 [0132] Los polipéptidos de la presente invención se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no de manera limitada, cromatografía (p.ej., intercambio iónico, afinidad, hidrofóbico, cromatoenfoco, y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p.ej., enfoque isoeléctrico preparativo), solubilidad diferencial (p.ej., precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (véase, p.ej., Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Riden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

Plantas transgénicas

45 [0133] La presente invención también se refiere a una planta transgénica, parte de planta, o célula vegetal que ha sido transformada con una secuencia nucleótida que codifica un polipéptido con actividad de fitasa de la presente invención para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido se puede recuperar de la planta o parte de planta. Alternativamente, la planta o parte de planta con el polipéptido recombinante se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, p.ej., mejorando el valor nutricional, palatabilidad, y propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

55 [0134] En una realización particular, el polipéptido se dirige a las vacuolas de almacenamiento de endospermo en semillas. Esto se puede obtener sintetizándolo como un precursor con un péptido señal adecuado, véase Horvath et al. en PNAS, Feb. 15, 2000, vol. 97, n°. 4, p. 1914-1919.

60 [0135] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicota) o monocotiledónea (una monocota) o variantes creadas genéticamente a partir de las mismas. Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, tales como césped de pradera (poa pratense, Poa), hierba forrajera tales como *Festuca*, *Lolium*, hierba templada, tal como *Agrostis*, y cereales, p.ej., trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, triticale (híbrido estabilizado de trigo (*Triticum*) y centeno (*Secale*), y maíz (grano). Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, leguminosas, tales como girasol (*Heliantus*), algodón (*Gossipium*), altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, haba y semilla de soja, y plantas crucíferas (familia *Brassicaceae*), tales como coliflor, semilla de colza, y la *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo estrechamente relacionado. Plantas de bajo fitato como se describen p.ej. en la patente estadounidense N° 5,689,054 y en la patente estadounidense N° 6,111,168 son ejemplos de plantas creadas genéticamente.

65

[0136] Ejemplos de partes de planta son vástago, callo, hojas, raíz, frutas, semillas, y tubérculos, al igual que los tejidos individuales que comprenden estas partes, p.ej. epidermis, mesófilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas. También los compartimentos de célula vegetal específicos, tales como cloroplasto, apoplasto, mitocondria, vacuola, peroxisomas, y citoplasma se consideran una parte de planta. Además, cualquier célula vegetal, sea cual sea el origen del tejido, se considera una parte de planta. Asimismo, partes de planta tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la invención también son consideradas partes de planta, p.ej. embriones, endospermas, aleurona y revestimientos de semilla.

[0137] También incluido dentro del campo de la presente invención se encuentra la progenie de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

[0138] La planta transgénica o célula vegetal expresando un polipéptido de la presente invención se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. Brevemente, la planta o célula vegetal se construye incorporando uno o más constructos de expresión que codifican un polipéptido de la presente invención en el genoma de la planta huésped y propagan la planta o célula vegetal modificada resultante en una planta transgénica o célula vegetal.

[0139] Convenientemente, el constructo de expresión es un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de la presente invención operativamente enlazado con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en la planta o parte de planta de elección. Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable útil para identificar células huésped en las que se ha integrado el constructo de expresión y secuencias de ADN necesario para la introducción del constructo en la planta en cuestión (ésto último depende del método de introducción del ADN a aplicar).

[0140] La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias de promotor y terminador y opcionalmente secuencias señal o de tránsito son determinadas, por ejemplo, en base a cuándo, dónde, y cómo se desea expresar el polipéptido. Por ejemplo, la expresión de los genes que codifican un polipéptido de la presente invención puede ser constitutiva o inducible, o puede ser desarrollable, específica de fase o tejido, y el producto genético puede estar dirigido a un compartimento específico de célula, tejido o parte de planta tales como semillas u hojas. Las secuencias reguladoras se encuentran descritas, por ejemplo por Tague et al., 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

[0141] Para expresión constitutiva, se pueden utilizar los siguientes promotores: el promotor 35S-CaMV (Franck et al., 1980, *Cell* 21: 285-294), la ubiquitina de maíz 1 (Christensen AH, Sharrock RA y Quail 1992. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation), o el promotor de actina de arroz 1 (*Plant Mo. Biol.* 18, 675-689.; Zhang W, McElroi D. y Wu R 1991, Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants. *Plant Cell* 3, 1155-1165). Promotores específicos de un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata, y frutas (Edwards & Coruzzi, 1990, *Ana. Rev. Genet.* 24: 275-303), o de tejidos sumideros metabólicos tales como meristemas (Ito et al., 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), un promotor específico de semilla tal como la glutelina, prolamina, globulina, o promotor de albúmina de arroz (Wu et al., 1998, *Plant and Physiology Cell* 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* de la legúmina B4 y los genes de proteína de semilla desconocida de *Vicia faba* (Conrado et al., 1998, *Journal of Plant Physiology* 152: 708-711), un promotor de una proteína de cuerpo de aceite de semilla (Chen et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 935-941), el promotor de la proteína de almacenamiento napA de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, p.ej., como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor RbcS de arroz o tomate (Kyojuka et al., 1993, *Plant Physiology* 102: 991-1000, el promotor del gen de metiltransferasa de adenina de virus de Chlorella (Mitra y Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93), o el promotor de gen aldP de arroz (Kagaya et al., 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668-674), o un promotor inducible enrollado tal como el promotor de patata pin2 (Xu et al., 1993, *Plant Molecular Biology* 22: 573-588). Asimismo, el promotor puede ser inducible mediante tratamientos abióticos tales como temperatura, sequía o alteraciones en la salinidad o inducible por sustancias exógenamente aplicadas que activan el promotor, p.ej. etanol, estrógenos, hormonas vegetales como etileno, ácido abscísico, ácido giberélico, y/o metales pesados.

[0142] Un elemento promotor intensificador puede también ser usado para conseguir una expresión más alta del polipéptido en la planta. Por ejemplo, el elemento promotor intensificador puede ser un intrón que se coloca entre el promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, Xu et al., 1993, supra revela el uso del primer intrón del gen de actina 1 de arroz para mejorar la expresión.

[0143] Aún más, el uso de codón se puede optimizar para las especies vegetales en cuestión para mejorar la expresión (véase Horvath *et al.* mencionado anteriormente).

[0144] El gen marcador seleccionable y cualquier otra parte del constructo de expresión se pueden elegir de aquellas disponibles en la técnica.

[0145] El constructo de ácidos nucleicos se incorpora en el genoma de planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada de virus,

microinyección, bombardeo de partícula, transformación biolística, y electroporación (Gasser et al., 1990, Science 244: 1293; Potrykus, 1990, Bio/Technology 8: 535; Shimamoto et al., 1989, Nature 338: 274).

[0146] Actualmente, la transferencia de genes mediados por *Agrobacterium tumefaciens* es el método de elección para generar dicotiledóneas transgénicas (para una reseña, véase Hooykas y Schilperoort, 1992, Plant Molecular Biology 19: 15-38), y esto puede también ser usado para la transformación de monocotas, aunque otros métodos de transformación son usados más frecuentemente para estas plantas. Actualmente, el método de elección para generar monocotas transgénicas, complementando el método de *Agrobacterium*, es el bombardeo de partículas (oro microscópico o partículas de tungsteno revestidas con el ADN transformador) de callos embrionarios o embriones en desarrollo (Christou, 1992, Plant Journal 2: 275-281; Shimamoto, 1994, Current Opinion Biotechnology 5: 158-162; Vasil et al., 1992, Bio/Technology 10: 667-674). Un método alternativo para la transformación de monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplasto como se describe por Omirulleh et al., 1993, Plant Molecular Biology 21: 415-428.

[0147] Después de la transformación, los transformantes que tienen incorporados constructos de expresión incorporados se seleccionan y regeneran en plantas enteras según métodos bien conocidos en la técnica. Frecuentemente el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes de selección bien durante la regeneración o en las siguientes generaciones usando, p.ej., la cotransformación con dos constructos de ADN-T separados o una escisión específica de sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

[0148] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprende (a) el cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con actividad de fitasa de la presente invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido.

Animales transgénicos

[0149] La presente invención también se refiere a un animal transgénico, no humano y productos o elementos del mismo, ejemplos de los cuales son líquidos biológicos tales como leche y sangre, órganos, carne, y células animales. Técnicas para expresar proteínas, p.ej. en células mamíferas, se conocen en la técnica, véase p.ej. el manual Protein Expression: A Practical Approach, Higgins and Hames (eds), Oxford University Press (1999), y los otros tres manuales en esta serie acerca de la transcripción genética, procesamiento del ARN, y procesamiento postraduccional. En términos generales, para preparar un animal transgénico, las células seleccionadas de un animal seleccionado se transforman en una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con actividad de fitasa de la presente invención para expresar y producir el polipéptido. El polipéptido puede ser recuperado del animal, p.ej. a partir de la leche de animales hembra, o el polipéptido se puede expresar en el beneficio del propio animal, p.ej. para ayudar a la digestión del animal. Ejemplos de animales se mencionan más abajo en la sección titulada Alimentos para animales.

[0150] Para producir un animal transgénico con el propósito de recuperar el polipéptido de la leche del animal, se puede insertar un gen que codifica el polipéptido en los óvulos fecundados de un animal en cuestión, p.ej. usando un vector de expresión transgénico que comprende un promotor de proteína de la leche adecuada, y el gen que codifica el polipéptido. El vector de expresión transgénico se microinyecta en óvulos fecundados, y preferiblemente se integra de manera permanente en el cromosoma. Una vez el óvulo comienza a crecer y a dividirse, el embrión potencial se implanta en una madre sustituta, y los animales que llevan el transgén son identificados. El animal resultante puede entonces ser multiplicado por crianza convencional. El polipéptido se puede purificar a partir de la leche del animal, véase p.ej. Meade, H.M. et al. (1999): Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals, Gene expression systems: Using nature for the art of expression. J. M. Fernández y J. P. Hoeffler (eds.), Academic Press.

[0151] En la alternativa, para producir un animal transgénico no humano que lleva en el genoma de sus células germinales y/o somáticas una secuencia de ácidos nucleicos que incluye un constructo transgénico heterólogo que incluye un transgén que codifica el polipéptido, el transgén puede estar operativamente enlazado a una primera secuencia reguladora para la expresión específica de glándula salival del polipéptido, como se describe en la publicación WO 00/064247.

Composiciones y usos

[0152] En todavía otros aspectos, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención, al igual que métodos de uso de éstas.

[0153] Las composiciones del polipéptido se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden ser en forma de un líquido o una composición seca. Por ejemplo, la composición del polipéptido puede estar en forma de granulados o microgranulados. El polipéptido que se ha de incluir en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

[0154] La fitasa de la invención se puede usar para la degradación, en cualquier contexto industrial, de, por ejemplo, fitato, ácido fítico, y/o el mono-, di-, tri-, tetra- y/o penta-fosfatos de mioinositol. Es bien conocido que las fracciones de fosfato de estos compuestos quelan cationes divalentes y trivalentes tales como iones metálicos, es decir, los iones nutricionalmente esenciales de calcio, hierro, zinc y magnesio así como el magnesio de oligoelementos, cobre y molibdeno. Además, el ácido fítico también une hasta cierto punto proteínas por interacción electrostática.

[0155] Por consiguiente, los usos preferidos de los polipéptidos de la invención son preparaciones de alimento para animales (incluida la alimentación humana) o en aditivos para preparaciones de este tipo.

[0156] En una realización particular, el polipéptido de la invención se puede usar para mejorar el valor nutricional de un alimento para animales. Ejemplos no limitativos de mejora del valor nutricional del alimento para animales (incluida la alimentación humana), son: mejorar la digestibilidad del alimento; estimular el crecimiento del animal; mejorar la utilización del alimento; mejorar la biodisponibilidad de proteínas; aumentar el nivel de fosfato digerible; mejorar la liberación y/o degradación de fitato; mejorar la biodisponibilidad de oligoelementos; mejorar la biodisponibilidad de macrominerales; eliminar la necesidad de añadir fosfato suplementario, oligoelementos, y/o macrominerales; y/o mejorar la calidad de la envoltura del óvulo. El valor nutricional del alimento es, por lo tanto, más elevado, y el índice de crecimiento y/o aumento de peso y/o conversión alimenticia (es decir, el peso del alimento ingerido en relación al aumento de peso) del animal se pueden mejorar.

[0157] Además, el polipéptido de la invención se puede usar para reducir el nivel de fitato de abono.

Animales, alimento para animales, y aditivos de alimento para animales

[0158] El término animal incluye todos los animales, seres humanos incluidos. Ejemplos de animales son rumiantes, y no rumiantes. Los animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como oveja, cabra, y ganado, p.ej., ganado vacuno y vacas lecheras. En una forma de realización particular, el animal es un animal no rumiante. Los animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, p.ej. el cerdo o el puerco (incluyendo, pero no de manera limitada, lechones, cerdos en crecimiento, y cerdas); aves de corral tales como pavos, patos y pollos (incluyendo, pero no de manera limitada, pollos de engorde, gallinas ponedoras); peces (incluyendo, pero no de manera limitada, salmón, trucha, tilapia, siluro y carpa); y crustáceos (incluyendo, pero no de manera limitada, gamba y langostino).

[0159] El término alimento o composición alimentaria significa cualquier compuesto, preparación, mezcla, o composición adecuada para, o destinada a la ingesta por parte de un animal.

[0160] En el uso según la invención, el polipéptido se puede suministrar al animal antes, después, o simultáneamente con la dieta. Se prefiere esto último.

[0161] En una forma de realización particular, el polipéptido, en la forma en la que se añade al alimento, o cuando se incluye en un aditivo alimenticio, es sustancialmente puro. En una forma de realización particular está bien definido. El término "bien definido" significa que la preparación de fitasa es al menos un 50% pura como se determina mediante cromatografía de exclusión por tamaño (véase el Ejemplo 12 de la publicación WO 01/58275). En otras formas de realización particulares, la preparación de fitasa es al menos un 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94, o al menos un 95% pura como se determina mediante este método.

[0162] Una preparación de polipéptido sustancialmente pura, y/o bien definida es ventajosa. Por ejemplo, es mucho más fácil dosificar correctamente un polipéptido al alimento que está esencialmente libre de interferir o contaminar otros polipéptidos. El término dosificar correctamente se refiere en particular al objetivo de obtener resultados consistentes y constantes, y la capacidad de optimizar la dosificación basada en el efecto deseado.

[0163] No obstante, para uso en el alimento para animales, el polipéptido de fitasa de la invención no necesita ser tan puro; puede, p.ej., incluir otros polipéptidos, en cuyo caso se podría denominar una preparación de fitasa.

[0164] La preparación de fitasa puede ser (a) añadida directamente al alimento (o usarse directamente en un proceso de tratamiento de proteínas), o (b) se puede usar en la producción de una o más composiciones intermedias tales como aditivos alimenticios o premezclas que se añaden posteriormente al alimento (o usarse en un proceso de tratamiento). El grado de pureza anteriormente descrito se refiere a la pureza de la preparación del polipéptido original, si se usa según los puntos (a) o (b) anteriores.

[0165] Las preparaciones de polipéptido con purezas de este orden de magnitud se encuentran en partículas obtenibles usando métodos recombinantes de producción, mientras que no se obtienen tan fácilmente y también están sujetas a una variación de lote a lote mucho más elevada cuando el polipéptido se produce por métodos de fermentación tradicional.

[0166] Tal preparación del polipéptido puede, por supuesto, mezclarse con otros polipéptidos.

[0167] El polipéptido se puede añadir al alimento en cualquier forma, ya sea como un polipéptido relativamente puro, o en la mezcla con otros componentes destinados a añadirse al alimento para animales, es decir, en forma de aditivos alimenticios, tales como las denominadas premezclas para alimento para animales.

5 [0168] En otro aspecto la presente invención se refiere a composiciones para su uso en el alimento para animales, tales como alimentos para animales, y aditivos para alimentos para animales, p.ej. premezclas.

[0169] Además del polipéptido de la invención, los aditivos para alimentos para animales de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina soluble en agua, y/o al menos un oligoelemento. El aditivo alimentario puede también contener al menos un macromineral.

[0170] Además, los ingredientes de aditivos de alimento opcionales son agentes colorantes, p.ej. carotenoides tales como betacaroteno, astaxantina, y luteína; compuestos de aroma; estabilizadores; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados; especias generadoras de oxígeno reactivo; y/o por lo menos otro polipéptido seleccionado de entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); fosfatasa (EC 3.1.3.1 EC 3.1.3.2 EC 3.1.3.39); xilanas (EC 3.2.1.8); galactanasa (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4.-.-), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tales como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1); y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

20 [0171] En una forma de realización particular estos otros polipéptidos están bien definidos (como se ha definido más arriba para preparaciones de fitasa).

[0172] La fitasa de la invención puede también ser combinada con otras fitasas, por ejemplo fitasas de ascomiceto tales como fitasas de *Aspergillus*, por ejemplo, derivadas de *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus niger*, o *Aspergillus awamori*; o fitasas de basidiomiceto, por ejemplo, derivadas de *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Trametes pubescens*, o *Paxillus involutus*; o derivados, fragmentos o variantes de los mismos que tienen actividad de fitasa.

[0173] Así, en formas de realización preferidas del uso en el alimento para animales de la invención, y en formas de realización preferidas del aditivo para alimentación animal y el alimento para animales de la invención, la fitasa de la invención se combina con tales fitasas.

[0174] Ejemplos de péptidos antimicrobianos (PAMs) son CAP18, leucocina A, tritripticina, protegrina-1, tanatina, defensina, lactoferrina, lactoferricina, y ovispirina tales como novispirina (Robert Lehrer, 2000), plectasinas, y estatinas, incluyendo los compuestos y polipéptidos descritos en las publicaciones WO 03/044049 y WO 03/048148, al igual que variantes o fragmentos de los anteriores que retienen actividad antimicrobiana.

[0175] Ejemplos de polipéptidos antifúngicos (PAFs) son el *Aspergillus giganteus*, y los péptidos *Aspergillus niger*, así como variantes y fragmentos de los mismos que retienen actividad antifúngica, como se ha descrito en las publicaciones WO 94/01459 y WO 02/090384.

[0176] Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos grasos poliinsaturados C18, C20 y C22, tales como ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentanoico y ácido gamma-linoleico.

[0177] Ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son sustancias químicas tales como perborato, persulfato, o percarbonato; y polipéptidos tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

[0178] Por lo general, las vitaminas grasas e hidrosolubles, así como los oligoelementos forman parte de una premezcla destinada para la adición al alimento, mientras que los macrominerales se añaden al alimento normalmente por separado. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando se enriquece con un polipéptido de la invención, es un aditivo para alimentación animal de la invención.

[0179] En una forma de realización particular, el aditivo para alimentación animal de la invención está destinado a ser incluido (o prescrito como que debe ser incluido) en dietas o alimento para animales a niveles de 0,01 a 10,0%; más particularmente 0,05 a 5,0%; o 0,2 a 1,0% (% significa g de aditivos por 100 g de alimento). Esto es así en particular para premezclas.

[0180] Las siguientes son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:

Ejemplos de vitaminas liposolubles son vitamina A, vitamina D3, vitamina E, y vitamina K, p. ej., vitamina K3.

[0181] Ejemplos de vitaminas hidrosolubles son vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, p.ej. Ca-D-pantotenato.

[0182] Ejemplos de oligoelementos son manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, selenio, y cobalto.

[0183] Ejemplos de macrominerales son calcio, fósforo y sodio.

[0184] Los requisitos nutritivos de estos componentes (ejemplificados con aves de corral y lechones/cerdos) están listados en la tabla A de la publicación WO 01/58275. Requisito nutritivo significa que estos componentes deberían proporcionarse en la dieta en las concentraciones indicadas.

5 [0185] En la alternativa, el aditivo para alimentación animal de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la Tabla A de la publicación WO 01/58275. Al menos uno significa cualquiera de, uno o más de, uno, o dos, o tres, o cuatro y así sucesivamente hasta todos los trece, o hasta todos los quince componentes individuales. Más específicamente, este al menos un componente individual se incluye en el aditivo de la invención en una cantidad tal para proporcionar una concentración en alimento en el intervalo indicado en la columna cuatro, o en la columna cinco, o en la columna seis de la Tabla A.

15 [0186] La presente invención también se refiere a composiciones de alimento para animales. Las composiciones de alimento para animales o dietas tienen un contenido relativamente alto de proteína. Las dietas de aves de corral y cerdos se pueden caracterizar como se indica en la Tabla B de la publicación WO 01/58275, columnas 2-3. Las dietas de peces se pueden caracterizar como se indica en la columna 4 de esta Tabla B. Además tales dietas de peces tienen normalmente un contenido de grasa cruda de 200-310 g/kg.

20 [0187] La publicación WO 01/58275 corresponde a la publicación US 09/779334.

[0188] Una composición de alimento para animales según la invención tiene un contenido bruto de proteína de 50-800 g/kg, y comprende además al menos un polipéptido como se reivindica en este documento.

25 [0189] Además, o en la alternativa (al contenido bruto de proteína indicado anteriormente), la composición alimentaria para animales de la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.

30 [0190] En formas de realización particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína cruda, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína, y/o lisina está dentro de uno cualquiera de los intervalos 2, 3, 4 o 5 en la Tabla B de la publicación WO 01/58275 (R. 2-5).

35 [0191] La proteína cruda se calcula como nitrógeno (N) multiplicada por un factor 6,25, es decir, proteína cruda (g/kg)= N (g/kg) x 6,25. El contenido de nitrógeno se determina por el método Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

40 [0192] La energía metabolizable puede ser calculada basándose en la publicación del NRC sobre los requisitos de nutrientes en los cerdos, novena edición revisada 1988, subcomisión para porcinos, comité de nutrición animal, consejo de agricultura, consejo nacional de investigación. National Academy Press, Washington, D.C., págs. 2-6, y la Tabla europea de valores energéticos de los alimentos para las aves, centro Spelderholt para la investigación de aves y extensión, 7361 DA Beekbergen, Países Bajos. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.

45 [0193] El contenido dietético de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en dietas completas para animales se calcula basándose en tablas de alimentos tales como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.

50 [0194] En una forma de realización particular, la composición de alimento para animales de la invención contiene al menos una proteína. La proteína puede ser una proteína animal, tales como harina de carne y huesos, y/o harina de pescado; o puede ser una proteína vegetal. El término proteínas vegetales como se utiliza en este documento se refiere a cualquier compuesto, composición, preparación o mezcla que incluya al menos una proteína derivada u originada a partir de un vegetal, incluyendo proteínas modificadas y derivados de proteína. En formas de realización particulares, el contenido de proteína de las proteínas vegetales es de al menos un 10, 20, 30, 40, 50, o un 60% (p/p).

60 [0195] Las proteínas vegetales pueden estar derivadas de fuentes de proteína vegetal, tales como legumbres y cereales, por ejemplo materiales de plantas de las familias *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Cruciferaeae*, *Chenopodiaceae*, y *Poaceae*, tales como harina de soja, harina de lupino y harina de semilla de colza.

[0196] En una forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia *Fabaceae*, p.ej. semilla de soja, altramuz, guisante, o alubia.

65 [0197] En otra forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia *Chenopodiaceae*, por ejemplo, remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinua.

[0198] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son la semilla de colza, semilla de girasol, semilla de algodón, y repollo.

5 [0199] La semilla de soja es una fuente de proteína vegetal preferida.

[0200] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son los cereales tales como cebada, trigo, centeno, avena, maíz (mazorca), arroz, triticale, y sorgo.

10 [0201] En todavía más formas de realización particulares, la composición de alimento para animales de la invención contiene un 0-80% de maíz; y/o un 0-80% de sorgo; y/o un 0-70% de trigo; y/o un 0-70% de cebada; y/o un 0-30% de avena; y/o un 0-40% de harina de soja; y/o un 0-25% de harina de pescado; y/o un 0-25% de harina de carne y hueso; y/o un 0-20% de lactosuero.

15 [0202] Las dietas para animales pueden p.ej. producirse como pienso en harina (no granulado) o pienso en gránulos. Típicamente, se mezclan los materiales alimenticios triturados se agregan cantidades suficientes de vitaminas esenciales y minerales según las especificaciones para las especies en cuestión. Los polipéptidos se pueden agregar como formulaciones de polipéptido sólidas o líquidas. Por ejemplo, una formulación de polipéptido sólida se agrega típicamente antes o durante la etapa de mezclado; y una preparación de polipéptido líquida se agrega típicamente después de la etapa de granulación. El polipéptido se puede también incorporar en forma de aditivo alimentario o premezcla.

20 [0203] La concentración de polipéptidos final en la dieta está en el intervalo de 0,01-200 mg de proteína de polipéptido por kg de dieta, por ejemplo en el intervalo de 5-30 mg de proteína de polipéptido por kg de dieta animal.

25 [0204] La fitasa de la invención debería por supuesto añadirse en una cantidad eficaz, es decir, en una cantidad adecuada para mejorar la solubilización y/o mejorar el valor nutricional del alimento. Actualmente se contempla que el polipéptido se administra en una o más de las cantidades siguientes (intervalos de dosificación): 0,01-200; 0,01-100; 0,5-100; 1-50; 5-100; 10-100; 0,05-50 ó 0,10-10 - siendo todos estos intervalos en mg de proteína de polipéptido de fitasa por kg de alimento (ppm).

30 [0205] Para determinar los mg de proteína de polipéptido de fitasa por kg de alimento, la fitasa se purifica a partir de la composición alimentaria, y la actividad específica de la fitasa purificada se determina usando un ensayo pertinente. La actividad de fitasa de la composición alimentaria como tal se determina también usando el mismo ensayo, y basándose en estas dos determinaciones, se calcula la dosificación en mg de proteína de fitasa por kg de alimento.

35 [0206] Los mismos principios se aplican para determinar los mg de proteína de polipéptido de fitasa en aditivos alimenticios. Por supuesto, si hay una muestra disponible de la fitasa usada para la preparación del aditivo para alimentación animal o el alimento, la actividad específica se determina a partir de esta muestra (sin necesidad de purificar la fitasa de la composición alimentaria o el aditivo).

Ejemplos

45 [0207] Los productos químicos usados fueron productos comerciales de al menos grado reactivo.

Ejemplo 1: Preparación de variantes, y prueba de termoestabilidad y perfil de pH

Preparación de variantes de fitasa

50 [0208] El ADN que codifica una variante de la fitasa con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:2 se genera mediante métodos conocidos en la técnica, y los constructos se fusionan por PCR al ADN que codifica el péptido señal descrito por Takami *et al.* en Biosci. Biotechnol. Biochem. 56:1455 (1992) y se integran por recombinación homóloga en el genoma de una célula huésped *Bacillus subtilis* (véase Diderichsen *et al.* (1990), J. Bacteriol., 172, 4315-4321) usando técnicas estándar. Los genes se expresan bajo el control de un sistema promotor triple (como se describe en la publicación WO 99/43835) y las proteínas de fitasa resultantes purificadas usando métodos convencionales.

Determinación de estabilidad de temperatura

60 [0209] La estabilidad de temperatura de una variante de fitasa se puede determinar de la siguiente manera: 500 microlitros de solución de proteína de la variante y de la proteína de referencia (SEC ID NO:2, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, y/o SEC ID NO:6) teniendo aproximadamente 10 microgramos de proteína por ml, y siendo disuelto en 0.1 M de tampón de Na-acetato, pH 5.5, se divide en dos partes, una parte se incuba a una temperatura deseada elevada (p.ej. 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, o 85°C) en contenedores plásticos, el otro se almacena a 5°C. Después de 30 minutos de incubación a la temperatura elevada las soluciones de proteína se transfieren a un baño

de hielo y la actividad del enfriado al igual que la muestra calentada se mide por el ensayo de fosfatasa descrito más abajo (tampón ciego sustraído). La actividad residual se define como la actividad después del tratamiento de calor dividida por la actividad de la muestra enfriada (en %). Una variante se considera que es más estable a la temperatura (termoestable) si la actividad residual en el ensayo de la fosfatasa, o fitasa, es más elevada, en comparación con la referencia.

Determinación de actividad de fosfatasa

[0210] 75 microlitros de solución enzimática con fitasa se dispensan en un pocillo de placa de microtitulación, p.ej. NUNC 269620 y se añaden 75 microlitros de sustrato (para preparar el sustrato, se disuelven dos comprimidos de 5 mg de fosfato de p-nitrofenilo (Sigma, Cat.No. N-9389) en 10 ml 0,1 M de tampón de Na-acetato, pH 5,5). La placa se sella y se incuba 15 min., agitada a 750 r.p.m. a 37°C. Después del tiempo de incubación se añaden 75 microlitros de reactivo de parada (el reactivo de parada es 0,1 M de tetraborato de sodio en agua) y la absorbancia a 405 nm se mide en un espectrofotómetro de placa de microtitulación. Una unidad de fosfatasa se define como la actividad enzimática que libera 1 micromol de fosfato/min bajo las condiciones de reacción dadas (tampón ciego sustraído). La absorbancia de 1 micromol de p-nitrofenol se determina que es 56 AU (AU= unidades de absorbancia) bajo condiciones de ensayo.

Mediciones de calorimetría diferencial de barrido

[0211] La calorimetría diferencial de barrido (DSC) se puede realizar a varios valores de pH usando el calorímetro VP-ITC de Micro Cal. Los barridos se realizan a una escala de barrido constante de 1,5°C/min de 20-90°C. Antes de ejecutar la calorimetría por análisis diferencial, se desalan las fitasas usando columnas NAP-5 (farmacia) equilibradas en los tampones apropiados (p.ej. 0,1M de glicina-HCl, pH 2,5 o 3,0, 20mM de acetato sódico pH 4,0, 0,1 M de acetato sódico, pH 5,5; 0,1M Tris-HCl, pH 7,0). La manipulación de datos se realiza usando el software MicroCal Origin (versión 4.10), y la temperatura de desnaturalización, Td (también llamada la temperatura de fusión, Tm) se define como la temperatura en el ápice del valor máximo en el termograma.

Perfil de pH modificado: determinación de pH 3,5/5,5 de índice de actividad

[0212] Una enmienda del perfil de pH de una variante de fitasa se puede determinar de la siguiente manera: la actividad se mide a pH 3,5 (0,1 M de tampón de acetato, pH 3,5) y a pH 5,5 (0,1 M de tampón de acetato, pH 5,5), en ambos casos se sustrae el tampón ciego. La actividad determinada a pH 3,5 se divide por la actividad determinada a pH 5,5, es decir, las dos mediciones de absorbancia se dividen (véase más abajo). Para medir la actividad, se diluyen los sobrenadantes de las variantes y referencias (p.ej. 1:5000) de manera apropiada en el tampón respectivo. Se dispensan 75 microlitros de la respectiva solución enzimática en un pocillo de placa de microtitulación, p.ej. NUNC 269620 y se añaden 75 microlitros de sustrato con el correspondiente pH (el sustrato se prepara disolviendo dos comprimidos de 5 mg de p-nitrofenil fosfato (Sigma, Cat.No. N-9389) en 10 ml 0,1 M de tampón de Na-acetato, pH 5,5 y 10 ml 0,1 M de tampón de acetato, pH 3,5, respectivamente). La placa se sella y se incuba 15 min., agitada con 750 r.p.m. a 37°C. Después de la parada del tiempo de incubación de 75 microlitros se añade el reactivo (0,1 M de tetraborato de sodio en el agua) y la absorbancia a 405 nm se mide en un espectrofotómetro de placa de microtitulación.

Determinación de la actividad de fitasa

[0213] 75 microlitos de solución enzimática con fitasa, diluidos apropiadamente (p.ej. en 0,25M de acetato sódico, 0,005% (p/v) Tween-20. pH5,5), se dispensan en un pocillo de placa de microtitulación, p.ej. NUNC 269620, y se añaden 75 microlitros de sustrato (preparados disolviendo 100 mg de fitato de sodio de arroz (Aldrich Cat.No. 274321) en 10 ml 0,25 M de tampón de Na-acetato, pH 5,5). La placa se sella y se incuba 15 min. agitada a 750 r.p.m. a 37°C. Después del tiempo de incubación se añaden 75 microlitros de reactivo de parada (el reactivo de parada se prepara mezclando 10 ml de solución de molibdato (10% (p/v) de hepta-molibdato de amonio en 0,25% (p/v) de solución de amoníaco); 10 ml de vanadato de amonio (0,24% producto comercial de Bie&Berntsen, Cat.No. LAB17650) y 21,7 % (p/v) de ácido nítrico) la absorbancia a 405 nm se mide en un espectrofotómetro de placa de microtitulación. La actividad de fitasa se expresa en la unidad de FYT, siendo un FYT la cantidad de enzima que libera 1 microml de ortofosfato inorgánico por min. bajo las condiciones anteriores. Un valor absoluto para la actividad de fitasa medida se obtiene por referencia a una curva estándar obtenida a partir de diluciones apropiadas de fosfato inorgánico o a una curva estándar hecha de diluciones de preparación de enzima de fitasa con actividad conocida (tal preparación enzimática estándar con una actividad conocida está disponible a petición de Novozymes A/S, Krogshoejvej 36; DK-2880 Bagsvaerd).

Ejemplo 2: Influencia de huésped de expresión / glicosilación en la termoestabilidad

Expresión en *Bacillus*

[0214] La fitasa de la SEC ID NO:2 fue expresada en *Bacillus subtilis* como se describe en el ejemplo 1, y purificada usando métodos convencionales: centrifugado, filtración de germen, precipitación de sulfato de amonio (80%

saturación de sulfato de amonio), centrifugado, resuspensión de gránulos en el tampón A (50 mM de acetato sódico, 1.5 M de sulfato de amonio pH 4.5), filtración, cromatografía de interacción hidrofóbica (toyopearl de fenilo, cargando con tampón A, eluciendo con tampón B (50 mM de acetato sódico pH 4.5)), y cromatografía de intercambio de catión (SP-sefarosa, cargando con 10 mM de citrato sódico pH 4.0, eluciendo con un gradiente de sal lineal (10 mM de citrato sódico pH 4.0 + 1 M NaCl).

Expresión en *Pichia*

[0215] Aún más, la fitasa de la SEC ID NO:2 fue expresada en *Pichia pastoris* como se describe generalmente por Rodríguez *et al.* en Archivos de Bioquímica y Biofísica, vol. 382, n°. 1, 2000, págs. 105-112. La fitasa fue purificada a partir del sobrenadante del caldo de fermentación de la siguiente manera: precipitación con sulfato de amonio (80% de saturación), redisolución en 10 ml 25mM de tampón de acetato sódico pH 4,5, diálisis contra el mismo tampón, y filtración a través de un filtro de 0,45 mm. 150ml de esta solución fueron aplicados a una columna SP-Sepharose FF de 40 ml (Pharmacia) equilibrada con el mismo tampón pH 4.5, y la proteína se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0-0,5M). Las fracciones de la columna fueron analizadas para actividad de fitasa. Las fracciones con actividad de fitasa fueron controladas por SDS-PAGE y las fracciones puras fueron agrupadas. La concentración de proteína fue medida usando el kit BCA (Pierce).

Termoestabilidad por DSC

[0216] Las fitasas expresadas en *Pichia* y *Bacillus* de la SEC ID NO:2 fueron sometidas a mediciones de termoestabilidad por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Preparación de la muestra:

[0217] Las muestras (menos de 3 ml en volumen) fueron dializadas en una cámara fría (aprox. 5 grados centígrados) durante un mínimo de 1 hora contra 500 ml de 20 mM de tampón de acetato sódico pH 4.0. La muestra fue transferida a 500 ml de preparación de tampón frío, fresco, y preparada para dializar durante toda la noche. Las muestras fueron filtradas usando un filtro de jeringa de 0,45 micrometros, el volumen ajustado a aprox. 1,5 ml usando el tampón de diálisis, y registrado a A_{280} (absorbancia a 280nm). El tampón de diálisis fue usado como referencia en la calorimetría de barrido diferencial. Las muestras fueron desgasificadas aplicando succión al vacío y agitación durante aprox. 10 minutos.

[0218] Durante la preparación de la muestra de la fitasa expresada en *Pichia* (diálisis contra 20 mM de acetato sódico (NaAc) pH 4,0) se formó un precipitado. El sobrenadante fue usado para un primer experimento. Después, la parte restante de la solución madre purificada fue dializada contra 20 mM de NaAc pH 4,0 y esto permitió la precipitación de algunas impurezas de PM bajo presentes en el lote. Este lote fue usado para un segundo experimento que reveló una T_m muy similar a la del primer experimento (54 vs. 55°C).

Experimento de calorimetría diferencial de barrido:

[0219] Ajustes experimentales usando un instrumento VP-DSC de MicroCal™: tasa de barrido: 90 K/h. Intervalo de barrido: 20 - 90 grados centígrados. Modo de retroalimentación: ninguno. Periodo de filtración: 16 s.

[0220] Las concentraciones enzimáticas de las muestras fueron aprox. 1 – 1,5 mg/ml como se estimaron por A_{280} y un coeficiente de extinción calculado teóricamente en 280 nm (Vector NTI versión 9.0.0). La temperatura de despliegue térmico (T_d) fue evaluada usando el software MicroCal Origin (versión 4.10) y la temperatura de desnaturalización determinada como la temperatura en el vértice en el termograma.

[0221] Los resultados se resumen en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Célula huésped	Tampón	Velocidad de barrido (°C/h)	Intervalo de barrido (°C)	T_d (°C)	A_{280}
<i>B. subtilis</i>	20 mM NaAc pH 4,0	90	20 - 90	62	1,6
<i>P. pastoris</i>	20 mM NaAc pH 4,0	90	20 - 90	55	1,9

[0222] A partir de la Tabla 2 se deduce claramente que la fitasa expresada en *Pichia* es mucho menos termoestable que la fitasa expresada en *Bacillus*.

[0223] La fitasa expresada en *Pichia* fue glicosilada fuertemente, como se visualiza mediante una amplia gama de masas moleculares usando espectrometría de masa (MALDI-TOF), mientras que la fitasa expresada en *Bacillus* no fue glicosilada.

5 **Ejemplo 3: Variante de fitasa R339D**

[0224] Una variante de proteína de la fitasa creada genéticamente de la SEC ID NO:2 con la sustitución R339D fue preparada y expresada en *Aspergillus oryzae* usando métodos conocidos en la técnica. Su temperatura de desnaturalización, T_d, fue determinada a 62,5°C (20 mM de acetato sódico, pH 4,0), usando calorimetría diferencial de barrido como se describe en el Ejemplo 2.

[0225] La sustitución R339D sirve además para eliminar un sitio de escisión de proteasa Kex2 de relevancia potencial para la expresión en *Aspergillus*.

15 **Ejemplo 4: Alimento para animales y aditivos de alimento que comprenden una variante de fitasa**

Aditivo para alimentación animal

[0226] Una formulación de variante de fitasa R339D de la SEC ID NO:2 con 0,15 g de proteína de enzima de fitasa se añade a la premezcla siguiente (por kilo de premezcla):

5000000	IE	Vitamina A
1000000	IE	Vitamina D3
13333	mg	Vitamina E
1000	mg	Vitamina K3
750	mg	Vitamina B1
2500	mg	Vitamina B2
1500	mg	Vitamina B6
7666	mcg	Vitamina B12
12333	mg	Niacina
33333	mcg	Biotina
300	mg	Ácido fólico
3000	mg	Ca-D-pantotenato
1666	mg	Cu
16666	mg	Fe
16666	mg	Zn
23333	mg	Mn
133	mg	Co
66	mg	I
66	mg	Se
5,8	%	Calcio
25	%	Sodio

Alimento para animales

25 [0227] Este es un ejemplo de un alimento para animales (alimentación de pollos de engorde) que comprende 1,5 mg/kg (1.5 ppm) de variante de fitasa R339D de la SEC ID NO:2 (calculado como proteína de enzima de fitasa):

- 62,55 % de maíz
- 33,8% de harina de soja (50% proteína cruda, PC)
- 1,0% de aceite de soja
- 0,2% de DL-metionina

- 0,22% de DCP (fosfato dicálcico)
- 0,76% de CaCO₃ (carbonato cálcico)
- 0,32% de arena
- 0,15% de NaCl (cloruro sódico)
- 1 % de la premezcla anterior

[0228] Los ingredientes se mezclan, y el alimento se granula a la temperatura deseada, p.ej. 60, 65, 75, 80, 85, 90 o incluso 95°C.

Ejemplo 5: Determinación de estabilidad de temperatura

[0229] Ocho variantes de la SEC ID NO:2 (las alteraciones en comparación con la SEC ID NO:2 se muestran en la Tabla 3 abajo) fueron preparadas como se describe en el ejemplo 1. Las dos fitasas de referencia con la SEC ID NO:2 y la SEC ID NO:3 fueron preparadas de la misma manera.

[0230] La estabilidad de temperatura fue determinada de la siguiente manera:
 200 microlitros de sobrenadantes de cada una de las variantes y las proteínas de referencia fueron divididas en dos partes, una parte fue incubada a 50°C en contenedores plásticos, la otra fue almacenada a 5°C. Después de 30 minutos de incubación a 50°C las soluciones de proteína fueron transferidas a un baño de hielo. Después de diluir 1:100 en 0,1 M de tampón de Na-acetato, pH 5,5 la actividad de la muestra calentada y enfriada se midió mediante el ensayo de la fosfatasa del Ejemplo 1 ("Determinación de la actividad de fosfatasa), tampón ciego sustraído. Los resultados se muestran en la Tabla 3 de abajo como actividad enzimática (en las unidades de absorción (AU)) tras la incubación durante 30 minutos a 5°C y 50°C, respectivamente, y la actividad residual (RA) se calcula como actividad de la muestra termotratada (50°C de incubación) dividida por la actividad de la muestra enfriada (5°C de incubación), en %.

Tabla 3: Variantes de fitasa con termoestabilidad mejorada

Fitasa	5 °C (AU)	50°C (AU)	RA (%)
SEC ID NO:2	0,210	0,070	33
SEC ID NO:3	1,052	0,027	3
N4P de la SEC ID NO:2	0,513	0,313	61
G5P de la SEC ID NO:2	0,576	0,287	50
Q111P de la SEC ID NO:2	1,053	0,577	55
E1* de la SEC ID NO:2	0,909	0,401	44
E1*/E2* de la SEC ID NO:2	0,322	0,159	50
E1*/E2*/Q3* de la SEC ID NO:2	0,101	0,051	51
M273L de la SEC ID NO:2	1,599	0,897	56
N286Q de la SEC ID NO:2	0,062	0,024	39

Ejemplo 6: Rendimiento en el alimento para animales en un modelo *in vitro*

[0231] El rendimiento en el alimento para animales de una variante de fitasa es comparada, en un modelo *in vitro*, al rendimiento de una proteína de referencia tales como SEC ID NO:2, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, y/o SEC ID NO:6. El modelo *in vitro* simula condiciones gastrointestinales en un animal monogástrico y correlaciona bien con resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* en animales. La comparación se realiza de la siguiente manera:
 La actividad de fitasa en la muestra variante se determina como se describe en el Ejemplo 1 bajo "Determinación de la actividad de fitasa".

[0232] Las muestras de alimento compuestas por un 30% de harina de soja y un 70% de harina de maíz con CaCl₂ añadido a una concentración de 5 g de calcio por kg de alimento se preparan y preincuban luego a 40°C y pH 3,0 durante 30 minutos seguidos por la adición de pepsina (3000 U/g de alimento) y dosificaciones adecuadas de las fitasas (se usan dosificaciones idénticas para todas las fitasas que serán evaluadas para permitir la comparación), por ejemplo, entre 0,25 hasta 0,75 unidades de fitasa FYT/g de alimento. Una forma preliminar sin actividad de fitasa se incluye también como referencia. Luego se incuban las muestras a 40°C y pH 3.0 durante 60 minutos seguido de pH 4.0 durante 30 minutos.

[0233] Las reacciones se detienen y el ácido fítico y los inositol fosfatos se extraen mediante adición de HCl a una concentración final de 0,5 M e incubación a 40°C durante 2 horas, seguido de un ciclo de congelación-descongelación y 1 hora de incubación a 40°C.

5 [0234] El ácido fítico y los inositol fosfatos se separan por cromatografía iónica de alto rendimiento como es descrito por Chen *et al.* en el Journal of Chromatography A (2003) vol. 1018, págs. 41-52 y cuantificado como se describe por Skoglund *et al.* en J. Agric. Food Chem. (1997), vol. 45, págs. 431-436.

10 [0235] El fósforo liberado es calculado luego como la diferencia en el fósforo ligado al inositol fosfato (IP-P) entre la fitasa tratada y las muestras no tratadas. El rendimiento relativo de la variante se calcula como el porcentaje del fósforo liberado por la fitasa de referencia.

15 [0236] El rendimiento *in vitro* de varias variantes de fitasa de la SEC ID NO:2 fue determinado como se ha descrito anteriormente, en una dosificación de 125 FYT/kg de alimento.

20 [0237] Los resultados se muestran en las Tablas 4A y 4B de abajo, para sobrenadantes y fitasas purificadas, respectivamente. El IP6-P residual designa la cantidad de IP6-P (fósforo de fitato) restante después de la incubación *in vitro* y se indica en mg/g MS (materia seca). El IP6-P degradado se determina como la diferencia entre el residual IP6-P del blanco y el IP6-P residual de la muestra respectiva. Finalmente, en la última columna el IP6-P degradado se indica relativamente a la fitasa con la SEC ID NO:2. En la Tabla 4A los valores en blanco y de referencia (SEC ID NO:2) son promedios de varias determinaciones independientes, mientras que los otros valores se basan en determinaciones únicas. En la Tabla 4B el valor en blanco es un promedio de varias determinaciones independientes, donde los otros valores se basan en determinaciones únicas.

25 Tabla 4A. Rendimiento *in vitro* de sobrenadantes de variante de fitasa

Variante No. / (modificación en comparación con la SEC ID NO:2)	IP6-P residual mg/g MS	IP6-P degradado mg/g MS	IP6-P degradado (%)
Blanco	2,462		
026 (SEC ID NO:3)	0,106	2,356	99
000 (SEC ID NO:2)	0,071	2,391	100
008 (G52C/A99C)	0,387	2,075	87
009 (G59C/F100C)	0,272	2,190	92
010 (K141C/V199C)	0,207	2,255	94
015 (N4P)	0,064	2,387	100
016 (G5P)	0,099	2,351	98
018(Q111P)	0,100	2,350	98
020 (T137P)	0,370	2,092	87
021 (L154P)	0,382	2,080	87
022 (S161 P)	0,235	2,227	93
023 (K240P)	0,581	1,881	79
024 (T355P)	0,744	1,718	72
028 (G52E)	0,716	1,746	73
030 (E57Y)	0,666	1,796	75
032 (A84Y)	0,667	1,795	75
034(L104A)	0,709	1,753	73
035 (A105E)	0,553	1,908	80
036 (K107D)	0,767	1,695	71
037 (K107G)	0,450	2,012	84

ES 2 531 434 T3

040 (E1*)	0,069	2,381	100
041 (E1*/E2*)	0,095	2,367	99
042 (E1*/E2*/Q3*)	0,084	2,366	99
043 (N121T)	0,423	2,039	85
044 (M273L)	0,107	2,355	98
048 (E285G)	0,553	1,909	80
050 (N286Q)	0,068	2,382	100
051 (G289P)	0,560	1,902	80
052 (V294T)	0,746	1,716	72
053 (I299L)	0,848	1,614	67
056 (I362K)	0,699	1,763	74
059 (K107E)	0,537	1,925	80

[0238] Las variantes 015, 016, 018, 040, 041, 042, 044, y 050 parecen tener un rendimiento *in vitro* que es al menos tan bueno o mejor que las fitasas de la SEC ID NO:2 y 3.

5

Tabla 4B: Rendimiento *in vitro* de variantes de fitasa purificadas

Variante N° / (modificado en comparación con SEC ID NO:2)	IP6-P residual mg/g MS	IP6-P degradado mg/g MS	IP6-P degradado (%)
Blanco	2,412		
026 (SEC ID NO:3)	0,630	1,782	112
102 (SEC ID NO:4)	0,717	1,695	106
000 (SEC ID NO:2)	0,816	1,596	100
101 (SEC ID NO:9)	0,631	1,781	112
018 (Q111P)	0,843	1,569	98
030 (E57Y)	0,318	2,094	131
031 (T76G)	0,384	2,028	127
037 (K107G)	0,657	1,755	110
041 (E1*/E2*)	0,858	1,553	97
044 (M273L)	0,943	1,469	92
050 (N286Q)	0,865	1,546	97
056 (I362K)	0,425	1,987	125
072 (I362R)	0,430	1,982	124
085 (N121D)	0,555	1,856	116
087 (E196Q)	0,547	1,865	117
089 (T200K)	0,405	2,007	126
090 (D202N)	0,586	1,826	114
091 (E218Q)	1,264	1,148	72
095 (D314N)	0,696	1,716	107

098 (E406A)	0,515	1,897	119
125 (Y114T/Q115Q/K116A/D117D/E118T/E119S/-K120S/N121 P/D122D/P123P/L124L)	0,753	1,658	104
127 (Y114T/Q115Q/K116T/D117D/E118T/E119S/-K120S/N121 P/D122D/P123P/L124L)	0,861	1,550	97

[0239] Las variantes 030, 031, 037, 056, 072, 085, 087, 089, 090, 095, 098, y 125 parecen rendir al menos tan bien *in vitro* como la fitasa de la SEC ID NO:3.

5 Ejemplo 7: Actividad específica

[0240] La actividad específica de una variante de fitasa se determina en muestras altamente purificadas dializadas contra 250 mM de acetato sódico, pH 5,5. La pureza se controla previamente en un gel de poliacrilamida SDS que muestra la presencia de sólo un componente.

[0241] La concentración de proteína se determina mediante el análisis de aminoácidos de la siguiente manera: una alícuota de la muestra es hidrolizada en 6N HCl, 0,1 % de fenol durante 16 h a 110°C en un tubo de vidrio evacuado. Los aminoácidos resultantes son cuantificados usando un sistema de análisis de aminoácidos Applied Biosystems 420A accionado según las instrucciones del fabricante. A partir de las cantidades de los aminoácidos se puede calcular la masa —y por lo tanto también la concentración— de proteína en la alícuota hidrolizada.

[0242] La actividad de fitasa se determina en las unidades de FYT como se describe en el Ejemplo 1 ("Determinación de la actividad de fitasa"), y la actividad específica se calcula como la actividad de fitasa medida en unidades de FYT por mg de proteína enzimática de variante de fitasa.

[0243] La actividad específica para la fitasa de la SEC ID NO:2 y variante 072 (I362R de la SEC ID NO:2) fue determinada como se ha descrito anteriormente. La actividad específica de variante 072 fue un 86% de la actividad específica de la fitasa de la SEC ID NO:2. La incertidumbre (desviación típica) se estima en aproximadamente un 10%, que es principalmente debido al ensayo de actividad de fitasa basado en un sustrato complejo.

Ejemplo 8: Estabilidad de temperatura

[0244] Varias variantes de la SEC ID NO:2 fueron preparadas como se describe en el Ejemplo 1, y las cepas huésped de *Bacillus subtilis* cultivadas en 100ml de medio PS1 (100g/L de sacarosa, 40g/L de copos de soja, 10g/L Na₂HPO₄·12H₂O; 0,1ml/L Dowfax 63N10 (Dow)) en frascos de agitación de 500ml durante cuatro días a 30°C a 300 r.p.m.

[0245] Dos fitasas de referencia fueron preparadas de la misma manera, es decir, la fitasa con la SEC ID NO:3 (correspondiente a la variante N31D/Q139K/L197F/N316K de la SEC ID NO:2), y la fitasa con la SEC ID NO:4 (correspondiente a la variante N31D/N121T/K132T/Q139K de la SEC ID NO:2).

[0246] También la fitasa con la SEC ID NO:9 fue incluida para comparación (correspondiente a la variante Q3P/N31D/N121T/K132T/Q139K de la SEC ID NO:2).

[0247] La estabilidad de temperatura de las variantes y las fitasas de referencia fue determinada de la siguiente manera:

Los sobrenadantes fueron diluidos diez veces añadiendo 20ul (microlitros) de sobrenadante a 180ul 0,1 M de tampón de Na-acetato, pH5,5 + 0,005% de Tween-20. Las enzimas diluidas fueron divididas en dos partes, una parte fue incubada a 60°C en recipientes de plástico, y la otra parte fue almacenada a 5°C. Después de 30 minutos de incubación a 60°C las soluciones de proteína fueron transferidas a un baño de hielo. Después de diluir 1:10 en 0,1M de tampón de Na-acetato, pH5,5 y 0,005% de Tween-20, la actividad de la muestra calentada y enfriada fue medida mediante el ensayo de la fosfatasa del ejemplo 1 ("Determinación de la actividad de fosfatasa"), el tampón ciego fue sustraído.

[0248] La Tabla 5 es una lista de variantes con estabilidad de temperatura mejorada en comparación con las fitasas de referencia. Para cada variante, la tabla también especifica las alteraciones en comparación con la SEC ID NO:2. La actividad enzimática (en unidades de absorción (UA)) tras la incubación durante 30 minutos a 5°C y 60°C, respectivamente, fue determinada, y la actividad residual (AR) calculada como la actividad de la muestra termotratada (60°C de incubación) dividida por la actividad de la muestra enfriada (5°C de incubación). Después, los resultados de la actividad residual fueron normalizados a la actividad residual de la fitasa de la SEC ID NO:2, habiendo sido expresados y tratados de la misma manera. El Factor de Mejora resultante (FM) se muestra en la

ES 2 531 434 T3

Tabla 5. Para la fitasa de la SEC ID NO:2 el FM es 1,0, mientras que las dos fitasas de referencia de la SEC ID NO:3 y 4 fueron menos termoestables que la fitasa de la SEC ID NO:2, lo cual se desprende del hecho de que el FM para estas dos fitasas fue sólo 0,1 y 0,3, respectivamente.

5

Tabla 5: Variantes de fitasa con termoestabilidad mejorada

N°	Mutación	FM
026	N31D/Q139K/L197F/N316K (SEC ID NO:3)	0,1
101	Q3P/N31D/N121T/K132T/Q139K (aminoácidos 23-433 de la SEC ID NO:9)	0,3
102	N31D/N121T/K132T/Q139K (SEC ID NO:4)	0,3
078	V409E	0,3
019	N136P	0,3
082	E411K	0,4
058	E331K/V55D	0,4
086	E167Q	0,4
110	K179K/T180T/T181D/E182K/K183L/S184*/T185*/K186*	0,4
059	K107E	0,4
087	E196Q	0,5
070	T276R	0,5
048	E285G	0,5
053	I299L	0,5
089	T200K	0,5
065	E119R	0,6
085	N121D	0,6
036	K107D	0,6
107	K179K/T180E/T181K/E182H/K183Q/S184*/T185*/K186*	0,6
095	D314N	0,7
022	S161P	0,7
079	T410D	0,7
004	K141C	0,7
108	K179K/T180E/T181 K/E182Q/K183Q/S184*/T185*/K186*	0,7
094	E285N	0,7
068	R164E	0,8
081	E411R	0,8
002	G52C	0,8
020	T137P	0,8
096	D314G	0,8
120	E1K	0,9
042	E1*/E2*/Q3*	0,9
043	N121T	0,9
098	E406A	0,9

ES 2 531 434 T3

063	Q82E	0,9
038	Q109A	0,9
000	SEC ID NO:2	1,0
016	G5P	1,0
030	E57Y	1,0
074	I379R	1,0
041	E1*/E2*	1,0
080	T410E	1,1
040	E1*	1,2
066	E119K	1,2
028	G52E	1,2
015	N4P	1,3
056	I362K	1,3
090	D202N	1,3
071	T276K	1,3
076	N385D	1,3
113	Q111P/E241Q	1,4
005	S162C	1,4
109	K179K/T180E/T181K/E182K/K183V/S184*/T185*/K186*	1,4
093	E241Q	1,4
069	Q223E	1,5
050	N286Q	1,5
037	K107G	1,5
125	Y114T/Q115Q/K116A/D117D/ E118T/E119S/K120S/N121P/D122D/P123P/L124L	1,6
075	I379K	1,6
044	M273L	1,6
006	N31C	1,7
083	E53V	1,8
009	G59C/F100C	1,9
062	W46E	2,2
018	Q111P	2,2
127	Y114T/Q115Q/K116T/D117D/E118T/E119S/K120S/N121P/D122D/P123P /L124L	2,3
031	T76G	2,3
072	I362R	2,7
010	K141CN199C	4,3
008	G52C/A99C	5,2

Ejemplo 9: Termoestabilidad por calorimetría diferencial de barrido

- 5 [0249] Varias variantes purificadas de la SEC ID NO:2 fueron preparadas como generalmente se describe en el Ejemplo 1. Dos fitasas de referencia fueron preparadas de la misma manera, es decir, la fitasa con SEC ID NO:3 (variante correspondiente a N31D/Q139K/L197F/N316K de la SEC ID NO:2), y la fitasa con SEC ID NO:4 (variante correspondiente a N31D/N121T/K132T/Q139K de la SEC ID NO:2). También la fitasa con SEC ID NO:9 fue incluida para comparación (correspondiente a la variante Q3P/N31D/N121T/K132T/Q139K de la SEC ID NO:2).
- 10 [0250] Las alícuotas de las muestras de proteína fueron dializadas contra 2 x 500ml 20mM de Na-acetato, pH4,0 a 4°C en un siguiente paso de 2-3h seguido por un paso durante la noche. Cada muestra fue de 0,45um filtrada y diluida con tampón para aprox. 2 unidades A_{280} . Los valores de absorbancia exactos medidos se dan en la tabla de resultados. La calorimetría diferencial de barrido fue realizada en un calorímetro VP-DSC de MicroCal a 90°C/h velocidad de barrido de 20-90°C en 20 mM de tampón de Na-acetato, pH 4,0.
- 15 [0251] Las temperaturas de desnaturalización resultantes (T_d) se muestran en la Tabla 6 de abajo, que resume los resultados de tres experimentos diferentes.

Tabla 6: Mediciones T_d mediante DSC

Fitasa	A_{280}	T_d (°C)	Comentarios
N° 102 (SEC ID NO:4)	2,0	61,5	
N° 000 (SEC ID NO:2)	2,4	61,2	
N° 101 (aminoácidos 23-433 de la SEC ID NO:9)	2,3	61,0	
N° 031 (T76/G de la SEC ID NO:2)	2,0	61,3	
N° 056 (I362K de la SEC ID NO:2)	2,4	62,1	
N° 072 (I362R de la SEC ID NO:2)	2,4	61,6	Precipitación menor
N° 000 (SEC ID NO:2)	2,29	61	
N° 018 (Q111P de la SEC ID NO:2)	1,97	62	
YC044 (M273L de la SEC ID NO:2)	2,15	62	
N° 000 (SEC ID NO:2, fermentación piloto)	1,35	62	
N° 026 (SEC ID NO:3)	1,99	57	Se ejecutó dos veces con el mismo resultado

20 Ejemplo 10: Purificación y perfil de temperatura

- 25 [0252] Las variantes de fitasa y las fitasas de referencia y comparativas usadas en este documento fueron purificadas de la siguiente manera: el sobrenadante de fermentación con la fitasa fue primero centrifugado a 7200 r.p.m. y 5°C durante una hora y filtrado a través de un sándwich de cuatro filtros de microfibras de vidrio de Whatman (2,7; 1,6; 1,2 y 0,7 micrómetros). Después de esto, la solución fue filtrada de manera estéril (bien a través de un filtro

superior de botellas PES con un corte de 0,22µm o a través de un filtro de profundidad Seitz-EKS usando presión). A la solución se añadió sulfato amónico sólido dando una concentración final de 1,5M y el pH se ajustó a 6,0 usando 6M de HCl.

5 [0253] La solución con fitasa fue aplicada a una columna butil sefarosa, aproximadamente 50ml en una columna XK26, usando como tampón A 25mM de bis-tris (Bis-(2-hidroxietil)imino-tris(hidroximetil)metano)) + 1,5M de sulfato amónico pH 6,0, y como tampón B 25mM de bis-tris pH 6,0. Las fracciones de la columna fueron analizadas por actividad usando el ensayo de la fosfatasa (véase el Ejemplo 1, "Determinación de la actividad de fosfatasa") y se agruparon las fracciones con actividad. Las fracciones agrupadas fueron dializadas extensivamente contra 10mM de acetato sódico pH 4,5. A continuación, la solución con fitasa fue purificada por cromatografía en S Sefarosa, aproximadamente 75ml en una columna XK26, usando como tampón A 50mM de acetato sódico pH 4,5, y como tampón B 50mM de acetato sódico + 1M de NaCl pH 4,5. De nuevo las fracciones de la columna fueron analizadas por actividad y se agruparon las fracciones con actividad. Finalmente, la solución con la fitasa purificada fue concentrada usando un dispositivo de filtración Amicon ultra-15 con una membrana de corte de 10kDa.

15 [0254] El peso molecular, como se estima a partir de SDS-PAGE, fue aproximadamente de 40kDa para todas las fitasas y la pureza fue en todos los casos > 95%.

20 [0255] El perfil de temperatura (actividad de fitasa como una función de temperatura) de las variantes fue determinado en el intervalo de temperatura de 20-90°C esencialmente como se describe en el Ejemplo 1 ("Determinación de la actividad de fitasa"), sin embargo, las reacciones enzimáticas (100 microlitros de solución enzimática con fitasa + 100 microlitros de sustrato) fueron realizadas en tubos PCR en vez de en placas de microtitulación. Después de un periodo de reacción de 15 minutos a temperatura deseada los tubos fueron enfriados a 20°C durante 20 segundos y 150 microlitros de la mezcla reactiva fueron transferidos a una placa de microtitulación. 75 microlitros de reactivo de parada fueron añadidos y la absorbancia a 405 nm fue medida en un espectrofotómetro de placa de microtitulación. Los resultados se resumen en la Tabla 7 de abajo. Los números dados para cada temperatura (20-90 °C en pasos de 10°C) son actividad relativa (en %) normalizados al valor en condiciones óptimas.

Tabla 7: Perfiles de temperatura

Nº	Fitasa	Temperatura (°C)								
		20	30	40	50	60	70	80	90	
026	SEC ID NO:3	18	32	52	74	100	4	4	-1	
102	SEC ID NO:4	22	37	55	79	100	17	10	4	
000	SEC ID NO:2	20	34	54	68	100	21	11	5	
101	Aminoácidos 23-433 de la SEC ID NO:9	16	28	50	65	100	12	6	-1	
018	Q111P de la SEC ID NO:2	20	34	53	75	100	17	10	4	
030	E57Y de la SEC ID NO:2	21	35	57	79	100	28	10	4	
031	T76G de la SEC ID NO:2	20	34	55	77	100	23	10	4	
037	K107G de la SEC ID NO:2	21	34	55	77	100	32	11	4	
041	E1*/E2* de la SEC ID NO:2	21	34	56	78	100	15	9	4	
044	M273L de la SEC ID NO:2	21	35	56	79	100	26	9	3	
050	N286Q de la SEC ID NO:2	16	32	44	84	100	6	-1	-7	
056	1362K de la SEC ID NO:2	20	35	54	78	100	25	9	3	
062	W46E de la SEC ID NO:2	27	42	65	84	100	18	12	5	
072	I362R de la SEC ID NO:2	21	35	56	79	100	23	11	5	
083	E53V de la SEC ID NO:2	20	32	53	76	100	22	10	5	
093	E241Q de la SEC ID NO:2	22	37	59	83	100	20	10	3	

Las variantes 030, 031, 037, 044, 056, 062, 072, 083, y 093 tienen una actividad relativa más elevada a 70°C en comparación con las fitasas de referencia 026 y 102

Ejemplo 11: Perfil de pH

[0256] Los perfiles de pH (actividad de fitasa como una función de pH) de varias variantes y la misma referencia y fitasas comparativas como se usan en los ejemplos anteriores fueron determinados a 37°C en el intervalo pH de 2,0 a 7,5 (en pasos de 0,5 unidades de pH) como se describe en el ejemplo 1 ("Determinación de la actividad de fitasa"), exceptuando que se usó un cóctel de tampón (50mM de glicina, 50mM de ácido acético y 50mM de bis-tris en vez del tampón de 0,25M de acetato sódico pH 5,5. Los resultados se resumen en la Tabla 8 de abajo. Los números dados para cada pH (2,0-7,5) son la actividad relativa (en %) normalizada al valor óptimo.

Tabla 8: Perfiles de pH

N°	Fitasa	pH											
		2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
026	SEC ID NO:3	30	62	87	99	100	95	84	65	40	14	-1	-2
102	SEC ID NO:4	26	65	87	97	100	93	82	66	43	17	0	-4
000	SEC ID NO:2	33	60	89	100	99	95	80	61	35	11	-2	-4
101	Aminoácidos 23-433 de la SEC ID NO:9	37	65	87	97	100	93	80	65	42	19	2	0
018	Q111P de la SEC ID NO:2	27	61	89	97	100	90	75	57	32	10	-2	-4
030	E57Y de la SEC ID NO:2	35	60	86	97	100	92	79	60	36	13	1	-3
031	T76G de la SEC ID NO:2	34	60	86	99	100	93	79	62	36	12	1	-1
037	K107G de la SEC ID NO:2	33	59	87	100	99	93	78	60	34	10	-2	-4
041	E1*/E2* de la SEC ID NO:2	29	62	89	100	100	93	79	59	34	12	2	1
044	M273L de la SEC ID NO:2	31	63	87	100	99	94	81	62	36	12	0	-1
050	N286Q de la SEC ID NO:2	29	59	87	100	97	89	77	56	36	12	1	-2
056	I362K de la SEC ID NO:2	34	60	85	100	98	92	74	64	35	12	4	1
062	W46E de la SEC ID NO:2	13	40	77	100	95	88	72	52	29	10	1	-1
072	I362R de la SEC ID NO:2	35	60	87	100	100	97	82	64	37	14	1	-1
083	E53V de la SEC ID NO:2	22	61	88	99	100	94	80	61	35	9	-6	-5
085	N121D de la SEC ID NO:2	34	65	91	100	94	82	65	46	27	11	4	0
087	E196Q de la SEC ID NO:2	30	63	89	100	99	89	73	54	28	8	4	0
089	T200K de la SEC ID NO:2	25	58	86	100	92	78	61	43	18	4	0	-1
090	D202N de la SEC ID NO:2	30	66	91	100	99	91	70	46	18	3	-1	-3
091	E2180 de la SEC ID NO:2	11	45	75	95	100	95	90	64	35	8	-2	-4
093	E241 Q de la SEC ID NO:2	28	58	83	92	100	87	71	59	31	8	-1	-3
095	D314N de la SEC ID NO:2	26	60	87	100	98	94	75	58	33	11	2	0
098	E406A de la SEC ID NO:2	32	59	89	100	98	91	76	59	30	9	2	-3
125	Y114T/0115Q/K116A/D117D/E118T/- E119S/K120S- /N121P/D122D/P123P/L124L de la SEC ID NO:2	30	66	87	98	100	86	70	54	29	10	1	-1
127	Y114T/0115Q/K116T/D117D/E118T/- E119S/K120S- /N121P/D122D/P123P/L124L de la SEC ID NO:2	42	67	91	100	100	90	74	55	27	8	-2	-4

10 [0257] Para YC062 y YC091 la curva de pH (actividad relativa como una función de pH) parece haberse desplazado 0,5 unidades de pH hacia un pH superior.

15 [0258] Además, mientras que para la mayoría de las fitasas de la Tabla 8 (incluyendo las fitasas de referencia 026 y 102) las condiciones óptimas se encuentran en pH3,5-pH4,0, se observa un pH óptimo de 3,5 para los N°. 062, 085, y 089, y un pH óptimo de 4,0 se observa para los N°. 091 y 093.

Ejemplo 12: Estabilidad de temperatura

[0259] La estabilidad de temperatura de varias variantes purificadas y la misma referencia y fitasas comparativas como en los ejemplos anteriores fue determinada midiendo la actividad de fitasa residual después de la incubación a 70°C y pH 4.0 (0.1 M de acetato de sodio). Las fitasas fueron incubadas y las muestras fueron retiradas después de 0, 10, 30 y 60 minutos y enfriadas en hielo. La actividad residual a pH 5.5 fue determinada usando el método descrito en el ejemplo 1 ("Determinación de la actividad de fitasa"). Los resultados, normalizados a la actividad encontrada a 0 minutos, se muestran en la tabla 9 de abajo.

Tabla 9: Estabilidad de temperatura

Nº	Fitasa	Estabilidad de temperatura % después de 60 min.
026	SEC ID NO:3	26
102	SEC ID NO:4	30
000	SEC ID NO:2	46
101	Aminoácidos 23-433 de la SEC ID NO:9	29
018	Q111P de la SEC ID NO:2	25
044	M273L de la SEC ID NO:2	31
050	N286Q de la SEC ID NO:2	19
056	I362K de la SEC ID NO:2	26
062	W46E de la SEC ID NO:2	31
072	I362R de la SEC ID NO:2	32
083	E53V de la SEC ID NO:2	31
093	E241Q de la SEC ID NO:2	29

[0260] Los resultados anteriores indican que los N°. 044, 062, 072, y 083 pueden ser más estables bajo estas condiciones (70°C y pH 4) que las fitasas de referencia (aunque en este experimento se observó una gran variación para el N°. 000).

Ejemplo 13: Cálculo del porcentaje de identidad e identificación de las posiciones correspondientes

[0261] La SEC ID NO:9 fue alineada con la SEC ID NO:2 usando el programa Needle del paquete EMBOSS de la versión 2.8.0. La matriz de sustitución usada fue BLOSUM62, la penalización por apertura de *gap* fue 10,0 y la penalización por extensión de *gap* fue 0,5.

[0262] La alineación resultante se muestra en la Fig. 2.

[0263] El grado de identidad entre la SEC ID NO:9 y la SEC ID NO:2 se calcula de la siguiente manera: el número de correspondencias exactas es 406 (todas ellas con un trazo vertical). La longitud de la secuencia más corta es 411 (SEC ID NO:2). El porcentaje de identidad es $406/411 \times 100\% = 98,8\%$.

[0264] La alineación de la Fig. 2 también se usa para derivar posiciones correspondientes de la siguiente manera: los aminoácidos unos encima de los otros en esta alineación se encuentran en posiciones correspondientes. P.ej., el aminoácido Q en la posición 3 de la SEC ID NO:2 corresponde al aminoácido P en el número de posición 25 de la SEC ID NO:9. Para los fines presentes se hace referencia al número de posición de la SEC ID NO:2. Por lo tanto, la SEC ID NO:9 se puede considerar una variante de la SEC ID NO:2 la cual comprende la sustitución Q3P.

[0265] Otras diferencias en forma de sustituciones en la coincidencia de la alineación se encuentran en las posiciones 31, 121, 132, y 139, a saber, N31D, N121T, K132T, y Q139K.

[0266] Las diferencias adicionales se encuentran en el N-término, donde la SEC ID NO:9 tiene una extensión de 22 aminoácidos en comparación con la SEC ID NO:2.

[0267] En general, la SEC ID NO:9 puede, por lo tanto, ser considerada la siguiente variante de la SEC ID NO:2:
*0aM/*0bS/*0cT/*0dF/*0eI/*0fI/*0gR/*0hL/*0iL/*0jF/*0kF/*0mS/*0nL/*0oL/*0pC/*0qG/*0rS/*0s
F/*0tS/*0uI/*0vH/*0wA/Q3P/N31D/N121T/K132T/Q139K.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

[0272]

10

<110> Novozymes A/S

<120> Variantes de fitasa

<130> 10945-EP-ETD

15

<140> EP 11155829.2

<141> 2011-02-24

<150> EP 07711278.7

20

<151> 2008-09-17

<150> PCT/DK2007/000135

<151> 2007-03-19

25

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

30

<211> 1233

<212> DNA

<213> Citrobacter braakii ATCC 51113

<220>

35

<221> mat_péptido

<222> (1)..(1233)

<220>

40

<221> CDS

<222> (1)..(1233)

gaa Glu 1	gag Glu	cag Gln	aat Asn	ggt Gly 5	atg Met	aaa Lys	ctt Leu	gag Glu	cgg Arg 10	gtt Val	gtg Val	ata Ile	gtg Val	agt Ser 15	cgt Arg	48
cat His	gga Gly	gta Val	aga Arg 20	gca Ala	cct Pro	acg Thr	aag Lys	ttc Phe 25	act Thr	cca Pro	ata Ile	atg Met	aaa Lys 30	aat Asn	gtc Val	96
aca Thr	ccc Pro	gat Asp 35	caa Gln	tgg Trp	cca Pro	caa Gln	tgg Trp 40	gat Asp	gtg Val	ccg Pro	tta Leu	gga Gly 45	tgg Trp	cta Leu	acg Thr	144
cct Pro	cgt Arg 50	ggg Gly	gga Gly	gaa Glu	ctt Leu	gtt Val 55	tct Ser	gaa Glu	tta Leu	ggt Gly	cag Gln 60	tat Tyr	caa Gln	cgt Arg	tta Leu	192
tgg Trp 65	ttc Phe	acg Thr	agc Ser	aaa Lys	ggt Gly 70	ctg Leu	ttg Leu	aat Asn	aat Asn	caa Gln 75	acg Thr	tgc Cys	cca Pro	tct Ser	cca Pro 80	240
ggg Gly	cag Gln	gtt Val	gct Ala	gtt Val 85	att Ile	gca Ala	gac Asp	acg Thr	gat Asp 90	caa Gln	cgc Arg	acc Thr	cgt Arg	aaa Lys 95	acg Thr	288
ggt Gly	gag Glu	gcg Ala	ttt Phe 100	ctg Leu	gct Ala	ggg Gly	tta Leu	gca Ala 105	cca Pro	aaa Lys	tgt Cys	caa Gln	att Ile 110	caa Gln	gtg Val	336
cat His	tat Tyr	cag Gln 115	aag Lys	gat Asp	gaa Glu	gaa Glu	aaa Lys 120	aat Asn	gat Asp	cct Pro	ctt Leu	ttt Phe 125	aat Asn	ccg Pro	gta Val	384
aaa Lys	atg Met 130	ggg Gly	aaa Lys	tgt Cys	tcg Ser	ttt Phe 135	aac Asn	aca Thr	ttg Leu	cag Gln	gtt Val 140	aaa Lys	aac Asn	gct Ala	att Ile	432
ctg Leu 145	gaa Glu	cgg Arg	gcc Ala	gga Gly	gga Gly 150	aat Asn	att Ile	gaa Glu	ctg Leu	tat Tyr 155	acc Thr	caa Gln	cgc Arg	tat Tyr	caa Gln 160	480
tct	tca	ttt	cgg	acc	ctg	gaa	aat	gtt	tta	aat	ttc	tca	caa	tcg	gag	528

Ser	Ser	Phe	Arg	Thr	Leu	Glu	Asn	Val	Leu	Asn	Phe	Ser	Gln	Ser	Glu		
				165					170					175			
aca	tgt	aag	act	aca	gaa	aag	tct	acg	aaa	tgc	aca	tta	cca	gag	gct		576
Thr	Cys	Lys	Thr	Thr	Glu	Lys	Ser	Thr	Lys	Cys	Thr	Leu	Pro	Glu	Ala		
			180					185					190				
tta	ccg	tct	gaa	ctt	aag	gta	act	cct	gac	aat	gta	tca	tta	cct	ggt		624
Leu	Pro	Ser	Glu	Leu	Lys	Val	Thr	Pro	Asp	Asn	Val	Ser	Leu	Pro	Gly		
		195					200					205					
gcc	tgg	agt	ctt	tct	tcc	acg	ctg	act	gag	ata	ttt	ctg	ttg	caa	gag		672
Ala	Trp	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu	Ile	Phe	Leu	Leu	Gln	Glu		
	210					215					220						
gcc	cag	gga	atg	cca	cag	gta	gcc	tgg	ggg	cgt	att	acg	gga	gaa	aaa		720
Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Gln	Val	Ala	Trp	Gly	Arg	Ile	Thr	Gly	Glu	Lys		
	225				230					235					240		
gaa	tgg	aga	gat	ttg	tta	agt	ctg	cat	aac	gct	cag	ttt	gat	ctt	ttg		768
Glu	Trp	Arg	Asp	Leu	Leu	Ser	Leu	His	Asn	Ala	Gln	Phe	Asp	Leu	Leu		
				245					250					255			
caa	aga	act	cca	gaa	gtt	gcc	cgt	agt	agg	gcc	aca	cca	tta	ctc	gat		816
Gln	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Ala	Arg	Ser	Arg	Ala	Thr	Pro	Leu	Leu	Asp		
			260					265					270				
atg	ata	gac	act	gca	tta	ttg	aca	aat	ggt	aca	aca	gaa	aac	agg	tat		864
Met	Ile	Asp	Thr	Ala	Leu	Leu	Thr	Asn	Gly	Thr	Thr	Glu	Asn	Arg	Tyr		
		275					280					285					
ggc	ata	aaa	tta	ccc	gta	tct	ctg	ttg	ttt	att	gct	ggt	cat	gat	acc		912
Gly	Ile	Lys	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Leu	Phe	Ile	Ala	Gly	His	Asp	Thr		
	290					295					300						
aat	ctt	gca	aat	tta	agc	ggg	gct	tta	gat	ctt	aac	tgg	tcg	cta	ccc		960
Asn	Leu	Ala	Asn	Leu	Ser	Gly	Ala	Leu	Asp	Leu	Asn	Trp	Ser	Leu	Pro		
	305				310					315					320		
ggt	caa	ccc	gat	aat	acc	cct	cct	ggt	ggg	gag	ctt	gta	ttc	gaa	aag		1008
Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Glu	Leu	Val	Phe	Glu	Lys		
				325					330					335			
tgg	aaa	aga	acc	agt	gat	aat	acg	gat	tgg	ggt	cag	ggt	tca	ttt	ggt		1056
Trp	Lys	Arg	Thr	Ser	Asp	Asn	Thr	Asp	Trp	Val	Gln	Val	Ser	Phe	Val		
			340					345					350				
tat	cag	acg	ctg	aga	gat	atg	agg	gat	ata	caa	ccg	ttg	tcg	tta	gaa		1104
Tyr	Gln	Thr	Leu	Arg	Asp	Met	Arg	Asp	Ile	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Glu		
		355					360					365					
aaa	cct	gct	ggc	aaa	gtt	gat	tta	aaa	tta	att	gca	tgt	gaa	gag	aaa		1152
Lys	Pro	Ala	Gly	Lys	Val	Asp	Leu	Lys	Leu	Ile	Ala	Cys	Glu	Glu	Lys		
	370					375					380						
aat	agt	cag	gga	atg	tgt	tcg	tta	aaa	agt	ttt	tcc	agg	ctc	att	aag		1200
Asn	Ser	Gln	Gly	Met	Cys	Ser	Leu	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Leu	Ile	Lys		
	385				390					395					400		
gaa	att	cgc	gtg	cca	gag	tgt	gca	ggt	acg	gaa							1233
Glu	Ile	Arg	Val	Pro	Glu	Cys	Ala	Val	Thr	Glu							
				405					410								

<210> 2

<211> 411

5 <212> PRT

<213> *Citrobacter braakii* ATCC 51113

<400> 2

ES 2 531 434 T3

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

```

      260                265                270
Met Ile Asp Thr Ala Leu Leu Thr Asn Gly Thr Thr Glu Asn Arg Tyr
      275                280                285
Gly Ile Lys Leu Pro Val Ser Leu Leu Phe Ile Ala Gly His Asp Thr
      290                295                300
Asn Leu Ala Asn Leu Ser Gly Ala Leu Asp Leu Asn Trp Ser Leu Pro
      305                310                315
Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe Glu Lys
      325                330                335
Trp Lys Arg Thr Ser Asp Asn Thr Asp Trp Val Gln Val Ser Phe Val
      340                345                350
Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile Gln Pro Leu Ser Leu Glu
      355                360                365
Lys Pro Ala Gly Lys Val Asp Leu Lys Leu Ile Ala Cys Glu Glu Lys
      370                375                380
Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser Phe Ser Arg Leu Ile Lys
      385                390                395                400
Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr Glu
      405                410

```

<210> 3
 <211> 411
 5 <212> PRT
 <213> *Citrobacter braakii* YH-15

<220>
 <221> mat_péptido
 10 <222> (1)..(411)

<400> 3

```

Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg Val Val Ile Val Ser Arg
  1                    5                    10
His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr Pro Ile Met Lys Asp Val
      20                    25                    30
Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val Pro Leu Gly Trp Leu Thr
      35                    40                    45
Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu Gly Gln Tyr Gln Arg Leu
      50                    55                    60
Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn Gln Thr Cys Pro Ser Pro

```

15

340

345

350

Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile Gln Pro Leu Ser Leu Glu
 355 360 365

Lys Pro Ala Gly Lys Val Asp Leu Lys Leu Ile Ala Cys Glu Glu Lys
 370 375 380

Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser Phe Ser Arg Leu Ile Lys
 385 390 395 400

Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr Glu
 405 410

<210> 4

<211> 411

5 <212> PRT

<213> *Citrobacter freundii*

<220>

<221> mat_péptido

10 <222> (1)..(411)

<400> 4

Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg Val Val Ile Val Ser Arg
 1 5 10 15

His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr Pro Ile Met Lys Asp Val
 20 25 30

Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val Pro Leu Gly Trp Leu Thr
 35 40 45

Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu Gly Gln Tyr Gln Arg Leu
 50 55 60

Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn Gln Thr Cys Pro Ser Pro
 65 70 75 80

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

Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Lys Cys Gln Ile Gln Val
 100 105 110

His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Thr Asp Pro Leu Phe Asn Pro Val
 115 120 125

Lys Met Gly Thr Cys Ser Phe Asn Thr Leu Lys Val Lys Asn Ala Ile
 130 135 140

Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln

15

<220>
<223> Variante de SEC ID NO:1

5 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(1233)

10 <220>
<221> mat_péptido
<222> (1)..(1233)

<400> 5

(Continúa en página siguiente)

gaa Glu 1	gag Glu	cag Gln	aat Asn	ggt Gly 5	atg Met	aaa Lys	ctt Leu	gag Glu	cgg Arg 10	gtt Val	gtg Val	ata Ile	gtg Val	agt Ser 15	cgt Arg	48
cat His	ggr Xaa	gta Val	aga Arg 20	gca Ala	cct Pro	acg Thr	aag Lys	ttc Phe 25	act Thr	cca Pro	ata Ile	atg Met	aaa Lys 30	aat Asn	gtc Val	96
aca Thr	ccc Pro	gat Asp 35	caa Gln	tgg Trp	cca Pro	caa Gln	tgg Trp 40	gat Asp	gtg Val	ccg Pro	tta Leu	gga Gly 45	tgg Trp	cta Leu	acg Thr	144
cct Pro	cgt Arg 50	ggg Gly	gga Gly	gaa Glu	ctt Leu	gtt Val 55	tct Ser	gaa Glu	tta Leu	ggt Gly	cag Gln 60	tat Tyr	caa Gln	cgt Arg	tta Leu	192
tgg Trp 65	ttc Phe	acg Thr	agc Ser	aaa Lys	ggt Gly 70	ctg Leu	ttg Leu	aat Asn	aat Asn	caa Gln 75	acg Thr	tgc Cys	cca Pro	tct Ser	cca Pro 80	240
ggg Gly	cag Gln	gtt Val	gct Ala	gtt Val 85	att Ile	gca Ala	gac Asp	acg Thr	gat Asp 90	caa Gln	cgc Arg	acc Thr	cgt Arg	aaa Lys 95	acg Thr	288
ggt Gly	gag Glu	gcg Ala	ttt Phe 100	ctg Leu	gct Ala	ggg Gly	tta Leu	gca Ala 105	cca Pro	aaa Lys	tgt Cys	caa Gln	att Ile 110	caa Gln	gtg Val	336
cat His	tat Tyr	cag Gln 115	aag Lys	gat Asp	gaa Glu	gaa Glu	aaa Lys 120	aat Asn	gat Asp	cct Pro	ctt Leu	ttt Phe 125	aat Asn	ccg Pro	gta Val	384
aaa Lys 130	atg Met	ggg Gly	aaa Lys	tgt Cys	tcg Ser	ttt Phe 135	aac Asn	aca Thr	ttg Leu	cag Gln	gtt Val 140	aaa Lys	aac Asn	gct Ala	att Ile	432
ctg Leu 145	gaa Glu	cgg Arg	gcc Ala	gga Gly 150	gga Gly	aat Asn	att Ile	gaa Glu	ctg Leu	tat Tyr 155	acc Thr	caa Gln	cgc Arg	tat Tyr	caa Gln 160	480
tct Ser	tca Ser	ttt Phe	cgg Arg	acc Thr 165	ctg Leu	gaa Glu	aat Asn	gtt Val	tta Leu 170	aat Asn	ttc Phe	tca Ser	caa Gln	tcg Ser 175	gag Glu	528
aca Thr	tgt Cys	aag Lys	act Thr 180	aca Thr	gaa Glu	aag Lys	tct Ser	acg Thr 185	aaa Lys	tgc Cys	aca Thr	tta Leu	cca Pro 190	gag Glu	gct Ala	576
tta Leu	ccg Pro	tct Ser 195	gaa Glu	ctt Leu	aag Lys	gta Val	act Thr 200	cct Pro	gac Asp	aat Asn	gta Val	tca Ser 205	tta Leu	cct Pro	ggt Gly	624
gcc Ala	tgg Trp	agt Ser	ctt Leu	tct Ser	tcc Ser	acg Thr	ctg Leu	act Thr	gag Glu	ata Ile	ttt Phe	ctg Leu	ttg Leu	caa Gln	gag Glu	672

	210		215		220		
	gcc cag gga atg cca cag gta gcc tgg ggg cgt att acg gga gaa aaa						720
	Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly Arg Ile Thr Gly Glu Lys						240
	225		230		235		
	gaa tgg aga gat ttg tta agt ctg cat aac gct cag ttt gat ctt ttg						768
	Glu Trp Arg Asp Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe Asp Leu Leu						255
			245		250		
	caa aga act cca gaa gtt gcc cgt agt agg gcc aca cca tta ctc gat						816
	Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp						270
			260		265		
	atg ata gac act gca tta ttg aca aat ggt aca aca gaa aac agg tat						864
	Met Ile Asp Thr Ala Leu Leu Thr Asn Gly Thr Thr Glu Asn Arg Tyr						285
			275		280		
	ggc ata aaa tta ccc gta tct ctg ttg ttt att gct ggt cat gat acc						912
	Gly Ile Lys Leu Pro Val Ser Leu Leu Phe Ile Ala Gly His Asp Thr						290
			295		300		
	aat ctt gca aat tta agc ggg gct tta gat ctt aac tgg tcg cta ccc						960
	Asn Leu Ala Asn Leu Ser Gly Ala Leu Asp Leu Asn Trp Ser Leu Pro						305
			310		315		320
	ggt caa ccs gat aay acc ccg ccg ggc gac aag ctt gta ttc gaa aag						1008
	Gly Gln Xaa Asp Asn Thr Pro Pro Gly Asp Lys Leu Val Phe Glu Lys						325
			330		335		
	tgg aaa aga acc agt gat aat acg gat tgg gtt cag gtt tca ttt gtt						1056
	Trp Lys Arg Thr Ser Asp Asn Thr Asp Trp Val Gln Val Ser Phe Val						340
			345		350		
	tat cag acg ctg aga gat atg agg gat ata caa ccg ttg tcg tta gaa						1104
	Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile Gln Pro Leu Ser Leu Glu						355
			360		365		
	aaa cct gct ggc aaa gtt gat tta aaa tta att gca tgt gaa gag aaa						1152
	Lys Pro Ala Gly Lys Val Asp Leu Lys Leu Ile Ala Cys Glu Glu Lys						370
			375		380		
	aat agt cag gga atg tgt tcg tta aaa agt ttt tcc agg ctc att aag						1200
	Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser Phe Ser Arg Leu Ile Lys						385
			390		395		400
	gaa att cgc gtg cca gag tgt gca gtt acg gaa taa						1236
	Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr Glu						405
			410				

<210> 6
 <211> 411
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (18)..(18)
 <223> El 'Xaa' en la ubicación 18 representa Gly.

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (323)..(323)
 <223> el ' Xaa' en la ubicación 323 representa Pro.

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 6

5

(Continúa en página siguiente)

ES 2 531 434 T3

Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg Val Val Ile Val Ser Arg
 1 5 10 15

His Xaa Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr Pro Ile Met Lys Asn Val
 20 25 30

Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val Pro Leu Gly Trp Leu Thr
 35 40 45

Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu Gly Gln Tyr Gln Arg Leu
 50 55 60

Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn Gln Thr Cys Pro Ser Pro
 65 70 75 80

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

Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Lys Cys Gln Ile Gln Val
 100 105 110

His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Asn Asp Pro Leu Phe Asn Pro Val
 115 120 125

Lys Met Gly Lys Cys Ser Phe Asn Thr Leu Gln Val Lys Asn Ala Ile
 130 135 140

Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln
 145 150 155 160

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

Thr Cys Lys Thr Thr Glu Lys Ser Thr Lys Cys Thr Leu Pro Glu Ala
 180 185 190

Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Thr Pro Asp Asn Val Ser Leu Pro Gly
 195 200 205

Ala Trp Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu Gln Glu
 210 215 220

Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly Arg Ile Thr Gly Glu Lys
 225 230 235 240

Glu Trp Arg Asp Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe Asp Leu Leu
 245 250 255

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

ES 2 531 434 T3

Met·Ile Asp·Thr·Ala·Leu Leu Thr Asn Gly Thr Thr Glu Asn Arg Tyr ·
 275 280 285

Gly Ile Lys Leu Pro Val Ser Leu Leu Phe Ile Ala Gly His Asp Thr
 290 295 300

Asn Leu Ala Asn Leu Ser Gly Ala Leu Asp Leu Asn Trp Ser Leu Pro
 305 310 315 320

Gly Gln Xaa Asp Asn Thr Pro Pro Gly Asp Lys Leu Val Phe Glu Lys
 325 330 335

Trp Lys Arg Thr Ser Asp Asn Thr Asp Trp Val Gln Val Ser Phe Val
 340 345 350

Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile Gln Pro Leu Ser Leu Glu
 355 360 365

Lys Pro Ala Gly Lys Val Asp Leu Lys Leu Ile Ala Cys Glu Glu Lys
 370 375 380

Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser Phe Ser Arg Leu Ile Lys
 385 390 395 400

Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr Glu
 405 410

<210> 7
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Citrobacter braakii* ATCC 51113

5
 <220>
 <221> sig_péptido
 <222> (1)..(66)

10
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(66)

15
 <400> 7

atg agt aca ttc atc att cgt tta tta ttt ttt tct ctc tta tgc ggt 48
 Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

tct ttc tca ata cat gct 66
 Ser Phe Ser Ile His Ala
 20

20
 <210> 8
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Citrobacter braakii* ATCC 51113

25
 <400> 8

ES 2 531 434 T3

Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ser Phe Ser Ile His Ala
20

<210> 9

<211> 433

5 <212> PRT

<213> *Citrobacter freundii* NCIMB 41247

<220>

<221> mat_péptido

10 <222> (1)..(433)

<400> 9.

(Continúa en página siguiente)

ES 2 531 434 T3

Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ser Phe Ser Ile His Ala Glu Glu Pro Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg
 20 25 30

Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr
 35 40 45

Pro Ile Met Lys Asp Val Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val
 50 55 60

Pro Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu
 65 70 75 80

Gly Gln Tyr Gln Arg Leu Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn
 85 90 95

Gln Thr Cys Pro Ser Pro Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp
 100 105 110

Gln Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro
 115 120 125

Lys Cys Gln Ile Gln Val His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Thr Asp
 130 135 140

Pro Leu Phe Asn Pro Val Lys Met Gly Thr Cys Ser Phe Asn Thr Leu
 145 150 155 160

Lys Val Lys Asn Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu
 165 170 175

Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln Ser Ser Phe Arg Thr Leu Glu Asn Val Leu
 180 185 190

Asn Phe Ser Gln Ser Glu Thr Cys Lys Thr Thr Glu Lys Ser Thr Lys

ES 2 531 434 T3

```

      195                200                205
Cys Thr Leu Pro Glu Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Thr Pro Asp
 210                215                220
Asn Val Ser Leu Pro Gly Ala Trp Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Glu
 225                230                235                240
Ile Phe Leu Leu Gln Glu Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly
 245                250                255
Arg Ile Thr Gly Glu Lys Glu Trp Arg Asp Leu Leu Ser Leu His Asn
 260                265                270
Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg
 275                280                285
Ala Thr Pro Leu Leu Asp Met Ile Asp Thr Ala Leu Leu Thr Asn Gly
 290                295                300
Thr Thr Glu Asn Arg Tyr Gly Ile Lys Leu Pro Val Ser Leu Leu Phe
 305                310                315                320
Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Ser Gly Ala Leu Asp
 325                330                335
Leu Asn Trp Ser Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly
 340                345                350
Glu Leu Val Phe Glu Lys Trp Lys Arg Thr Ser Asp Asn Thr Asp Trp
 355                360                365
Val Gln Val Ser Phe Val Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile
 370                375                380
Gln Pro Leu Ser Leu Glu Lys Pro Ala Gly Lys Val Asp Leu Lys Leu
 385                390                395                400
Ile Ala Cys Glu Glu Lys Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser
 405                410                415
Phe Ser Arg Leu Ile Lys Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr
 420                425                430

```

Glu

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 114-124 de la fitasa madura

10 <220>

<221> TURN

<222> (1)..(11)

ES 2 531 434 T3

<223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 114-124 de la fitasa madura

<400> 10

His Gln Glu Lys Met Gly Thr Met Asp Pro Thr
 1 5 10

5

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 114-124 de la fitasa madura

15

<220>
 <221> TURN
 <222> (1)..(11)
 <223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 114-124 de la fitasa madura

<400> 11

His Gln Gln Asp Ile Lys Gln Val Asp Ser Leu
 1 5 10

20

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 114-124 de la fitasa madura

30

<220>
 <221> TURN
 <222> (1)..(11)
 <223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 114-124 de la fitasa madura

35

<400> 12

His Gln Pro Glu Ile Gly Lys Met Asp Pro Val
 1 5 10

40

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 114-124 de la fitasa madura

50

<220>
 <221> TURN
 <222> (1)..(11)
 <223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 114-124 de la fitasa madura

<400> 13

Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu
 1 5 10

55

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60

<220>
 <223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 114-124 de la fitasa madura

ES 2 531 434 T3

<220>

<223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 179-186 de la fitasa madura

5

<220>

<221> TURN

<222> (1)..(4)

<223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 179-186 de la fitasa madura

10

<220>

<221> TURN

<222> (1)..(5)

15 <223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 179-186 de la fitasa madura

<400> 18

Gly Glu Asp Lys Pro
1 5

20

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 179-186 de la fitasa madura

30

<220>

<221> TURN

<222> (1)..(5)

<223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 179-186 de la fitasa madura

<400> 19

Asn Gly Ile Ser Ala
1 5

35

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 179-186 de la fitasa madura

45

<220>

<221> TURN

<222> (1)..(5)

<223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 179-186 de la fitasa madura

50

<400> 20

Ile Ala Gly Lys Ser
1 5

55

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 179-186 de la fitasa madura

<220>

<221> TURN

ES 2 531 434 T3

<222> (1)..(5)

<223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 179-186 de la fitasa madura

<400> 21

5

Lys Glu Lys His Gln
1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 179-186 de la fitasa madura

15

<220>

<221> TURN

<222> (1)..(5)

<223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 179-186 de la fitasa madura

20

<400> 22

Lys Glu Lys Gln Gln
1 5

<210> 23

<211> 5

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 179-186 de la fitasa madura

30

<220>

<221> TURN

<222> (1)..(5)

<223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 179-186 de la fitasa madura

35

<400> 23

Lys Glu Lys Lys Val
1 5

<210> 24

<211> 5

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 179-186 de la fitasa madura

<220>

<221> TURN

<222> (1)..(5)

50 <223> Para reemplazar el bucle desde las posiciones 179-186 de la fitasa madura

<400> 24

Lys Thr Asp Lys Leu
1 5

55

REIVINDICACIONES

1. Fitasa que tiene al menos 85% de identidad a la SEC ID NO:2, que tiene una termoestabilidad mejorada indicada como actividad residual determinada por división de un sobrenadante de fermentación en dos partes, una parte se incubaba durante 30 minutos a 60°C, y la otra parte durante 30 minutos a 5°C, tras lo cual la actividad de ambas se determina en el fosfato de p-nitrofenilo a 37°C y pH 5.5, donde la actividad residual de la fitasa es la actividad de la muestra que ha sido incubada a 60°C dividido por la actividad de la misma muestra que ha sido incubada a 5°C, donde la actividad residual de la fitasa es al menos 120% de la actividad residual de la SEC ID NO: 2 de fitasa de referencia, medido en las mismas condiciones, y que comprende al menos una alteración en comparación con la SEC ID NO:2 en al menos una posición seleccionada de las siguientes:
- G52C/A99C, K141C/V199C, G59C/F100C, Q91C/W46C, N31C/E176C, N31C/T177C, y/o S162C/S247C, donde el grado de identidad entre secuencias, se determina por el programa "Needle" utilizando la matriz de sustitución BLOSUM62, la penalización de abertura de gap es 10, y la penalización de extensión de gap es 0.5.
2. Fitasa según la reivindicación 1, donde los aminoácidos en la posición 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, y 186 han sido sustituidos por QADKP, GEDKP, NGISA, IAGKS, KEKHQ, KEKQQ, KEKKV, o KTDKL.
3. Fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende una alteración seleccionada de las siguientes: 4P, 5P, 111P, 137P, 161P, 52E, 57Y, 76G, 107D, 107G, 109A, 1*, 1*/2*, 1*/2*/3*, 121T, 273L, 285G, 286Q, 299L, 362K, 331K/55D, 107E, 46E, 82E, 119R, 119K, 164E, 223E, 276R, 276K, 362R, 379R, 379K, 385D, 410D, 410E, 411 R, 411 K, 53V, 121 D, 167Q, 196Q, 200K, 202N, 218Q, 241Q, 285N, 314N, 314G, 406A, 179K/180E/181K/182H/183Q/184*/185*/186*, 179K/180E/181K/182Q/183Q/184*/185*/186*, 179K/180E/181K/182K/183V/184*/185*/186*, 179K/180T/181D/182K/183L/184*/185*/186*, 111P/241Q, 1K, 114T/115Q/116A/117D/118T/119S/120S/121 P/122D/123P/124L, y 114T/115Q/116T/117D/118T/119S/120S/121 P/122D/123P/124L, donde el símbolo "*" significa que el residuo de aminoácido en la posición indicada es eliminado.
4. Fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que es una variante de la fitasa de SEC ID NO:2, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:6, o SEC ID NO:9.
5. Fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que comprende además una sustitución o una combinación de sustituciones seleccionadas de entre las sustituciones y combinaciones de sustituciones catalogadas en cada fila de la Fig.1
6. Ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de ácidos nucleicos según la reivindicación 6 operativamente enlazada a una o más secuencias de control que dirigen la producción de la fitasa en un huésped de expresión adecuado.
8. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 7.
9. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 7 y/o el vector de expresión según la reivindicación 8.
10. Método para la producción de la fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende
- (a) el cultivo de la célula huésped según la reivindicación 9 para producir un sobrenadante que comprende la fitasa; y
- (b) la recuperación de la fitasa.
11. Planta transgénica, o parte de planta, que ha sido transformada con un ácido nucleico según la reivindicación 3 o 4, capaz de expresar una fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
12. Animal transgénico no humano, o productos, o elementos del mismo, que ha sido transformado con un ácido nucleico según la reivindicación 6 o 7, siendo capaz de expresar una fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
13. Composición que comprende al menos una fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y
- (a) al menos una vitamina soluble en grasa;

- (b) al menos una vitamina soluble en agua; y/o
- (c) al menos un oligoelemento.

- 5 14. Composición según la reivindicación 13 que comprende además al menos una enzima seleccionada del siguiente grupo de enzimas: amilasa, fitasa, fosfatasa, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasas, fosfolipasas, y/o beta-glucanasas.
- 15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-14 que es un aditivo para alimentación animal.
- 10 16. Composición alimentaria para animales con un contenido de proteína cruda de 50 a 800 g/kg y que comprende la fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-15.
- 15 17. Método para mejorar el valor nutricional de un alimento para animales, donde la fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-15 se añade al alimento.
- 20 18. Proceso para reducir niveles de fitato en el abono animal que comprende alimentar a un animal con una cantidad eficaz del alimento según la reivindicación 16.
- 20 19. Método para el tratamiento de proteínas vegetales, que comprende el paso de añadir la fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-15 a por lo menos una proteína vegetal o fuente de proteína.
- 25 20. Uso de la fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-15 en alimentos para animales; en la preparación de alimentos para animales; para mejorar el valor nutricional de alimentos para animales; para reducir los niveles de fitato en el abono animal; para el tratamiento de proteínas vegetales; o para liberar fósforo de un sustrato de fitasa.

Variante
P229S
D112V
Q82R
Q274H
D112Y
F88Y
K46E
S233C
R288M
I384L
Q385R
Q274L
E307Y
T199I
Q82K
T203I
K46E/Q82H
Q82K/V105I
N148D/T362I
K46E/L414I
F88Y/Y136N
N95P/N96S

Fig. 1

N95P/N96P
Q97T/T98G
Y177F/T199I
Q274L/Q370H
K46E/N96Y
N148D/L301S
E24D/R288M
E140V/A322V
K46E/S195T
E75K/N365D
T98P/S235A
L160F/L215F
Q274L/K395T
G67R/Q279E/N308T
K161N/P229S/R288M
D53N/D57Y/M152V
F122Y/S156T/P229S
E23K/K46E/Q82H
K46E/Q82H/Q385R
T203W/E204N/K205R
T203W/E204H/K205R
T203W/E204R/K205R
T203W/E204A/K205R
A22T/K151G/N308D
E23K/E75K/F88Y
M152K/N225D/L301S
S78T/Q274L/S408I
L176Q/T199I/T366S
K46E/V77I/T203S
K46R/T199I/D367N
G74R/E204G/R288M
A22T/T199I/S206T/T207A

Fig. 1 (cont.)

Q82R/F88Y/L126I/I384L
K46E/Q82H/E168D/Q274L
Q82K/T154I/Q279E/N308T
Q82R/D112V/Q274H/T362A
E24D/E79V/N95D/K360N
E23K/M28L/A109T/T143P/I384L
D53N/D57Y/T199I/P229S/R288M
K46E/Q82H/N148D/T154I/T362I
D53N/D57Y/P229S/R288M/K358R
D53N/D57Y/T154I/P229S/R288M
Y136N/T199I/T203L/E204I/K205P
E23Q/S101F/Q274L/I384M/K391N
K46E/Q82H/N95D/D112V/K142R/D383V
D53N/D57Y/M152V/P229S/R288M/A393P
D53K/D57Y/M152V/P229S/R288M/A393P
D53N/D57Y/F88Y/M152V/P229S/Q279E/N308T
D53N/D57Y/M152V/E204V/P229S/R288M/A393P
D53N/D57Y/M152V/T154I/P229S/R288M/A393P
D53N/D57Y/Q82H/G103E/M152V/P229S/R288M/A393P
K46E/D53N/D57Y/T143I/M152V/L176V/P229S/R288M/A393P
Q82K/F88Y/N96P/Q97I/T98G/V105I/Q274H/Q279E/A393P
Q82R/F88Y/N95P/N96P/Q97I/Q279E/I384L/P386Q/A393P
D53N/D57Y/E75V/M152V/A170T/P229S/R288M/Q385R/A393P
Q82K/F88Y/N96P/T98G/Y136N/M152V/Y177F/T362I/I384F/A393P/D397 N
D53N/D57Y/F88Y/N95P/N96P/V105I/D112V/Y136N/N148D/N164D/Q274 H/T362I/I384L/A393P
D53N/D57Y/Q82K/F88Y/N95P/P102L/V105I/Y136N/N148D/Y177F/Q274 H/Q279E/T362I/A393P
D53N/D57Y/Q82K/F88Y/N96P/T98G/V105I/D112V/Y177F/Q274L/G343A /T362I/I384L/A393P

Fig. 1 (cont.)

SEC2	1	EEQNGMKLERVVIVSRHGVRAPTKFTPI	28
SEC9	1	MSTFIIRLLFFSLLCGSFSIHAEENGMKLERVVIVSRHGVRAPTKFTPI	50
SEC2	29	MKNVTPDQWPQWDVPLGWLTPRGGELVSELGQYQRLWFTSKGLLNNQTCP	78
SEC9	51	MKDVTDPQWPQWDVPLGWLTPRGGELVSELGQYQRLWFTSKGLLNNQTCP	100
SEC2	79	SPGQVAVIADTDQRTRKTGEAFLAGLAPKCQIQVHYQKDEEKNDPLFNPV	128
SEC9	101	SPGQVAVIADTDQRTRKTGEAFLAGLAPKCQIQVHYQKDEEKNDPLFNPV	150
SEC2	129	KMGKCSFNTLQVKNAILERAGGNIELYTORYOSSFRLENVLFNSQSETC	178
SEC9	151	KMGKCSFNTLQVKNAILERAGGNIELYTORYOSSFRLENVLFNSQSETC	200
SEC2	179	KTTEKSTKCTLPEALPSELKVTPDNVSLPGAWLSSTLTEIFLLQEAQGM	228
SEC9	201	KTTEKSTKCTLPEALPSELKVTPDNVSLPGAWLSSTLTEIFLLQEAQGM	250
SEC2	229	PQVAWGRITGEKEWRDLLSLHNAQFDLLQRTPEVARSRATPLLDMIDTAL	278
SEC9	251	PQVAWGRITGEKEWRDLLSLHNAQFDLLQRTPEVARSRATPLLDMIDTAL	300
SEC2	279	LTNGTTENRYGIKLPVSLFIAGHDINLANLSGALDLNWSLPGQPDNTPP	328
SEC9	301	LTNGTTENRYGIKLPVSLFIAGHDINLANLSGALDLNWSLPGQPDNTPP	350
SEC2	329	GGELVFKEKWKRTSDNTDWVQVSFVYQTLRDMRDIQPLSLEKPAKVDLKL	378
SEC9	351	GGELVFKEKWKRTSDNTDWVQVSFVYQTLRDMRDIQPLSLEKPAKVDLKL	400
SEC2	379	IACEEKNSQGMCSLKSFSRLIKEIRVPECAVTE	411
SEC9	401	IACEEKNSQGMCSLKSFSRLIKEIRVPECAVTE	433

Fig. 2