

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 645**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2009** **E 13170321 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015** **EP 2650364**

54 Título: **Variantes de fitasa de Hafnia**

30 Prioridad:

26.09.2008 EP 08165245

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

02.09.2015

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**LASSEN, SOEREN FLENSTED;
SKOV, LARS KOBBEROEE;
DE MARIA, LEONARDO;
MATSUI, TOMOKO;
NOERGAARD, ALLAN;
VIND, JESPER y
FRIIS, ESBEN PETER**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 544 645 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 de *Hafnia*

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a una fitasa que tiene al menos 90% de identidad con una fitasa derivada de *Hafnia alvei*, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en el listado de secuencias anexo como SEQ ID N.º: 2 y comprende al menos una modificación tal y como se define en las reivindicaciones anexas en comparación con esta fitasa (es decir, es una variante de la misma). La invención también se refiere al ADN que codifica estas fitasas, constructos de ácidos nucleicos, vectores y células huéspedes que comprenden los polinucleótidos al igual que métodos de su producción, al igual que su uso, por ejemplo, en alimento para animales y aditivos de alimento para animales.

15 **Antecedentes de la invención**

Estado de la técnica

[0002] Las fitasas son enzimas bien conocidas, como lo son las ventajas de añadirlas a productos alimenticios para animales, incluidos seres humanos. Las fitasas se han aislado de muchas fuentes, incluidas varias cepas fúngicas y bacterianas.

[0003] Un objeto de la presente invención es proporcionar polipéptidos alternativos con actividad de fitasa (fitasas) y polinucleótidos que codifiquen los polipéptidos. Las variantes de fitasa de la invención exhiben propiedades modificadas o alteradas preferiblemente mejoradas en comparación con la fitasa progenitora. Ejemplos no limitativos de tales propiedades son: estabilidad (tal como estabilidad del ácido, estabilidad térmica, estabilidad de vapor, estabilidad de granulación y/o estabilidad de proteasa, en particular estabilidad de pepsina), perfil de temperatura, perfil de pH, actividad específica, especificidad de sustrato, rendimiento en alimento para animales (tal como una liberación y/o degradación mejoradas de fitato), susceptibilidad para glicación y/o modelo de glicosilación.

[0004] Se conocen varias estructuras tridimensionales de fitasas del tipo fosfato de ácido de histidina (HAP). (por ejemplo, Lim et al. Nature struct. biol. 7, 108-113 (2000). Estas fitasas están estructuralmente relacionadas, pero hay diferencias bastante grandes en las secuencias de aminoácidos.

[0005] WO2008116878 divulga la secuencia de aminoácidos de la fitasa HAP de tipo salvaje de *Hafnia alvei* DSM 19197 (es decir, SEQ ID N.º:2 en la presente), como SEQ ID N.º:10 en WO2008116878. La estructura tridimensional de la fitasa HAP de tipo salvaje de *Hafnia alvei* DSM 19197 también está descrita en WO2008116878. La estructura se corresponde correctamente con las estructuras conocidas.

[0006] Es un objeto de la invención proporcionar fitasas de propiedades modificadas, preferiblemente, mejoradas en comparación con la fitasa progenitora o de referencia de las cuales éstas fueron derivadas.

Resumen del listado de secuencias

[0007] En el listado de secuencias, SEQ ID N.º:1 y 2 proporcionan ADN y secuencias de aminoácidos para la fitasa de *Hafnia alvei* DSMZ 19197.

Resumen de ejemplos

[0008] En la especificación se proporcionan los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1: preparación de variantes y determinación de actividad

Ejemplo 2: actividad específica

Ejemplo 3: estabilidad de temperatura

55 Ejemplo 4: termoestabilidad

Ejemplo 5: perfil de temperatura

Ejemplo 6: perfil de pH

Ejemplo 7: estabilidad de vapor

Ejemplo 8: actividad residual de glicación

Ejemplo 9: pruebas de estabilidad de granulación

Ejemplo 10: rendimiento en el alimento para animales en un modelo *in vitro* para pollo para consumo

Ejemplo 11: rendimiento en una prueba de cerdo *in vivo*

5 Resumen de la invención

[0009] La presente invención se refiere a un método para producir una variante de la fitasa de una fitasa de referencia o progenitora, con propiedades mejoradas con respecto al perfil de pH y teniendo al menos 90% de identidad con SEQ ID N.º:2, donde dicha variante muestra al menos una sustitución, inserción o delección en una o más de las posiciones: 92, 48, 26, 45, 49, 68, 100, 162, 217, 228, 304, 308, y 358, donde las posiciones corresponden a las posiciones de la fitasa con los aminoácidos 1-413 de SEQ ID N.º:2. El método comprende

- a) mutación del ADN o gen que codifica la fitasa progenitora de una manera que por la cual el ADN o el gen codifican para dicha sustitución, inserción y/o delección,
- b) la conexión operativa de dicho ADN o gen a una o más secuencias de control que dirigen la producción de la fitasa en un huésped de expresión adecuado para crear un constructo de ADN o un vector de expresión recombinante,
- c) transferencia de dicho constructo o vector a un huésped adecuado,
- d) cultivo de dicho huésped para producir la fitasa variante y recuperación de la fitasa.

[0010] La invención además se refiere a una variante de fitasa con al menos 90% de identidad a SEC ID NO:2 y teniendo propiedades mejoradas respecto al perfil de pH como se determina a 37°C midiendo la actividad relativa hasta la actividad máxima, se mejora en comparación con el perfil de pH de la fitasa de SEC ID NO:2, y producida según el método indicado arriba, con la condición de que la fitasa no sea la fitasa de *Hafnia alvei* con los aminoácidos 1-413 de SEC ID NO:2 y que comprenden al menos una modificación en al menos una posición seleccionada de las siguientes: 92, 48, 26, 45, 49, 68, 100, 162, 217, 228, 304, 308, y 358; y al menos otra modificación en al menos una posición seleccionada de las siguientes: 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 18, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 45, 48, 49, 54, 55, 59, 63, 64, 66, 68, 69, 70, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 89, 91, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 103, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 138, 139, 140, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 168, 172, 173, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 189, 190, 192, 193, 194, 195, 196, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 215, 217, 219, 221, 224, 227, 228, 230, 233, 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 251, 256, 258, 259, 260, 261, 266, 268, 270, 279, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 301, 303, 304, 308, 310, 312, 313, 314, 316, 318, 319, 320, 322, 324, 325, 326, 331, 335, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 354, 355, 356, 358, 360, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 378, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 394, 395, 396, 397, 400, 401, 403, 404, 406, 408, 409, 411, 412, y 413, con la condición de que la fitasa no sea la fitasa con los aminoácidos 1-413 de SEC ID NO:2..

[0011] La invención específicamente se refiere a un método como se ha indicado anteriormente, donde las modificaciones son seleccionadas de las siguientes sustituciones o inserciones: 92Y, 48H,W,N, 26R,Q,H, 49L, 100W, 162N,R, 217S,G, 304V, 308A, y 358C.

[0012] La variante de fitasa de la invención puede comprender al menos una modificación seleccionada de las siguientes: 228C, 325C, 358C, y 363C, o al menos un conjunto de modificaciones seleccionadas de las siguientes: 325C/358C, y 228C/363C.

[0013] Las variantes de fitasa descritas presentan propiedades modificadas o alteradas preferiblemente mejoradas en comparación con la fitasa progenitora. Ejemplos no limitativos de tales propiedades son: estabilidad (tal como estabilidad al ácido, estabilidad térmica, estabilidad de vapor, y/o estabilidad de proteasa, en particular estabilidad de pepsina), perfil de temperatura, perfil de pH, actividad específica, especificidad de sustrato, rendimiento en alimento para animales (tal como una liberación mejorada y/o degradación de fitato), susceptibilidad a glicación, y/o modelo de glicosilación. Las variantes de fitasa de la invención presentan propiedades mejoradas respecto al perfil de pH.

[0014] La invención también se refiere a ADN que codifica estas fitasas, métodos de su producción, al igual que el uso de los mismos, por ejemplo, en el alimento para animales y aditivos de alimento para animales.

55

Descripción detallada de la invención

[0015] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una variante de fitasa de una fitasa de referencia o progenitora, con propiedades mejoradas con respecto al perfil de pH y con al menos 90 % de identidad con SEQ ID N.º:2, donde dicha variante muestra al menos una sustitución, inserción o delección en una o más de las posiciones: 92, 48, 26, 45, 49, 68, 100, 162, 217, 228, 304, 308 y 358, donde las posiciones corresponden a las posiciones de la fitasa con los aminoácidos 1-413 de SEQ ID N.º:2, el método comprende

60

- a) mutación del ADN o gen que codifica la fitasa progenitora de una manera que por la cual el ADN o el gen codifican para dicha sustitución, inserción y/o delección,
 b) la conexión operativa de dicho ADN o gen a una o más secuencias de control que dirigen la producción de la fitasa en un huésped de expresión adecuado para crear un constructo de ADN o un vector de expresión recombinante,
 5 c) transferencia de dicho constructo o vector a un huésped adecuado,
 d) cultivo de dicho huésped para producir la fitasa variante y recuperación de la fitasa. El porcentaje de identidad se determina como se describe en la sección "Polipéptidos de fitasa, porcentaje de identidad".
- 10 [0016] Los números de posición se refieren a la numeración de posición de la SEQ ID N.º:2, como se describe en la sección "Numeración de posición." Las posiciones correspondientes a estos números de posición SEQ ID N.º:2 en otras fitasas se determinan como se describe en la sección "Identificación de los números de posición correspondientes."
- [0017] La fitasa de la invención como se produce por el método es una variante de la fitasa de la SEQ ID N.º:2, a saber,
 15 no es idéntica a la SEQ ID N.º:2, puesto que comprende al menos una modificación en comparación con la SEQ ID N.º:2.
- [0018] En una forma de realización particular, la fitasa de la invención comprende al menos una de las siguientes modificaciones: 92Y, 48H,W,N, 26R,Q,H, 49L, 100W, 162N,R, 217S,G, 304V, 308A, y 358C.
 20
- [0019] La nomenclatura usada en este documento para las modificaciones se describe en detalle en la sección "Modificaciones, tales como sustituciones, delecciones, inserciones".
- [0020] Preferiblemente la fitasa de la invención que muestra termoestabilidad mejorada comprende al menos una de las siguientes modificaciones: 228C, 325C, 358C, y 363C. Específicamente comprende conjuntos de modificaciones seleccionadas de las siguientes: 325C/358C, y 228C/363C.
- [0021] La fitasa puede también comprender una modificación seleccionada de la siguiente: 49L.
- 30 [0022] En formas de realización preferidas, la fitasa comprende las siguientes combinaciones de modificaciones: 54C/55E/101C, 33C/178E/179C, y 33C/175S/176Q/178E/179C
- [0023] La fitasa de la invención puede ser una variante de cualquier fitasa variante o de tipo salvaje.
- 35 [0024] Específicamente para la fitasa de SEQ ID N.º:2, se incluyen las siguientes modificaciones específicas:
 T35C, P36C, F63C, L172C, S177C, P178C, F224C, H228C, A236C, Q326C, P331C, T358C, L368C, y A374C, y las siguientes variantes de combinación:
 40 F8C/D343C, P178C/D33C, F63C/L368C, F224C/A236C, P331C/Q326C, T358C/G325C, H228C/H363C, y L368C/A374C. La invención también se refiere a variantes de fitasa como se ha indicado anteriormente que muestra al menos otra modificación (sustitución, inserción o delección) en una o más de las posiciones: 1, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 16,
 18, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 37, 38, 39, 40, 41, 45, 48, 49, 55, 59, 64, 68, 69, 70, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80,
 81, 82, 83, 89, 91, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 103, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121,
 45 122, 123, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 136,137, 138, 140, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 168, 173, 175, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 189, 190, 192, 193, 194, 195, 196, 198, 199, 200, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 215, 217, 219, 221, 227, 230, 233, 234, 235, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 251, 256, 258, 260, 261, 266, 268, 270, 279, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 301, 303, 304, 308, 310, 312, 313, 314, 316, 318, 319, 320,
 50 322, 324, 335, 344, 345, 346, 347, 348, 354, 355, 356, 360, 362, 364, 365, 366, 367, 369, 371, 372, 373, 375, 376, 378, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 394, 395, 396, 397, 400, 401, 403, 404, 406, 408, 409, 411, 412, y 413, donde las posiciones corresponden a las posiciones de la fitasa con los aminoácidos 1- 413 de SEC ID NO:2...
- [0025] La invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica la fitasa de cualquiera de las reivindicaciones 3-11.
 55
- [0026] La invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos indicadas más arriba, vectores de expresión recombinantes que comprenden los constructos de ácidos nucleicos y células huésped recombinantes que comprenden los constructos de ácidos nucleicos y/o los vectores de expresión anteriores.
 60
- [0027] La invención también se refiere a composiciones que comprenden al menos una fitasa de cualquiera de las reivindicaciones 3-11 y

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

5 [0028] La invención también se refiere a tales composiciones que además comprenden al menos una enzima seleccionada del siguiente grupo de enzimas: amilasa, fitasa, fosfatasa, xilanasa, galactanasa, alfa-galactosidasa, proteasa, fosfolipasa y/o beta-glucanasa. Tales composiciones pueden ser aditivos de alimento para animales.

10 [0029] La invención también se refiere a un método para producir un producto de fermentación, que comprende (a) fermentación usando un microorganismo fermentador de un material que contiene carbohidrato en presencia de una fitasa de cualquiera de reivindicaciones 3-11 y (b) producción del producto de fermentación o coproducto de fermentación del carbohidrato fermentado que contiene material.

[0030] Dicho producto de fermentación puede ser etanol, cerveza, vino, o granos de destilería desecados (DDG).

15

Estrategia para preparar variantes

[0031] La estructura de la fitasa de *H. alvei* DSM 19197 (aminoácidos 1 a 413 de SEQ ID N.º:2) se describe en WO2008116878.

20

[0032] La estructura fue sometida a simulaciones de dinámica molecular (DM) y cálculos electroestáticos. Las posiciones para puentes disulfuro putativos y prolina 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.

25

[0033] Todas estas sugerencias fueron evaluadas dentro del marco de la estructura modelada y los resultados de la simulación, para la propiedad de termoestabilidad con énfasis particular al final de temperatura alta.

30 [0034] Las variantes de fitasa correspondientes fueron preparadas a través de métodos conocidos en la técnica y evaluadas como se describe en la parte experimental.

Polipéptidos de fitasa, porcentaje de identidad

35 [0035] 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 penta-fosfatos de los mismos y (3) fosfato inorgánico.

[0036] En el presente contexto el término sustrato de fitasa abarca, por ejemplo, ácido fítico y cualquier fitato (sal de ácido fítico), así como los fosfatos listados en el punto (2) más arriba.

40

[0037] 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 Enzimática) (Bairoch A. The ENZYME database, 2000, Nucleic Acids Res 28:304-305). Véase también el manual Enzyme Nomenclature de NC-IUBBM, 1992).

45

[0038] 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-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.

50

[0039] En particular, las fitasas de la invención pertenecen a la familia de fosfatasas ácidas histidina (HAP), 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 fosfatasas ácidas 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.

60

[0040] 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 (véanse los aminoácidos 18 a 24 de la SEQ ID N.º: 2).

[0041] Para los fines de la presente invención, la actividad de fitasa se determina en la unidad de FYT, siendo una 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 ($C_6 H_6 O_{24} P_6 Na_{12}$) en una concentración de 0,0050 mol/l. Ensayos de fitasa adecuados son los ensayos FYT y FTU descritos en el Ejemplo 1 de WO 00/20569. FTU es para determinar la actividad de fitasa en el alimento para animales y premezclas. La actividad de fitasa también puede ser determinada usando los ensayos del Ejemplo 1 ("Determinación de la actividad de la fosfatasa" o "Determinación de la actividad de la fitasa").

[0042] En 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 esté 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.

[0043] 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 espacio es 10 y la penalización por extensión de espacio es 0,5.

[0044] 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 (SEQ ID N.º: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 SEQ ID N.º:2, la que sea más corta. El resultado se expresa en porcentaje de identidad.

[0045] Una coincidencia exacta ocurre cuando la "secuencia de la invención" y la SEQ ID N.º: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 (por ejemplo, la longitud de los aminoácidos 1-413 de la SEQ ID N.º:2 es 413).

[0046] Para obtener una explicación más detallada, se hace referencia a WO 2007/112739 en la página 7, línea 24 a página 8, línea 5.

[0047] En formas de realización particulares de la fitasa de la invención, el grado de identidad con SEQ ID N.º:2 es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o al menos 99%. En otras formas de realización particulares adicionales, 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%.

[0048] En particular, la fitasa de la invención no tiene más que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o no más de 10 modificaciones en comparación con SEQ ID N.º:2 no más de 11, 12, 13, modificaciones en comparación con SEQ ID N.º:2.

Numeración de posición

[0049] La nomenclatura usada en este documento para definir las posiciones de aminoácidos se basa en la secuencia de aminoácidos de la fitasa derivada de *Hafnia alvei* DSM 19197, cuya secuencia madura se da en el listado de secuencia como la SEQ ID N.º:2 (aminoácidos 1-413 de la SEQ ID N.º:2). Por consiguiente, en el presente contexto, la base para numerar posiciones es SEQ ID N.º:2 comenzando con S1 y finalizado con P413.

[0050] 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 (por ejemplo, SignalP). La SEQ ID N.º: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.

Modificaciones, tal como sustituciones, deleciones, inserciones

5 [0051] Una variante de fitasa puede comprender varios tipos de modificaciones en relación a un molde (es decir, una fitasa de referencia o progenitora, o una secuencia de aminoácidos comparativa tal como la SEQ ID N.º:2): un aminoácido puede ser sustituido por otro aminoácido; un aminoácido puede ser eliminado; un aminoácido puede ser insertado entre dos residuos; al igual que cualquier combinación de cualquier número de modificaciones de este tipo. En el presente contexto, el término "inserción" tiene como objetivo abarcar también las extensiones N- y/o C-terminales.

10 [0052] La nomenclatura general usada en este documento para una única modificación 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 a continuación que describe ejemplos puramente hipotéticos de la aplicación de esta nomenclatura para varios tipos de modificaciones.

15 Tabla 1 Ejemplos de nomenclatura

Tipo	Descripción	Ejemplo
Sustitución	X=Aminoácido en molde D=Posición en el molde c vacío Y=Amino ácido en la variante	G80A 80 AALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSG : AALNNSIAVLGVAPSAELYAVKVLGASGSG
Inserción	X="*" D=Posición en el molde antes de la inserción c="a" para primera inserción a esta posición, "b" para siguiente, etc.	*80aT *80bY *85aS 80 85 AALNNSIG..VLGVA.PSAELYAVKVLGASG AALNNSIGTYVLGVASPSAELYAVKVLGASG
Deleción	X=Aminoácido en molde D=Posición en el molde c vacío Y="*"	V81* 80 AALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSG AALNNSIG.LGVAPSAELYAVKVLGASGSG
Extensión N-terminal	Inserciones en la posición "0".	*0aA *0bT *0cG 1 ...AQSVPWGISRVQ ATGAQSVPWGISRVQ
Extensión C-terminal	Inserciones después del aminoácido N-terminal	*275aS *275bT 270 275 ATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR.. ATSLGSTNLYGSGLVNAEAATRST

[0053] Como se explica más arriba, el número de posición ("D") se cuenta a partir del primer residuo de aminoácido de la SEQ ID N.º:2.

20 [0054] 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.

5 [0055] Las alteraciones alternativas se separan por ", " (coma), por ejemplo, la designación "119R,K" significa que el aminoácido en la posición 119 se sustituye por R o K.

10 [0056] Las comas usadas en este documento en otras varias enumeraciones de posibilidades significan lo que estas normalmente hacen gramaticalmente, a saber, frecuentemente y/o. Por ejemplo, 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 53Q y/o 121 D y/o 167Q.

15 [0057] En el presente contexto, "por lo menos uno" (por ejemplo, modificación) significa una o más, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones; o 12, 14, modificaciones. Las variantes de fitasa de la invención, no obstante, todavía deben ser por lo menos un 90% idénticas a la SEQ ID N.º:2, siendo determinado este porcentaje como se ha descrito anteriormente.

[0058] Una sustitución o extensión sin ninguna indicación de con qué sustituir o extender se refiere a la inserción de cualquier aminoácido natural, o no natural, excepto el que ocupa esta posición en el molde.

20 **Identificación de los números de posición correspondientes**

[0059] Como se ha explicado anteriormente, la fitasa madura de *Hafnia alvei* DSM 19197 (SEQ ID N.º:2) se usa como el estándar para la numeración de posición y, de ese modo, también para la nomenclatura.

25 [0060] Para otra fitasa, en particular una variante de fitasa de la invención, la posición correspondiente a la posición D en la SEQ ID N.º: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 SEQ ID N.º:2 se puede identificar claramente y sin ambigüedad (las dos posiciones en la parte superior de cada una en la alineación).

30 [0061] 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:

35 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.

40 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.

45 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.

Propiedades modificadas, referencia o fitasa progenitora

50 [0062] En particular, las variantes de fitasa de interés tienen propiedades alteradas o modificadas, preferiblemente, mejoradas. Los términos "alterado", "modificado" y "mejorado" implican una comparación con otra fitasa. Ejemplos de otras fitasas de referencia, progenitoras o comparativas son: SEQ ID N.º:2 y/o otras fitasas con una identidad de secuencia con SEQ ID N.º:2 de más de 76%, preferiblemente superior a 90, 95 o 98%.

55 [0063] Ejemplos no limitativos de propiedades que son modificadas, preferiblemente mejoradas, son los siguientes: termoestabilidad, estabilidad de vapor, estabilidad de granulación, perfil de pH, actividad específica, rendimiento en el alimento para animales, sensibilidad de proteasa y/o modelo de glicosilación. La fitasa de la invención tiene una estabilidad térmica mejorada, perfil de temperatura, y/o puede incorporar cambios de sitios de división de una proteasa potencial para reducir la sensibilidad de la proteasa. Especialmente el rendimiento térmico, incluyendo la estabilidad térmica, estabilidad de temperatura, termoestabilidad, estabilidad de vapor, y/o estabilidad de granulación se considera una importante característica o propiedad.

Rendimiento térmico

Estabilidad de temperatura

5

[0064] La estabilidad de temperatura se puede determinar como se describe en el Ejemplo 3 determinando la actividad residual tras la incubación durante 30 minutos a temperaturas de 70° C a 80° C.

Termoestabilidad

10

[0065] La termoestabilidad se puede determinar como se describe en el Ejemplo 4, 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 mejorada tiene una Td que es superior a la Td de una fitasa de referencia, donde la Td se determina en las muestras de fitasa purificada (preferiblemente con una pureza de al menos 90% o 95%, determinado por SDS-PAGE).

15

Estabilidad térmica

20

[0066] La estabilidad térmica se puede determinar como se describe en el Ejemplo 5 determinando el perfil de temperatura/actividad de las fitasas variantes.

Estabilidad de vapor

25

[0067] La estabilidad de vapor se puede determinar como se describe en el ejemplo 7 determinando la actividad residual de las moléculas de fitasa después del tratamiento de vapor a 85°C o 90°C durante un tiempo breve.

Estabilidad de granulación,

30

[0068] Estabilidad de granulación se puede determinar como se describe en el ejemplo 9 usando granulado enzimático premezclado con alimento para animales. Esta premezcla se mezcla con alimento para animales. Del mezclador el alimento para animales se acondiciona con vapor a 95° C. Después de la preparación, el alimento para animales se prensa en gránulos y se determina la actividad residual.

35

[0069] Preferiblemente las propiedades térmicas tales como estabilidad térmica, estabilidad de temperatura, termoestabilidad, estabilidad de vapor y/o estabilidad de granulación según se proporcionan por la actividad residual, la Td u otro parámetro de la fitasa de la invención es superior al valor correspondiente, como la actividad residual o Td, de la fitasa de SEQ ID N.º:2, más preferiblemente al menos 101% del mismo, o al menos 102%, 103%, 104%, 105%, 106%, 107%, 108%, 109% o al menos 110% del mismo. Incluso más preferiblemente, el valor del parámetro, tal como actividad residual o Td, de la fitasa de la invención es al menos 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180% o al menos 190% del valor para la fitasa de SEQ ID N.º:2.

40

[0070] En particular, una fitasa mejorada termoestable tiene una temperatura de fusión, Tm (o una temperatura de desnaturalización, Td), como se determina usando calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) como se describe en los Ejemplos (es decir, en 20 mM de acetato sódico, pH 4,0), de al menos 50° C. En otras mejoras adicionales, la Tm es al menos 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 62,5, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o al menos 100° C. Las mediciones de DSC también se pueden realizar como se describe en los Ejemplos.

45

[0071] La estructura descrita en WO2008116878 fue usada para identificar posiciones que se seleccionan para modificación. La estructura fue también comparada con otras estructuras de fitasa HAP conocidas para el mismo fin.

50

[0072] Usando simulaciones de Dinámica Molecular para analizar moviidades a altas temperaturas, se identificó que las siguientes posiciones para modificación proporcionan propiedades térmicas mejoradas: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 37, 38, 39, 40, 41, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 91, 108, 109, 110, 111, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 131, 132, 133, 134, 138, 139, 140, 144, 145, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 160, 161, 163, 175, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 189, 190, 193, 194, 196, 198, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 233, 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 292, 293,

55

294, 295, 296, 297, 319, 320, 322, 324, 343, 344, 345, 346, 347, 364, 365, 366, 367, 369, 370, 371, 372, 373, 375, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 396, 397, 400, 403, 404, 408, 409, 412 y 413.

5 [0073] Concretamente se propone que las modificaciones en algunas de estas posiciones son seleccionadas de las siguientes: 8L,C,M,Y, 9K,P,S, 26R,Q,H, 27A, 28A, 29P,R,K,A, 30P,L, 32Q,I,L, 33C,N, 37D,R,K, 38A, 41T,Q, 69E,L, 70E, 72A, 74S, 75A, 76R,V,N, 77K,G,W,Q, 78G,R,K,Q,S,T, 79L, 81E, 82S, 83G, 109D,G, 111R,K,S, 117A,Q, 118A,N,E,P,T, 119D,K,E, 120G,L,I, M, 121A,S,T,G,K, 122A,S,T,K, 131R,Q, 132T,V, 134V, 138N,V, 139C,R, 140P, 144R, 148R, 150C, 151D, 152A,G,T,I, 160G, 163P,K, 175N,S 178C,E 179C,L,W, 181L, 185R,K, 186S,T, 187E, 190N, 193R, 198E, 201C,G,V, 202A,K, 203Y, 206G,T,A, 207N,L,Q,R, 234L,R,C,V,E, 235P, 236C, 239R,K, 242S, 243P, 244P, 285D, 286T, 10 287P, 288P, 289W, 293R,K,N, 294L, 319L, 320N, 343C, 344K, 346S,T, 347R, 365K, 366T, 369S,D, 370C, 382S,T, 383N, 396D,E,K 403N y 411S.

15 [0074] Sobre la base de las comparaciones con otras fitasas conocidas, se identificó que las siguientes posiciones son capaces de proporcionar propiedades térmicas mejoradas, tales como termoestabilidad: 12, 16, 48, 49, 54, 55, 77, 93, 100, 103, 128, 130, 136, 137, 173, 176, 195, 209, 211, 215, 219, 221, 227, 228, 248, 251, 258, 260, 261, 310, 313, 314, 316, 318, 335, 354, 356, 360, 362, 363, 374, 376, 378 y 411.

20 [0075] De las comparaciones concretamente se indica que las sustituciones deberían ser elegidas entre las siguientes 12S, 16V, 48W, 49L, 54G, 55E, 77K, 93E, 100W, 103A, 128N, 130L, 136O,137L, 173N, 176O,195L, 209S, 211T, 215S, 219M, 221T, 227O, 228O,248T, 251S, 258Y, 260L, 261Q, 310L, 313L, 314G, 316A, 318E, 335E, 354L, 356F, 360Q, 362M, 363R, 374P, 376E, 378K y 411S.

25 [0076] En relación con variantes producidas de la fitasa de SEQ ID N.º:2 las modificaciones deberían ser elegidas de las siguientes: K12S, L16V y48W, I49L, E54G, H55E, D77K, Q93E, L103A, H128N, V130L, S136Q, M137L, D173N, K176O, M195L, A209S, E211T, G215S, T219M, A221T, E227Q, H228Q, S248T, K251S, D258Y, M260L, S261Q, I310L, I313L, S314G, M316A, G318E, A335E, M354L y356F, A360Q, L362M, H363R, A374P, S376E, R378K y/o Q411S.

30 [0077] En formas de realización particulares, donde los puentes disulfuro se crean en la molécula, se prevé una termoestabilidad mejorada de las siguientes variantes de una fitasa con al menos 76% identidad para residuos de aminoácidos 2-413 de SEQ ID N.º:2: 8C/343C, 139C/201C, 179C/33C, 178C/33C, 172C/35C, 177C/36C, 176C/36C, 143C/201C, 54C/101C, 63C/368C, 66C/370C, 224C/236C, 150C/259C, 331C/326C, 358C/325C, 228C/363C y 368C/374C.

35 [0078] De forma similar, una termoestabilidad mejorada es también prevista de la sustitución de residuos de prolina por los residuos existentes en posiciones seleccionadas. Esto se prevé de las siguientes variantes de fitasa: 29P, 30P, 93P, 95P, 140P, 163P, 235P, 243P, 244P, 284P, 287P, 288P, 316P y 360P. Específicamente para modificaciones en la SEQ ID N.º:2, las siguientes modificaciones deberían mejorar la termoestabilidad: Q29P, T30P, Q93P, K95P, S140P, A163P, V235P, E243P, Q244P, S284P, T287P, S288P, M316P y A360P.

40 [0079] También, la optimización de residuos cargados es capaz de mejorar las propiedades térmicas, como la termoestabilidad. La optimización se refiere a las interacciones de carga-carga en la superficie de la molécula de fitasa.

45 [0080] A continuación, se presentan tres grupos de sustituciones para modificar las fitasas progenitora o de referencia con al menos 90% de identidad con los residuos de aminoácidos 1-413 de SEQ ID N.º:2 con residuos como se indica. Los residuos cuya carga puede ser invertida, los residuos cambiaron a una carga negativa y los residuos para ser cambiados a una carga positiva son:

Inversión de carga

[0081] D111 R,K, K251 D,E y D293R.K.

50

Cambio a negativo

[0082] Q69E, Q70E, T81E, Q93E, N119D, Q230E, Q245E, P348D,E, L395E y S396D,E.

Cambio a positivo

55 [0083] Q9R, Q29R,K, H37R,K, L59R,K, N78R,K, H115R,K, I185R,K, N239R y H363R,K.

Perfil de temperatura/estabilidad de temperatura

60 [0084] 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 5. Por consiguiente, una fitasa de la invención 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 5-10° C) donde la actividad es máxima.

5

Perfil de pH

[0085] Si una fitasa de la invención tiene o no un perfil de pH alterado en comparación con una fitasa de referencia se puede determinar como se describe en los Ejemplos. Por consiguiente, una fitasa de la invención tiene un perfil de pH alterado 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 de pH de 2, 0 a 7,5 (en pasos de unidad de pH de 0,5). Un tampón preferido es un cóctel de 50 mM de glicina, 50 mM de ácido acético y 50 mM de Bis-Tris. La actividad en cada pH es indicada preferiblemente como actividad relativa (en %) normalizada al valor de pH óptimo.

[0086] Un ejemplo de un perfil de pH alterado 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 SEQ ID N.º:2. No obstante, para ciertos fines, puede ser preferible proporcionar un cambio de 0,5 unidades de pH hacia un pH inferior en comparación con la fitasa de referencia de SEQ ID N.º2.

20

[0087] Otro ejemplo de un perfil de pH alterado es donde el pH óptimo es cambiado, en dirección hacia arriba o hacia abajo.

[0088] En una forma de realización particular, la fitasa de la invención puede tener un perfil de pH alterado en comparación con una fitasa de referencia. Más en particular, el perfil de pH está modificado en el intervalo 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.

25

Actividad específica

30

[0089] En particular, la fitasa de la invención 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. En otras formas de realización particulares adicionales, 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.

35

[0090] En la alternativa, el término actividad específica alta se refiere a una actividad específica de al menos 200 FYT/mg de proteína enzimática (PE). En particular, 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.

40

[0091] 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 se puede determinar 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. Véanse los Ejemplos para obtener más detalles.

45

[0092] Una actividad específica modificada se espera de las siguientes variantes de la fitasa de la SEQ ID N.º:2, en la que, en orden de preferencia, el bucle entre los residuos 115 y 127 (HQQNTQQADPL) que da al sitio activo es sustituido por un bucle seleccionado de, por ejemplo, HQEKMGTMDPT, HQQDIKQVDSL, HQPEIGKMDPV, TQADTSSPDPL, HQQDIKQADPL, TQTDTSPPDPL, NQADLKKTDPL.

50

55 Rendimiento en el alimento para animales

[0093] Una fitasa de la invención puede tener 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 de los Ejemplos. Por consiguiente, 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 para animales compuestas por un 30% de harina de soja y 70% de harina de maíz con CaCl₂ añadido a una concentración de 5 g de calcio por kg

60

de alimento para animales; preincubándolos a 40° C y pH 3,0 durante 30 minutos seguidos de adición de pepsina (3000 U/g de alimento para animales) 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 0,5 M e incubación a 40° C durante 2 horas, seguido de un ciclo de congelación-descongelación y 1 hora de incubación a 40° C; separando ácido fítico e 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.

[0094] 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 para animales. Otra dosificación preferida es 250 FYT/kg de alimento para animales. 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.

[0095] Preferiblemente, el valor de IP6-P degradado de la fitasa purificada de interés, 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%. Aún más, el valor IP6-P degradado de la fitasa purificada de interés, 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 SEQ ID N.º:2, es al menos un 105%, 110%, 113%, 115%, 120%, 125%, o al menos un 130%.

[0096] El rendimiento relativo de una fitasa de interés también se puede calcular como el porcentaje del fósforo liberado por la fitasa de referencia.

[0097] Aún más, el rendimiento relativo de una fitasa de interés puede también ser calculado como el porcentaje del fósforo liberado por la fitasa de interés, relativo a la cantidad de fósforo liberado por la fitasa de referencia.

[0098] Aún más, el rendimiento relativo de una fitasa de interés es al menos 105%, preferiblemente al menos 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, o al menos 200%.

Reducción en la glicación

[0099] La glicación no enzimática es un proceso postranslacional espontáneo en el cual los azúcares reductores se enlazan de manera covalente a grupos amino libres en proteínas principalmente en residuos de lisina (K). Para reducir la glicación dando como resultado una reducción de actividad de la fitasa, la actividad se mejora por sustitución de determinados residuos de aminoácido, tal como Lys.

[0100] Por lo tanto, se propone hacer una o varias de las siguientes modificaciones en la fitasa de SEQ ID N.º: K12R,Q, K26R,Q, K45P, K76R,Q, K97R,Q, K131R,Q, K139R,Q, K148R,Q, K176R,Q, K187E, K207L, K234R,Q, K251R,Q, K268R,Q, K299R,Q, K347R,Q, S261A, T308A, T25A, T28A, T30L, T219L, T120L, N202A, N206A, N270R,Q, N312A, N119D, Q256A, Q29A, Q121A, Q122A, Q117A, Q118A y48W y Y179L. Modificaciones específicamente preferidas con respecto a esta mejora en la eficiencia son las modificaciones K26Q y K26R.

45 Sensibilidad de proteasa reducida

[0101] En particular, una fitasa de interés puede tener una sensibilidad de proteasa reducida. Más en particular, tiene una sensibilidad reducida hacia el pepsina y la tripsina de las proteasas, lo que significa una tendencia reducida para volverse dividida por estas proteasas.

[0102] Las posiciones para ser modificadas en este aspecto se indican en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2 Posiciones de modificar sensibilidad de proteasa

Pepsina	Pepsina	Tripsina
F8	W42	R22
L46	Y48	K26
L73	L74	K45

L112	F174	K76
L126	W237	K131
L157	L323	R160
L188	L379	K176
W321		K187
L368		K234
L370		
L395		

[0103] Para reducir la sensibilidad hacia la pepsina, el residuo de aminoácido debería ser modificado a un aminoácido diferente de F, L, W o Y. En el caso de la tripsina, debe ser modificado a un residuo de aminoácido diferente de R o K.

5 Modelo de glicosilación

[0104] La glicosilación es un fenómeno que solo 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 solo tiene lugar en asparaginas que en la secuencia son parte de los siguientes tripéptidos: N-X-T o N-X-S, donde X designa cualquier aminoácido.

[0105] Se ha observado que la termoestabilidad se puede mejorar para fitasas expresadas en hongos alterando los sitios de glicosilación potenciales.

[0106] Ejemplos de fitasas son las fitasas bacterianas, por ejemplo, fitasas gram-negativas, tales como E.coli y fitasas de Citrobacter y Hafnia y variantes de las mismas, incluidas las fitasas de la presente invención. Ejemplos de huéspedes de expresión fúngica son Pichia, Saccharomyces y especies de Aspergillus.

[0107] En particular, se espera un modelo de glicosilación modificada de las siguientes fitasas de interés:

Eliminación de un sitio de glicosilación

[0108]

Número res.	Tipo res.	Cambiar a
285	Asn	Asp

25 Nuevos sitios de glicosilación: NXX

[0109]

Número res.	Tipo res.	Cambio a
121	Gln	Ser, Thr
186	Gly	Ser, Thr
249	Leu	Ser, Thr
331	Pro	Ser, Thr

346	Gly	Ser, Thr
355	Val	Ser, Thr
382	Pro	Ser, Thr

Creación de nuevos sitios de glicosilación del tipo XXT

[0110]

Número res.	Tipo res.	Cambio a
33	Asp	Asn
48	Tyr	Asn
93	Gln	Asn
96	Arg	Asn
118	Gln	Asn
320	Thr	Asn

5 Creación de nuevos sitios de glicosilación del tipo XXS

[0111]

Número res.	Tipo res.	Cambiar a
138	Asp	Asn
162	Gln	Asn
175	Pro	Asn
190	Asp	Asn
246	Trp	Asn
293	Asp	Asn
383	Gly	Asn
394	Pro	Asn
401	Leu	Asn
403	Ser	Asn

Estabilidad del vapor

- 10 [0112] La termoestabilidad es un parámetro importante, pero asociada a esta la estabilidad del vapor también es importante. En este aspecto, se hace referencia al Ejemplo 8 más abajo.

Variantes hipoalergénicas

- 15 [0113] Las fitasas de la presente invención pueden ser (también) variantes hipoalergénicas, diseñadas para recurrir a una respuesta inmunológica reducida cuando es expuesta a animales, incluido 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 hipoalérgicas 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 epítomos 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, por ejemplo, como se describe en 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, por ejemplo, WO 00/26354. Otro modo de proporcionar variantes hipoalérgicas es la ingeniería genética de la secuencia de nucleótidos que codifican la variante de fitasa para provocar que las variantes de fitasa se autooligomericen, logrando que los monómeros de variante de fitasa puedan proteger los epítomos de otros monómeros de variante de fitasa y así reducir la antigenicidad de los oligómeros. Tales productos y su preparación se describen, por ejemplo, en WO 96/16177. Los epítomos implicados en una respuesta inmunológica se pueden identificar por varios métodos tales como el método de visualización de fago descrito en WO 00/26230 y WO 01/83559, o el enfoque aleatorio descrito en EP 561907. Una vez que un epítomo 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 (véanse, por ejemplo, WO 00/26230, WO 00/26354 y/o WO 00/22103) y/o la conjugación de un polímero puede realizarse con proximidad suficiente al epítomo para que el polímero proteja al epítomo.

Secuencias de ácidos nucleicos y constructos

[0114] 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.

[0115] 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, por ejemplo, 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 esta 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 replicadas. La secuencia de ácidos nucleicos puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

[0116] 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, por ejemplo, por mutagénesis de sitio dirigido, por mutagénesis aleatoria, o por mutagénesis dopada, adicionada, o aleatoria localizada.

[0117] 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 a las posiciones que deben ser cambiadas. El dopaje o el 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, por ejemplo, PCR, LCR o cualquier polimerasa y ligasa de ADN según se estime apropiado.

[0118] 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, por ejemplo, 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 dopaje se basa en limitaciones genéticas así como estructurales de proteínas.

[0119] La mutagénesis aleatoria puede ser localizada de manera ventajosa en una parte de la fitasa progenitora en cuestión. Esto puede, por ejemplo, ser ventajoso cuando determinadas regiones de la enzima han sido identificadas por ser de especial importancia para una propiedad dada de la enzima.

[0120] Los métodos alternativos para suministrar variantes de la invención incluyen transposición de genes, por ejemplo, como se describe en WO 95/22625 o en WO 96/00343 y el proceso de derivación de consenso como se describe en EP 897985.

Constructos de ácidos nucleicos

[0121] 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. Se entiende que la expresión incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluido, de modo enunciativo, pero no limitativo, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0122] El término "constructo de ácidos nucleicos" según 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.

[0123] El término "secuencias de control" 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, de modo enunciativo, pero limitativo, 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 la ligación de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

[0124] 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.

[0125] Cuando se usa aquí el término "secuencia codificante" (SC) 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 comienza 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

[0126] El término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, de modo enunciativo, pero no limitativo, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0127] El término "vector de expresión" se define en la presente 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 propician su expresión.

[0128] 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.

[0129] 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 introducido.

El vector puede ser uno que, cuando está introducido en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el/los cromosoma(s) en el cual ha sido integrado.

[0130] 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-glucanasa. 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 a 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

[0131] El término "célula huésped", según 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.

[0132] 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 auto-replicante como se describió anteriormente. El término "célula huésped" abarca 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.

[0133] La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procarionta, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota.

[0134] Los microorganismos unicelulares útiles son células bacterianas tales como bacterias gram positivas incluidas, entre otras, una célula de *Bacillus*, por ejemplo, *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 *Streptomyces*, por ejemplo, *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 una célula de *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. En otro aspecto preferido, la célula de *Bacillus* es un *Bacillus alcalofílico*.

[0135] La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana puede, por ejemplo, ser efectuada mediante transformación de protoplasto (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), usando células competentes (véase, por ejemplo Young y Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829, o Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751), o conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

[0136] La célula huésped puede también ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta o fúngica.

[0137] En un aspecto preferido, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongos" según se utiliza en la presente 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).

[0138] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este documento incluye levadura de ascoesporogenous (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.º 9, 1980).

[0139] En un aspecto aún más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

[0140] En el 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 de *Kluyveromyces lactis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

[0141] 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.

[0142] 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*, *Tolypocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

[0143] En el 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 sarcocroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, o *Fusarium venenatum*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una cepa de célula de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, o *Ceriporiopsis subvermispora*, *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*.

[0144] 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 de *Aspergillus* y *Trichoderma* están descritos en 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.

45 **Métodos de producción**

[0145] 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.

[0146] 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 (incluidas 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 (por ejemplo, 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.

[0147] 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 incluidos, entre otros, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación.

5

[0148] Los polipéptidos de la presente invención se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluidos, entre otros cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbico, cromatoenfoco y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoeléctrico preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J. C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

10

Composiciones y usos

[0149] En otros aspectos adicionales, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención, al igual que a métodos de uso de estas.

15

[0150] 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 ha de incluirse en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

20

[0151] La fitasa de la invención se puede usar para la degradación, en cualquier contexto industrial, de, por ejemplo, fitato, ácido fítico y/o mono-, di-, tri-, tetra- y/o pentafofosatos de mioinositol. Es bien conocido que las fracciones de fosfato de estos compuestos quelan cationes divalentes y trivalentes tales como iones metálicos, entre otros, 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.

25

[0152] 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.

30

[0153] En una realización particular, el polipéptido de la invención se puede usar para mejorar el valor nutricional de 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 para animales; estimular el crecimiento del animal; mejorar la utilización del alimento para animales; 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 o reducir la necesidad de añadir fosfato suplementario, oligoelementos y/o macrominerales y/o mejorar la calidad de la cáscara del huevo. 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.

40

[0154] Además, el polipéptido de la invención se puede usar para reducir el nivel de fitato de abono.

[0155] Las variantes de fitasa de la invención también pueden usarse en un método para la producción de un producto de fermentación, que comprende (a) fermentación usando un microorganismo fermentador de un material que contiene carbohidrato en presencia de una fitasa de la invención y (b) producción del producto de fermentación o coproducto de fermentación del carbohidrato fermentado que contiene material.

45

[0156] Cuando se usa para este fin, el producto de fermentación es preferiblemente etanol, cerveza, vino o granos de destilería desecados (DDG por sus siglas en inglés).

50

Animales, alimento para animales y aditivos de alimento para animales

[0157] 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, por ejemplo, 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, por ejemplo, el cerdo o el puerco (incluidos, entre otros, lechones, cerdos en crecimiento y cerdas); aves de corral tales como pavos, patos y pollos (incluidos, entre otros, pollos de engorde, gallinas ponedoras); peces (incluidos, entre otros, salmón, trucha, tilapia, siluro y carpa) y crustáceos (incluidos, entre otros, gamba y langostino).

60

[0158] El término alimento o composición alimentaria significa cualquier compuesto, preparación, mezcla o composición adecuada para la ingesta por parte de un animal o destinada a ese fin.

5 [0159] En el uso según la invención, el polipéptido se puede suministrar al animal antes o después de la dieta o simultáneamente con esta. Se prefiere esto último.

10 [0160] 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 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.

15 [0161] 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.

20 [0162] No obstante, para uso en el alimento para animales, el polipéptido de fitasa de la invención no necesita ser tan puro; puede, por ejemplo, incluir otros polipéptidos, en cuyo caso se podría denominar una preparación de fitasa.

25 [0163] 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.

30 [0164] 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 tradicionales.

[0165] Tal preparación del polipéptido puede, por supuesto, mezclarse con otros polipéptidos.

35 [0166] El polipéptido se puede añadir al alimento en cualquier forma ya sea como un polipéptido relativamente puro o en 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.

40 [0167] En otro aspecto la presente invención se refiere a composiciones para su uso en alimento para animales, tales como alimentos para animales y aditivos para alimentos para animales, por ejemplo, premezclas.

45 [0168] Además del polipéptido de la invención, los aditivos para alimentos para animales de la invención contienen al menos una vitamina fitosoluble y/o al menos una vitamina soluble en agua y/o al menos un oligoelemento. El aditivo de alimento para animales puede también contener al menos un macromineral.

50 [0169] Además, los ingredientes de aditivos de alimento para animales opcionales son agentes colorantes, por ejemplo, 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); galactanas (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 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).

55 [0170] En una forma de realización particular, estos otros polipéptidos están bien definidos (como se ha definido más arriba para preparaciones de fitasa).

60 [0171] La fitasa de la invención puede también ser combinada con otras fitasas, por ejemplo, fitasas de ascomicetos tales como fitasas de Aspergillus, por ejemplo, derivadas de Aspergillus ficuum, Aspergillus niger o Aspergillus awamori; o fitasas de basidiomicetos, 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.

- [0172] 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.
- 5 [0173] Ejemplos de péptidos antimicrobianos (PAM) son CAP18, Leucocino A, Tiritricina, Protegrina-1, Tanatina, Defensina, Lactoferrina, Lactoferricina y Ovispirina tales como Novispirina (Robert Lehrer, 2000), Plectasinas y Estatinas, incluidos los compuestos y los polipéptidos descritos en WO 03/044049 y WO 03/048148, al igual que variantes o fragmentos de los anteriores que retienen actividad antimicrobiana.
- 10 [0174] Ejemplos de polipéptidos antifúngicos (PAF) son los péptidos de *Aspergillus giganteus* y *Aspergillus niger*, así como variantes y fragmentos de los mismos que retienen actividad antifúngica, como se ha descrito en WO 94/01459 y WO 02/090384.
- [0175] 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.
- 15 [0176] 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.
- 20 [0177] Por lo general, las vitaminas grasas e hidrosolubles, así como los oligoelementos forman parte de una premezcla destinada a 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.
- 25 [0178] 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.
- 30 [0179] 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, por ejemplo, vitamina K3.
Ejemplos de vitaminas hidrosolubles son vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, por ejemplo, Ca-D-pantotenato.
Ejemplos de oligoelementos son manganeso, zinc, hierro, cobre yodo, selenio y cobalto.
- 35 [0180] Los requisitos nutritivos de estos componentes (ejemplificados con aves de corral y lechones/cerdos) están listados en la tabla A de WO 01/58275. Requisito nutritivo significa que estos componentes deberían proporcionarse en la dieta en las concentraciones indicadas.
- 40 [0181] 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 WO 01/58275. Al menos uno significa cualquiera de, uno o más de, uno, o dos, o tres o cuatro y así sucesivamente hasta los trece o hasta 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.
- 45 [0182] La presente invención también se refiere a composiciones de alimento para animales. Las composiciones de alimento o dietas para animales tienen un contenido relativamente alto de proteína. Las dietas de aves o de cerdos se pueden caracterizar como se indica en la Tabla B de 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.
- 50 [0183] WO 01/58275 corresponde a US 09/779334 que se incorpora en la presente por referencia.
- 55 [0184] 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.
- 60 [0185] 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.

- 5 [0186] 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 WO 01/58275 (R. 2-5).
- [0187] 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).
- 10 [0188] 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.
- 15 [0189] 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.
- 20 [0190] 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, tal como harina de carne y huesos y/o harina de pescado; o puede ser una proteína vegetal. El término proteínas vegetales según 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, incluidas 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).
- 25 [0191] Las proteínas vegetales pueden ser derivadas de fuentes de proteína vegetal, tales como legumbres y cereales, por ejemplo, materiales de plantas de las familias Fabaceae (Leguminosae), Cruciferae, Chenopodiaceae y Poaceae, tales como harina de soja, harina de altramuces y harina de semilla de colza.
- 30 [0192] En una forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia Fabaceae, por ejemplo, semilla de soja, altramuces, guisante o alubia.
- 35 [0193] 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 quinoa.
- [0194] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son la semilla de colza, semilla de girasol, semilla de algodón y repollo.
- 40 [0195] La semilla de soja es una fuente de proteína vegetal preferida.
- [0196] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son los cereales tales como cebada, trigo, centeno, avena, maíz (mazorca), arroz, triticale y sorgo.
- 45 [0197] En otras formas de realización particulares adicionales, 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.
- 50 [0198] Las dietas para animales pueden, por ejemplo, producirse como pienso en harina (no granulado) o pienso en gránulos o pienso extruido. Típicamente, se mezclan los materiales alimenticios triturados y 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.
- 55 [0199] 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.
- 60

5 [0200] 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; o 0.10-10 - siendo todos estos intervalos en mg de proteína de polipéptido de fitasa por kg de alimento (ppm).

10 [0201] 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.

15 [0202] 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

20 [0203] Los productos químicos usados fueron productos comerciales de al menos grado reactivo.

Ejemplo 1: preparación de variantes y determinación de actividad

Preparación de variantes de fitasa

25 Expresión de variantes de fitasa en *Aspergillus oryzae*

30 [0204] Los constructos que comprenden los genes de la variante de fitasa de *Hafnia* en los ejemplos fueron usados para construir vectores de expresión para *Aspergillus*. Los vectores de expresión de *Aspergillus* consisten en un casete de expresión basado en el promotor II de amilasa neutra de *Aspergillus niger* fusionada a la secuencia líder no traducida de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* (Pna2/tpi) y el terminador de amiloglicosidasa de *Aspergillus niger* (Tamg). También presente en el plásmido está el marcador selectivo de *Aspergillus amdS* de *Aspergillus nidulans* que permite crecimiento en la acetamida como fuente de nitrógeno única. Los plásmidos de expresión para variantes de fitasa fueron transformados en *Aspergillus* como se describe en Lassen et al. (2001), Applied and Environmental Microbiology, 67, 4701-4707. Para cada uno de los constructos, se aislaron 10-20 cepas y se purificaron y cultivaron en matraces de agitación.

Purificación de variantes de fitasa de *Hafnia alvei*

40 [0205] El sobrenadante de fermentación con la variante de fitasa fue filtrado a través de un filtro Fast PES Bottle top con un corte de 0,22 µm. La solución resultante fue diluida con agua al doble de volumen y el pH se ajustó a 4,5 con ácido acético. Ocasionalmente, la solución se volvió un poco nublada y esto se quitó por filtración a través de un filtro Fast PES Bottle top con un corte de 0,22 µm. Después del pretratamiento, la variante de fitasa fue purificada por cromatografía en S sefarosa, aproximadamente 30 ml 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. Las fracciones de la columna fueron analizadas en cuanto a la actividad usando un ensayo de fosfatasa (véase más abajo) y se agruparon las fracciones con actividad.

50 [0206] Finalmente, la solución con la variante de fitasa purificada fue concentrada usando un dispositivo de filtración Amicon ultra-15 con una membrana de corte de 30 kDa.

[0207] El peso molecular, como se estima a partir de SDS-PAGE, fue aproximadamente de 45 kDa y la pureza fue > 95%.

Determinación de actividad de fosfatasa

55 [0208] 75 microlitros de solución enzimática con fitasa se dispensan en un pocillo de placa de microtitulación, por ejemplo, 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., se agita 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). Se determina que la absorbancia de 1 micromol de p-nitrofenol es 56 AU (AU= unidades de absorbancia) bajo condiciones de ensayo.

Determinación de actividad de fitasa

[0209] 75 microlitos de solución enzimática con fitasa, diluidos apropiadamente (por ejemplo, en 0,25 M de acetato sódico, 0,005% (p/v) Tween-20. pH 5,5), se dispensan en un pocillo de placa de microtitulación, por ejemplo, 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 acetato de sodio, pH 5,5). La placa se sella y se incuba 15 min. agitada a 750 r.p.m. a 37° C. Después de la 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) y 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 micromol de ortofosfato inorgánico por minuto bajo las condiciones anteriores. Un valor absoluto para la actividad de fitasa medida se obtiene por referencia a una curva estándar preparada a partir de diluciones apropiadas de fosfato inorgánico o por referencia a una curva estándar hecha de diluciones de una 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: actividad específica

[0210] 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 solo un componente.

[0211] 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.

[0212] 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.

Ejemplo 3: estabilidad de temperatura

Cepas y plásmidos

[0213] Se utilizó E.coli DH12S (disponible de Gibco BRL) para el rescate de plásmido de levadura.

[0214] pJHP000 es un vector transportador de *S. cerevisiae* y *E.coli* bajo el control de promotor TPI, construido a partir de pJC039 descrito en WO 01/92502, en el cual se ha insertado el gen de fitasa de *Hafnia alvei*.

[0215] *Saccharomyces cerevisiae* YNG318: MATa Dpep4[cir+] ura3-52, leu2-D2, his 4-539 se utilizó para la expresión de variantes de fitasa. Está descrito en J. Biol. Chem. 272 (15), págs 9720-9727, 1997.

Medios y sustratos

[0216] 10X Solución Basal: 66,8 g/l base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (DIFCOI, 100 g/l succinato, 60 g/l NaOH.

[0217] Glucosa SC: 100 ml/l 20% glucosa (es decir, una concentración final de 2% = 2 g/100ml), 4 ml/l 5% treonina, 10 ml/l 1% triptófano, 25 ml/l 20% casamino ácidos, 100 ml/l 10 X solución basal. La solución es esterilizada usando un

filtro de un tamaño de poro de 0,20 µm. Agar y H₂O (aprox. 761 ml) se someten juntos a autoclave y la solución de glucosa SC separadamente esterilizada se añade a la solución de agar.

[0218] YPD: 20 g/l bacto peptona, 10 g/l extracto de levadura, 100 ml/l 20% glucosa

[0219] Solución de PEG/LiAc: 50ml 40% PEG4000, 1ml 5M acetato de litio

Manipulaciones de ADN

[0220] A menos que se declare de otra manera, las manipulaciones y transformaciones de ADN se realizaron usando métodos estándares de biología molecular como se describe en Sambrook et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab. Cold Spring Harbor, NY ; Ausubel, F. M. et al. (eds.) "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R. and Cutting, S. M. (eds.).

Transformación de levadura

[0221] La transformación de levadura se realizó por el método de acetato de litio. Mezclar 0,5 microL de vector (digerido por endonucleasas de restricción) y 1 microL de fragmentos de la PCR. Descongelar células competentes YNG318 en hielo. Mezclar 100µl de las células, la mezcla de ADN y 10µl de ADN portador (Clontech) en tubos de polipropileno de 12ml (Falcon 2059). Añadir 0,6 ml de solución de PEG/LiAc y mezclar suavemente. Incubar durante 30 min. a 30° C y 200 r.p.m. Incubar durante 30 min. a 42° C (choque térmico). Transferir a un tubo Eppendorf y centrifugar durante 5 seg. Eliminar el sobrenadante y redisolver en 3ml de YPD. Incubar la suspensión celular durante 45 min. a 200 r.p.m. a 30 ° C. Verter la suspensión en placas de glucosa SC e incubar a 30° C durante 3 días para formar colonias. El ADN total de la levadura es extraído por medio del método de Robzik y Kassir descrito en Nucleic acids research vol. 20, No14 (1992) 3790.

Secuenciación del ADN

[0222] Una transformación de E. coli para la secuenciación de ADN fue obtenida por electroporación (BIO-RAD Gene Pulser). Los plásmidos de ADN fueron preparados por medio de un método alcalino (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor) o con el Qiagen® Plasmid Kit. Los fragmentos de ADN fueron recuperados del gel de agarosa por medio del kit de extracción en gel Qiagen. Se realizó la PCR con el PTC-200 DNA Engine. Se usó el ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer para determinar todas las secuencias de ADN.

Construcción de vector de expresión de fitasa

[0223] El gen de fitasa de Hafnia fue amplificado con los pares de cebadores (HafPhyF y HafPhyR). Los fragmentos de la PCR resultantes fueron introducidos en S. cerevisiae YNG318 con el vector pJC039 digerido con enzimas de restricción para eliminar la parte madura de gen de cutinasa de Humicola insolens.

HafPhyF (34mer)
CTCCTGAACTTGTGCCCCGGTCGGATACAGCCCC
HafPhyR (39mer)
ATTACATGATGCGGCCCTCTAGATTAGGGGAGCTGACATG

[0224] Se recuperó el plásmido, que se denomina pJHP000 de los transformantes de levadura en las placas de glucosa SC y se determinó la secuencia interna para confirmar el gen de fitasa.

Construcción de librería de levadura y variantes dirigidas al sitio

[0225] Librería en levadura y variantes dirigidas se construyeron por el método SOE PCR (empalme por extensión por superposición, véase "PCR: A practical approach", p. 207-209, Oxford University Press, eds. McPherson, Quirke, Taylor), seguido de recombinación in vivo de levadura.

Cebadores generales para amplificación y secuenciación

[0226] Los cebadores siguientes se utilizan para hacer fragmentos de ADN que contienen cualquier fragmento mutado por el método SOE junto con cebadores degenerados (AM34 + cebador inverso y AM35 + cebador directo) o solo para amplificar un gen de asparaginasa entero (AM34 + AM35).

ES 2 544 645 T3

AM34 TAGGAGTTTAGTGAACCTTGC

AM35 TTCGAGCGTCCCAAAC

Sistema de reacción PCR:	Condiciones:	
48,5 micro L H ₂ O	1	94°C 2 min.
2 perlas puRe Taq Ready-To-Go PCR	2	94°C 30 seg.
Perlas (Amersham bioscience)	3	55°C 30 seg.
0,5 micro L X 2100 pmol/micro L cebadores	4	72°C 90 seg
0,5 micro L Modelo ADN	2-4	25 ciclos
	5	72°C 10 min.

- 5 [0227] Los fragmentos de ADN fueron recuperados del gel de agarosa por medio del kit de extracción en gel Qiagen. Los fragmentos purificados resultantes fueron mezclados con el digerido del vector. La solución mezclada fue introducida en *Saccharomyces cerevisiae* para construir bibliotecas o variantes dirigidas por recombinación in vivo.

Selección de bibliotecas (el ensayo de membrana primaria)

- 10 [0228] Las bibliotecas de levadura fueron cultivadas en la placa de glucosa SC con una membrana de acetato de celulosa (superior) y membrana Biotyne C (de Pall gelman) (inferior) a 30° C al menos durante 3 días. Las membranas Biotyne C fueron transferidas a placas preincubadas con 20mM de tampón de acetato, pH 4,0 e incubadas durante 1-2 horas a una temperatura determinada (50° C en el caso de WT como esqueleto).

- 15 [0229] Luego, las membranas fueron quitadas y mojadas en la solución de sustrato fresco (10 ml 20mM tampón acetato, pH 4,0; 0,01 g, alfa naftil fosfato (Sigma); 0,02g, Fast Garnet GBC (Sigma). Los clones de levadura correspondientes a las posiciones de color rojo desarrollados en las membranas Biotyne C fueron aislados de membranas de acetato de celulosa.

Selección de bibliotecas (la selección de actividad relativa secundaria)

- 20 [0230] Los clones de levadura en las membranas de acetato de celulosa fueron inoculados a una placa de mitrotitulación de 96 pocillos y cultivados a 28° C durante 3 días. La actividad de fitasa se midió a 37 °C y a la temperatura más alta (60, 62, 64, 66° C etc.) para determinar la actividad relativa a una temperatura determinada. Luego, los clones con actividad relativa más alta fueron seleccionados y la secuencia fue confirmada.

Estándar, control de nivel y muestras se pipetan en un MTP o tubo de 8 bandas.	10 µl
Se añade sustrato precalentado (50° C).	200µl
El tubo de 8 bandas o MTP se coloca en un incubador MTP a 37, 60 y 64° C (o superior).	30 min.
Quitar 35µl, añadirlo en 100µl de reactivo complejo de parada y mezclar 5-20 s.	35 + 100 µl
La muestra espera antes de la medición.	5-30 min.
Se mide OD a	750 nm

Sustrato, 2,0 mM de solución de fitato de sodio (cada vez)

- 30 [0231] Ejemplo de preparación de 100 ml:

ES 2 544 645 T3

Fitato de sodio 0,1847 g
 0,1 M tampón acetato, pH 4,0 hasta 100 ml

Reactivo complejante

[0232] Ejemplo de preparación de 200 ml:

5 FeSO₄·7H₂O 14,64 g
 Solución de heptamolibdato de amonio hasta 200 ml

Reactivo complejo de parada

[0233] Ejemplo de preparación de 600 ml de reactivo complejo de parada

10 [0,5 M H₂SO₄ 200 ml

Reactivo complejante 400 ml

[0234] Solución de heptamolibdato de amonio

15 Ejemplo de preparación de 1000 ml:

[0235]

(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 10,0 g
 Ácido sulfúrico 32 ml
 Agua desmineralizada hasta 1000 ml

20 [0236] Los resultados se proporcionan a continuación. La columna que indica la actividad relativa proporciona la primera la actividad relativa de la variante y luego la actividad relativa de la fitasa de referencia usada en la determinación. La referencia es el tipo salvaje o variantes n.º 62, 69, 84, 104, 105, 113 y/o 138. Las variantes fueron usadas típicamente como referencia cuando la actividad residual del tipo salvaje era muy baja.

25 **Resultados**

[0237]

Variante n.º	Modificaciones (sustituciones, inserciones o deleciones)	Actividad relativa (variante de control/referencia)
005	A132V/Q162R	11 % a 72°C (WT2%)
007	Y179W	12% a 72°C (WT2%)
008	A132V/Q181L	15% a 72°C (WT2%)
011	A132V/E211R	10% a 72°C (WT2%)
012	A132V/D83G	11 % a 72°C (WT3%)
013	A132V/A217G	50% a 72°C (WT2%)
014	A132V/A217S	47% a 72°C (WT2%)
015	A221G	11 % a 72°C (WT2%)
016	R32I	46% a 72°C (WT26%)
017	R32L	38% a 72°C (WT26%)

ES 2 544 645 T3

020	D77G	46% a 72°C (WT26%)
021	D77W	40% a 72°C (WT26%)
023	T95A	44% a 72°C (WT26%)
024	E100W/H363R	42% a 72°C (WT26%)
025	D111S	69% a 72°C (WT26%)
027	D138V/Y48H	48% a 72°C (WT39%)
028-1	K234C	50% a 72°C (WT39%)
028-2	K234V	50% a 72°C (WT39%)
029	K251S	46% a 72°C (WT39%)
030	H363V	40% a 72°C (WT39%)
031	H363R	53% a 72°C (WT39%)
046-1	A132V/A217G	42% a 70°C (WT13%)
046-2	A132V/Q162R/Q181L/A217G	42% a 70°C (WT13%)
047	D293R	30% a 70°C (WT13%)
048	Q93E	22% a 70°C (WT13%)
050-1	P348R/H363R	30% a 70°C (WT13%)
050-2	P348S	30% a 70°C (WT13%)
051	Q69L	20% a 70°C (WT13%)
052	Q245E	19% a 70°C (WT13%)
053	Q9S/D92Y	42% a 70°C (WT13%)
054-2	D92Y/H115L	28% a 70°C (WT13%)
054-re1,2	D92Y/H115M	32% a 70°C (WT17%)
057	N78Q	56% a 70°C (WT28%)
058	K76V	57% a 70°C (WT28%)
061-1	G325K	47% a 70°C (WT28%)
062	E100W/A217G/H363R(reference)	63% a 72°C (WT17%)
063	A217G/K251S	40% a 72°C (WT17%)
064	E100W/A217G/K251S	38% a 72°C (WT17%)
065	E100W/K251S	26% a 72°C (WT17%)
066	A217G	29% a 72°C (WT10%)
067	E100W/I555V/A217G	45% a 72°C (WT9%)
068	Q9S/E100W/R160G/A217G/H363R	45% a 72°C (WT9%)
069	D92Y/E100W/A217G/H363R(reference)	79% a 72°C (WT9%)
070	E100W/H115M/A217G/H363R	41% a 72°C (WT9%)
071	E100W/A217G/P348R/H363R	63% a 72°C (WT9%)
072	Q9S/A89A/D92Y/H115M/A217G/H363R	67% a 72°C (WT9%)
073	A132T	21% a 72°C (WT16%)
		Referencia=variante no. 62
075	N78Q/E100W/A217G/H363R	47% a 72°C (62 40%)

ES 2 544 645 T3

076	K76V/N78Q/E100W/A217G/H363R	47% a 72°C (62 40%)
077	D83G/E100W/A217G/H363R	39% a 72°C (62 40%)
078	E100W/Y179W/A217G/H363R	48% a 72°C (62 40%)
079	E100W/A217G/K234V/K251 E/I286T/H363R	60% a 72°C (62 40%)
081	E100W/A217G/K234V/P348R/H363R	50% a 72°C (62 35%)
082	Q9S/R18K/A89A/D92Y/H115M/A217G/K234V/ H363R	61% a 72°C (62 35%)
082v2-1	Q9S/D92Y/H115M/A217G/K234V/H363R	61 % a 72°C (62 35%)
083	Q9S/N78Q/D92Y/L112S/H115M/K234V/P348R/ H363R	39% a 72°C (62 35%)
084	Q9S/N78Q/A89A/D92Y/H115M/A132V/Q162R/ Q181L/A217G/K234V/P348R(reference)	64% a 72°C (62 35%)
		Referencia=WT y/o variante n.º 69
085	Q9S/E54C/D92Y/A101C/H143C/Q193R/I201C/ A217G/H363R	82% a 72°C (69 74% WT 14%)
086	E54C/N78S/D92Y/A101C/H143C/L199C/A217G/ H363R	74% a 72°C (wt 49% 69 80%)
088	E54C/A101C/M168V/A217G/H363R	33% a 72°C (62 36% 69 73%)
089-1	P82S/D92Y/E100W/H143C/I201C/A217G/H363R	65% a 72°C (62 36% 69 73%)
089-2	P82S/D92Y/E100W/H143C/I201C/A217G/H363R	65% a 72°C (62 36% 69 73%)
090	Q9S/N78Q//D92Y/L112S/H115M/A217G/K234V/ P348R/H363R	65% a 72°C (62 36% 69 73%)
091	D92Y/A217G/K234V/H363R	81% a 72°C (62 36% 69 73%)
092-1	Y64S/D92Y/E100W/Y179W/A217G/H363R	80% a 72°C (69 74% WT 14%)
092-2	D92Y/A217G/H363R	80% a 72°C (69 74% WT 14%)
094	Q9S/N78Q/A89A/D92Y/H115M/A132V/H143C/ Q162R/Q181L/I201C/A217G/K234V/P348R	54% a 74°C (wt 9% 69 45%)
095	Q9S/N78Q/A89A/D92Y/H115M/A132V/K139C/ Q162R/Q181L/I201C/A217G/K234V/P348R	75% a 74°C (wt 9% 69 45%)
097	Q9S/N78Q/A89A/D92Y/H115M/A132V/Q162R/ Y179W/Q181L/A217G/K234V/P348R	76% a 74°C (wt 9% 69 45%)
100	D33C/D92Y/E100W/Y179C/A217G/H363R/	49% a 72°C (69 79%)
103-1	Q9S/N78Q/A89A/D92Y/H115M/A132V/Q162R/ Y179W/A217G/K234V/P348R/H363R	103% a 72°C (69 88%)
103-3	Q9S/N78Q/A89A/D92Y/H115M/A132V/Q162R/ Y179W/A217G/K234V/S261 F/P348R/H363R	99% a 72°C (69 88%)
		Referencia=variante 69 y/o variante 84
101	D92Y/E100W/A217G/H363R/+ 116-123(HQQNTQQA->TQADTSSP)	21% a 76°C (69 39%, 84 55%)
102	Q9S/E54C/D92Y/A101C/H143C/Q193R/I201C/ A217G/N298S/H363R +116-123(HQQNTQQA->TQADTSSP)	29% a 76°C (69 39%, 84 55%)
104	Q9S/N78Q/A69A/D92Y/H115M/A132V/K139C/ G151 D/Q162R/Y179W/Q181L/I201 C/A217G/ K234V/P348R(reference)	55% a 74°C (69 57% 84 65%)
105	D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/N247D/H363R	77% a 74°C (69 57% 84 65%)

ES 2 544 645 T3

	(reference)	
		Referencia=variante 104 y variante 69
106	E54C/D92Y/A101C/M168V/A217G/H363R	22% a 74°C (104 70% 69 54%)
107	Q9S/N78Q/A132V/K139C/Q162R/Y179W/I201C/ A217G/K234L/P348R/H363R	34% a 74°C (104 70% 69 54%)
		Referencia=variante 105
108	D92Y/E100W/H143C/A144R/I201C/A217G/ N247D/H363R	37% a 80°C (105 36%)
109	D92Y/E100W/H116S/K139C/I201C/A217G/ N247D/H363R	43% a 78°C (105 36%)
110	D92Y/E100W/H128R/K139C/H143V/I201C/ A217G/N247D/H363R	44% a 78°C (105 36%)
111	D92Y/E100W/K139C/I201C/N206G/A217G/ N247D/H363R	45% a 78°C (105 36%)
112	D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/N247D/ H363R	51% a 78°C (105 36%)
113	D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/N247D/ Q256D/H363R	98% a 78°C (105 36%)
114	D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/N247D/ H363R	49% a 78°C (105 36%)
115	D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/N247D/ N344K/H363R	32% a 78°C (105 36%)
117	D92Y/E100W/K139C/A144S/K176E/I201C/ A217G/K234V/N247D/H363R	38% a 80C (105 34%)
118	D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/ N247D/H363R/E54C/H55E/A101C	32% a 80C (105 34%)
123	D92Y/E100W/K139C/T152A/I201C/A217G/ K234V/N247D/H363R	27% a 80C (105 15%)
124	Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152I/I201C/ A217G/K234V/N247D/H363R	17% a 80C (105 15%)
125	D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/ N247D/S284C/H363R	20% a 80C (105 15%)
126	D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/ N247D/T287W/H363R	20% a 80C (105 15%)
127	D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/ N247D/R289M/H363R	18% a 80C (105 15%)
128	Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/ K234V/N247D/R289W/H363R	17% a 80C (105 15%)
129	N78Q/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/ K234V/N247D/Q256D/H363R	103% a 80C (105 34%)
130	D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/ N247D/Q256D/P348R/H363R	99% a 80C (105 34%)
131	D92Y/E100W/K139C/Q162R/Q181L/I201C/ A217G/K234V/N247D/Q256D/H363R	76% a 80C (105 34%)
132	D92Y/E100W/A113G/K139C/I201C/A217G/ K234V/N247D/H363R	34% a 80C (105 34%)
133	D92Y/E100W/T120GorA*/K139C/I201C/	41% a 80C (105 34%)

ES 2 544 645 T3

	A217G/K234V/N247D/H363R/L395LorV	
135	D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/ N247D/S284M/H363R	24% a 80C (105 34%)
137	D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/ N247D/H363R/A366S	31 % a 80C (105 34%)
138	D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/ N247W/Q256D/H363R	89% a 80C (10514%)
140	D92Y/E100W/H128R/K139C/I201C/A217G/ K234V/N247E/Q256D/H363R	49% a 80C (10514%)
141	D92Y/E100W/K139C/Q141S/I201C/A217G/ K234V/N247D/H363R	24% a 80C (105 14%)
142	D92Y/E100W/K139C/A144S/I201C/A217G/ K234V/N247D/H363R	18% a 80C (10514%)
144	P75N/K76N/D77Q/N78T/D92Y/E100W/K139C/ I201C/A217G/K234V/N247D/Q256D/H363R	71 % a 80C (105 30%)
145	D92Y/E100W/K139C/D173N/P175S/I201C/ A217G/K234V/N247D/Q256D/H363R	27% a 80C (105 30%)
147	D92Y/E100W/K139C/T152A/I201C/A217G/ K234V/N247D/Q256D/I294T/H363R	90% a 80C (105 26%)
		Referencia=variante 113
143	D33N/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/ K234V/N247D/Q256D/H363R	29% a 80C (113 62%)
148	Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152I/I201C/ A217G/K234V/N247D/Q1256D/H363R	74% a 80C (113 80%)
150	D92Y/E100W/K139C/T152A/I201C/A217G/ K234V/N247D/Q256D/H363R	67% a 82C (113 33%)
151	D92Y/T98S/E100W/K139C/T152A/I201C/ A217G/K234V/N247D/Q256D/H363R	29% a 82C (113 33%)
152	D92Y/T98S/E100W/K139C/T152A/L199S/ I201C/A217G/K234V/N247W/Q256D/H363R	38% a 80C (113 80%)
153	Y48H/D92Y/T98S/E100W/K139C/T152A/ I201C/A217G/K234V/N247W/Q256D/H363R	38% a 80C (113 54%)
154	E54C/D92Y/A101C/K139C/I201C/A217G/ K234V/N247D/Q256D/H363R	91% a 80C (113 73%)
155	Y48H/E54C/D92Y/A101C/K139C/I201C/ A217G/K234V/N247D/R289W/H363R	88% a 80C (113 80%)
156	D92Y/T98S/E100W/K139C/T152A/I201C/ A217G/K234V/N247W/Q256D/R289W/H363R	41% a 82C (113 33%)
157	Y48H/D92/E100W/K139C/T152I/I201C/A217G/ K234V/N247W/Q1256D/R289W/H363R	79% a 80C (113 80%)
158	Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/ K234V/N247W/Q256D/H363R	95% a 80C (113 80%)
159	Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152A/I201C/ A217G/K234V/N247D/R289W/H363R	20% a 80C (113 57%)
160	Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152A/I201C/ A217G/K234V/N247W/Q256D/H363R	92% a 80C (113 80%)

ES 2 544 645 T3

161	Y48H/E54C/D92Y/A101C/K139C/T152A/ 1201C/A217G/K234V/N247D/R289W/H363R	55% a 80C (113 80%)
162	Y48H/E54C/D92Y/A101C/K139C/I201C/A217G/ K234V/N247W/R289W/H363R	56% a 80C (113 80%)
163	Y48H/E54C/D92Y/A101C/K139C/T152A/I201C/ A217G/K234V/N247W/R289W/H363R	66% a 80C (113 80%)
		Referencia=variante 138
164	Y48H/E54C/D92Y/E100W/A101C/K139C/T152A/ 1201C/A217G/K234V/N247W/Q256D/H363R	94% a 80C (138 78%)
165	Y48H/E54C/D92Y/A101C/K139C/T152A/I201C/ V208T/A217G/K234V/N247D/R289W/H363R	65% a 80C (138 78%)
166	T35A/Y48H/E54C/P75N/K76N/D77Q/N78T/ D92Y/A101C/K139C/T152A/I201C/A217G/K234V/ N247D/R289W/H363R	15% a 80C (138 78%)
167	Y48H/E54C/D92Y/A101C/K139C/T152A/I201C/ K207Q/V208T/A217G/K234V/N247D/R289W/H363R	61 % a 80C (138 78%)
		Referencia=wt
168	E54C/D92Y/A101C/K139C/I201C/A217G/ Q256D/H363R	69% a 80C (w 7%)
169	E54C/P75N/K76N/D77Q/N78T/D92Y/A101C/ K139C/I201C/A217G/H363R	33% a 80C (w 7%)
170	E54C/D92Y/A101C/K139C/I201C/V208T/ A217G/H363R	32% a 80C (w 7%)
171	E54C/P75N/K76N/D77Q/N78T/D92Y/A101C/ K139C/I201C/V208T/A217G/H363R	36% a 80C (w 7%)
172	Y48H/E54C/P75N/K76N/D77Q/N78T/D92Y/ A101C/K139C/T152A/I201C/V208T/A217G/K234V/ N247D/R289W/H363R	48% a 80C (w 7%)
173	E54C/P75N/K76N/D77Q/N78T/D92Y/A101C/ K139C/I201C/V208T/A217G/K234V/N239S/N247D/ Q256D/H363R	50% a 80C (w 7%)

Ejemplo 4. Termoestabilidad

5 [0238] Una alícuota de la muestra de proteína de fitasa *Hafnia alvei* (purificada como se describe en el ejemplo 1) fue bien desalada y cambiada de búfer en 20 mM de Na-acetato, pH 4,0 usando una columna preempaquetada PD-10 dializada contra 2 x 500 ml 20 mM de Na-acetato, pH 4,0 a 4° C en un paso de 2-3h seguido por un paso durante toda la noche. La muestra fue 0,45 µm filtrada y diluida con tampón para aprox. 2 unidades A280. El tampón de diálisis fue usado como referencia en la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las muestras fueron desgasificadas usando succión de vacío y agitando durante aprox. 10 minutos.

10 [0239] Se realizó una calorimetría por análisis diferencial en un calorímetro VP-DSC de MicroCal a una tasa de barrido constante de 1,5 °C/min de 20-90 °C. La manipulación de datos fue realizada usando el software Origin de MicroCal (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.

15 [0240] Los resultados de la DSC para variantes de fitasa *Hafnia alvei* se resumen en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Termoestabilidad comparativa de fitasas *Hafnia alvei*

Variante	1.º calorimetría Td (°C)
A150C/L259C	62,4

ES 2 544 645 T3

Q162N/R96N	63,8
L16V/I1310L/I313L/M319L/M354L	64,3
V87I/L103A/L112I/A113T/I114V	67,4
E66C/L370C	67,2
H363R	68,3
Q162N/G186S	67,5
E54C/A101C	68,0
V130L/M137L/V146I/I120V/M260L/I266V	67,8
wt	69
K45P	70,9
K139C/I201C	70,8
E54C/A101C/K139C/I201C	72,6
D92Y/E100W/A217G/H363R	75,1
Q9S/N78Q/A89A/D92Y/H115M/A132/ K139C/Q162/Q181L/I201C/A217G/K234V/P348R	75,5
Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152I/I201C/A217G/K234V/N247D/H363R	77,7
D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/N247D/H363R	78,0
Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/N247D/R289W/H363R	78,9
E54C/D92Y/A101C/K139C/I201C/A217G/H363R	79,8
E54C/D92Y/A101C/K139C/I201C/A217G/K234V/N247D/Q256D/H363R	80,0
Y48H/E54C/D92Y/A101C/K139C/T152A/I201C/A217G/K234V/N247D/R289W/H363R	80,2
Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/N247D/Q256D/H363R	81,7
Y48H/D92Y/T98S/E100W/K139C/T152A/I201C/A217G/K234V/N247W/Q256/H363R	82,7
Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152A/I201C/A217G/K234V/N247W/Q256D/H363R	83,1
D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/N247W/Q256D/H363R	84,2
S1QGPS/K26H/E54C/A101C/K139C/Q162N/G186S/I201C/K207Q/G346S	71,9

Ejemplo 5. Perfil de temperatura

- 5 [0241] El perfil de temperatura (actividad de fitasa como una función de temperatura) fue determinado para la fitasa de *Hafnia alvei* y las variantes en el intervalo de temperatura de 20-90°C esencialmente como se describe anteriormente ("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
- 10 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 4 de abajo. Los números dados para cada temperatura son actividad relativa (en %) normalizados al valor en condiciones óptimas.

Tabla 4: Perfiles de temperatura relativa en estabilidad del orden de 75°C

Variante de fitasa	Temperatura (°C)										
	20	30	40	50	60	65	70	75	80	85	90
*wt	18	29	50	75	100	94	93	24	12	7	5

ES 2 544 645 T3

*K131Q	21	34	53	77	94	99	100	26	16	10	6
Q162N/D138N	17	28	44	66	88	100	95	26	14	9	7
1294L	18	30	46	64	90	100	90	26	14	11	11
G72A	17	29	45	67	83	100	78	26	13	11	8
H143C/I201C	10	22	37	62	85	100	91	26	5	5	4
Q162R	18	30	49	73	91	100	95	26	15	11	9
I49L	17	29	45	65	90	100	94	26	13	9	11
*E66C/L370C	15	27	43	66	100	88	99	27	12	6	5
T369S	18	28	47	64	92	100	95	27	15	11	9
I201V	16	27	41	59	78	100	82	27	13	11	8
K148R	19	35	51	71	98	97	100	27	11	7	6
A163K	14	27	38	63	79	100	93	27	12	9	6
S1QS	15	26	40	62	87	93	100	27	9	4	2
F8M	15	27	38	67	96	100	91	27	10	5	5
F8Y	16	27	44	69	96	100	93	27	10	6	6
T242S	18	30	48	66	91	100	93	27	12	11	10
K176R	17	33	43	66	100	96	96	28	8	5	3
S403N	14	32	42	67	84	100	96	28	14	10	8
S1P	17	27	44	60	87	100	92	28	13	11	8
E41Q	16	28	44	63	87	100	99	28	13	9	9
*K131L	18	30	50	72	85	95	100	29	15	8	4
*K207R	18	30	48	70	88	93	100	29	15	8	5
*K207Q	23	37	58	81	92	97	100	29	18	10	7
G346S	16	28	47	65	95	100	92	29	10	6	4
T308A	9	17	33	56	80	99	100	29	12	9	6
S396K	19	31	44	69	86	100	87	30	14	12	10
L401N	14	33	43	68	86	100	87	30	13	10	7
I201G	16	28	43	62	81	100	87	30	14	11	8
P348R	18	30	43	62	81	100	91	31	14	11	8
E100W	18	29	40	61	79	100	85	31	13	10	7
K187E	16	28	39	66	90	100	92	31	10	-6	4
N239R	19	30	48	66	89	100	96	32	12	11	10
A304V	15	24	42	58	86	100	98	32	14	11	8
S396D	16	28	41	60	81	100	87	32	13	10	8
T152G	16	28	42	66	85	100	95	32	14	10	9
K12R	18	29	42	64	82	100	98	33	14	12	8
1303L	17	27	40	62	86	100	88	33	13	11	10
Q162N	16	27	42	62	89	90	100	34	10	7	3

ES 2 544 645 T3

S192A	17	26	43	59	88	100	94	35	13	9	9
T369D	18	29	43	66	86	100	90	35	14	12	11
V130L/M137L/V146I/I201V/ M260L/I266V	13	25	43	67	89	98	100	35	14	10	6
Q109G	17	33	44	68	94	100	94	36	11	6	
N239K	19	31	47	70	92	100	94	38	14	12	11
K234V	17	29	42	63	79	100	94	39	15	11	8
K234E	17	27	43	61	86	100	92	40	15	11	7
H363R	18	28	42	66	90	100	90	41	11	6	5
S261A	13	24	39	62	83	98	100	41	14	10	7
A217G	14	32	41	65	84	100	90	43	15	11	7
E54C/A101C/K207Q	21	33	48	68	89	100	95	55	13	10	6
K45P	19	29	43	68	86	100	93	59	18	11	10
E54C/A101C	16	27	42	64	85	100	88	64	9	7	4
D33C/E54C/A101C/Y179C	16	31	45	67	94	100	82	74	9	6	3
E54C/A101C/K139C/I201C/ K207Q	18	30	41	62	85	80	100	84	36	9	10
D92Y/E100W/A217G/H363R	6	13	27	50	89	85	100	84	32	10	5
E54C/A101C/K139C/I201C	15	28	40	59	86	78	100	86	47	8	9
K139C/I201C	18	25	37	56	91	91	100	87	15	7	4
S1QGPS/K26H/E54C/A101C/ K139C/Q162N/G186S/I201C/ K207Q/ G346S	26	37	49	67	80	100	92	90	18	13	10
Y48H/E54C/D92Y/A101C/ K139C/T152A/I201C/K207Q/ V208T/A217G/K234V/N247D R289W/ H363R	10	20	39	63	85	81	100	92	58	11	6
T35A/Y48H/E54C/P75N/K76N/ D77Q/N78T/D92Y/A101C/ K139C/ T152A/I201C/A217G/K234V/ N247D/R289W/H363R	5	9	28	50	77	80	100	93	13	5	1
Y48H/E54C/D92Y/A101C/ K139C/T152A/I201C/V208T/ A217G/K234V/N247D/ R289W/ H363R	5	13	26	53	76	83	100	95	75	11	4
E54C/D92Y/A101C/K139C/ I201C/A217G/H363R	10	15	28	52	81	93	100	96	83	10	1
E54C/D92Y/A101C/K139C/ I201C/A217G/K234V/N247D/ Q256D/ H363R	9	16	33	58	81	84	100	96	79	18	6
D92Y/E100W/K139C/I201C/ A217G/ K234V/N247D/ H363R	6	13	27	49	85	84	100	98	71	13	6
P75N/K76N/D77Q/N78T/ D92Y/E100W/K139C/I201C/ A217G/K234V/N247D/Q256D/	6	15	30	51	81	82	100	98	76	20	5

ES 2 544 645 T3

H363R											
Y48H/D92Y/E100W/K139C/	8	11	25	44	78	88	100	99	68	10	2
1201C/A217G/K234V/N247D/ R289W/ H363R											
Q9S/N78Q/A89A/D92Y/H115M/ A132V/K139C/ Q162R/Q181L/I201C/A217G/ K234V/P348R	8	16	32	54	85	86	100	100	81	14	6
Y48H/D92Y/E100W/K139C/ 1201C/A217G/K234V/N247D/ Q256D/H363R	3	12	24	46	77	89	85	100	75	14	1
Y48H/D92Y/E100W/K139C/ T152I/I201C/A217G/K234V/ N247D/ H363R	4	12	24	45	76	92	87	100	66	14	4
D92Y/E100W/K139C/I201C/ A217G/K234V/N247W/Q256D/ H363R	9	16	22	47	70	81	89	100	78	24	6
D92Y/E100W/K139C/D173N/ P175S/I201C/A217G/K234V/ N247D/ Q256D/H363R	6	16	37	52	81	89	88	100	37	9	3
Y48H/D92Y/E100W/K139C/ I201C/ V208T/A217G/K234V/N247D/ Q256D/H363R	9	15	22	47	76	91	90	100	68	18	6
Y48H/E54C/D92Y/A101C/ K139C/I201C/A217G/K234V/ N247D/R289W/H363R	9	16	26	57	78	89	90	100	80	21	7
Y48H/D92Y/E100W/K139C/ 1201C/A217G/K234V/N247W/ Q256D/ H363R	9	12	19	46	68	76	85	100	77	29	4
Y48H/D92Y/E100W/K139C/ T152A/I201C/A217G/K234V/ N247W/Q256D/H363R	8	12	20 -	46	66	78	80	100	81	33	4
Y48H/E54C/D92Y/A101C/ K139C/T152A/I201C/A217G/ K234V/ N247D/R289W/ H363R	4	8	21	44	80	91	88	100	81	17	3
Y48H/E54C/D92Y/A101C/ K139C/1201C/A217G/K234V/ N247W/ R289W/H363R	7	13	22	48	76	87	84	100	82	24	6
Y48H/E54C/D92Y/A101C/ K139C/ T152A/I201C/A217G/K234V/ N247W/R289W/H363R	5	11	20	46	77	89	79	100	81	27	4

Tabla 5: Estabilidad térmica a 75° C, actividad relativa a la actividad máxima

Mutación	Actividad relativa
wt	24
K131Q	26

ES 2 544 645 T3

Q162N/D138N	26
I294L	26
G72A	26
H143C/I201C	26
Q162R	26
I49L	26
E66C/L370C	27
T369S	27
I201V	27
K148R	27
A163K	27
S1QS	27
F8M	27
F8Y	27
T242S	27
K176R	28
S403N	28
S1P	28
E41Q	28
K131L	29
K207R	29
K207Q	29
G346S	29
T308A	29
S396K	30
L401N	30
I201G	30
P348R	31
E100W	31
K187E	31
N239R	32
A304V	32
S396D	32
T152G	32
K12R	33
1303L	33
Q162N	34
S192A	35

ES 2 544 645 T3

T369D	35
V130L/M137L/V146I/I201V/ M260L/I266V	35
Q109G	36
N239K	38
K234V	39
K234E	40
H363R	41
S261A	41
A217G	43
E54C/A101C/K207Q	55
K45P	59
E54C/A101C	64
D33C/E54C/A101C/Y179C	74
E54C/A101C/K139C/I201C/ K207Q	84
D92Y/E100W/A217G/H363R	84
E54C/A101C/K139C/I201C	86
K139C/I201C	87
S1QGPS/K26H/E54C/A101C/ K139C/Q162N/G186S/I201C/K207Q/G346S	90
Y48H/E54C/D92Y/A101C/K139C/T152A/I201 C/K207QN208T/A217G/ K234V/N247D R289W/H363R	92
T35A/Y48H/E54C/P75N/ K76N/ D77Q/N78T/D92Y/A101C/ K139C/ T152A/I201 C/A217G/K234V/ N247D/R289W/H363R	93
Y48H/E54C/D92Y/A101C/ K139C/ T152A/I201CN208T/ A217G/ K234V/N247D/ R289W/ H363R	95
E54C/D92Y/A101C/K139C/ I201C/ A217G/H363R	96
E54C/D92Y/A101C/KI39C/ I201C/A217G/K234V/N247D/ Q256D/ H363R	96
D92Y/E100W/K139C/I201C/ A217G/ K234V/N247D/ H363R	98
P75N/K76N/D77Q/N78T/ D92Y/ E100W/K139C/I201C/ A217G/K234V/N247D/ Q256D/H363R	98
Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/N247D/ R289W/ H363R	99
Q9S/N78Q/A89A/D92Y/H115M/ A132V/K139C/ Q162R/Q181 L/I201C/A217G/ K234V/ P348R	100
Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201 C/A217G/K234V/N247D/Q256D/H363R	100
Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152VI201C/A217G/K234V/N247D/H363R	100
D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/N247W/Q256D/ H363R	100
D92Y/E100W/K139C/D173N/ P175S/I201C/A217G/K234V/ N247D/Q256D/ H363R	100
Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/V208T/A217G/K234V/N247D/Q256D/H363R	100
Y48H/E54C/D92Y/A101 C/K139C/I201 C/A217G/K234V/N247D/R289W/H363R	100
Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/N247W/Q256D/H363R	100
Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152A/I201C/A217G/K234V/N247W/Q256D/H363R	100
Y48H/E54C/D92Y/A101C/K139C/T152A/I201C/A217G/K234V/N247D/R289W/ H363R	100
Y48H/E54C/D92Y/A101C/K139C/I201C/A217G/K234V/N247W/R289W/H363R	100

Y48H/E54C/D92Y/A101C/ K139C/T152A/I201C/A217G/K234V/ N247W/R289W/H363R

100

Ejemplo 6. Perfil de pH

5 [0242] El perfil de pH se determinó a 37°C en el intervalo de pH de 2,0 a 7,5 (en pasos de 0,05 unidades de pH) como se describe eanteriormente en la sección "Determinación de la actividad de fitasa", exceptuando que se usó un cóctel de tampón (50 mM de glicina, 50 mM de ácido acético y 50 mM de bis-tris en vez del tampón de 0,25 M de acetato sódico pH 5,5. Los resultados se resumen en la Tabla 1 de abajo. Los valores dados para cada pH en el intervalo de 2, 0-7,5 son la actividad relativa en % normalizada al valor óptimo.

Tabla 6: Perfiles de pH relativos a 37° C

Mutación/pH	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5
K26P	72	89	100	96	81	67	55	37	21	8	1	3
K26Q	40	69	91	100	98	95	84	59	35	12	-1	1
K26R	48	66	85	100	99	98	87	64	40	14	2	-1
D92Y/E100W/ A217G/H363R	63	78	94	100	95	76	46	20	7	1	-1	9
Q9S/N78Q/A89A/ D92Y/H115M/ A132V/K139C/ Q162R/Q181L/ I201C/A217G/ K234V/P348R	50	68	90	100	99	79	42	17	3	0	0	5
T35C/L172C	39	65	87	100	99	94	73	51	30	10	1	1
D92Y/E100W/ A217G/H363R	63	78	94	100	95	76	46	20	7	1	-1	9
Q9S/N78Q/A89A/D9 2Y/H115M/A132V/ K139C/Q162R/Q181 L/ I201C/ A217G/ K234V/P348R	50	68	90	100	99	79	42	17	3	0	0	5
H143C/I201C	49	71	89	100	93	90	77	55	33	12	2	0
Y48H/E54C/D92Y/ A101C/K139C/ I201C/A217G/ K234V/N247D/ R289W/ H363R	42	65	89	100	98	85	53	21	7	1	0	-1
Y48H/E54C/D92Y/ A101C/K139C/ T152A/I201C/ A217G/K234V/N247 W/R289W/H363R	47	62	89	100	97	85	52	18	6	0	0	0
T35A/Y48H/E54C P75N/K76N/D77Q/ N78T/D92Y/A101C/ K139C/T152A I201C/A217G/ K234V/N247D/ R289W/H363R	41	74	88	100	96	78	49	17	5	0	-1	-2
Y48H/E54C/D92Y/ A101C/ K139C/	39	70	87	100	94	82	52	21	7	2	1	-1

ES 2 544 645 T3

T152A/ I201C/ A217G/ K234V/ N247D/R289W/ H363R												
E54C/D92Y/A101C/ K139C/ I201C/ A217G/H363R	40	65	87	100	99	88	57	23	7	1	0	-1
Y48H/E54C/D92Y/ A101C/ K139C/ T152A/I201C/ V208T/ A217G/ K234V/N247D/ R289W/H363R	40	70	84	100	98	90	65	29	11	3	1	-1
K131P	50	64	83	95	100	99	95	83	65	36	5	3
K131Q	51	67	82	98	100	99	95	80	69	39	7	-2
K207R	38	51	71	85	100	97	95	81	50	27	3	3
D33C/Y179C	40	53	72	86	100	92	83	65	38	18	2	5
G325C/T358C	40	54	78	93	100	100	90	68	41	16	0	-3
H228C/H363C	36	53	75	92	100	97	88	67	38	16	2	-1
A150C/L259C	36	57	78	95	100	97	89	64	42	16	3	-2
D92Y/E100W/ K139C/I201C/ A217G/N247D/ H363R	58	73	90	99	100	84	49	20	6	1	-1	3
D92Y/E100W/ K139C/I201C/ A217G/K234V/ N247D/ H363R	58	73	90	99	100	84	49	20	6	1	-1	3
T308A	39	58	79	99	100	94	85	76	55	36	4	-3
E54C/A101C	42	55	77	98	100	90	85	63	0	15	2	1
Y48H/D92Y/E100W/ K139C/T152I/ I201C/A217G K234V/ N247D/ H363R	54	68	84	98	100	93	54	20	5	0	0	-6
K131Q Q	51	67	82	98	100	99	95	80	9	39	7	-2
I49L	40	62	83	97	100	94	80	58	37	14	2	-1
Y48H/E54C/D92Y /A101C/ K139C/ I201C/A217G/ K234V/ N247W/ R289W/H363R	42	62	87	96	100	81	50	22	6	0	0	-1
Q162N	40	66	75	96	100	93	91	73	47	22	6	1
Y48H/D92Y/E100W/ K139C/201C/ A217G/K234V/ N247D/R289W/ H363R	46	69	86	95	100	79	55	23	9	2	0	0
Y48H/D92Y/E100W/ K139C/T152A/ 1201 C/A217G/ K234V/	41	59	75	94	100	95	66	24	6	1	0	-1

ES 2 544 645 T3

N247W/ Q256D/H363R												
E66C/L370C	33	58	80	94	100	100	87	66	41	14	2	0
E41Q	44	62	78	93	100	97	86	68	41	17	3	0
Q109G	37	57	77	92	100	100	96	73	48	23	41	0
A163K	47	63	75	92	100	99	89	67	41	13	3	0
Y48H/D92Y/E100W/ K139C/I201C/ A217G/K234V/ N247D/Q256D/ H363R	50	55	72	91	100	91	57	19	4	-1	-1	-1
A304V	53	60	82	91	100	95	88	68	45	19	3	3
E54C/D92Y/A101C/	35	48	68	90	100	94	64	22	6	0	-1	-1
K139C/I201C/ A217G/K234V/ N247D/ Q256D/ H363R												
P75N/K76N/D77Q/ N78T/ D92Y/ E100W/K139C/ I201C/A217G/ K234V/N247D/ Q256D/H363R	42	55	71	88	100	95	62	23	6	0	0	0
D92Y/E100W/ K139C/I201 C/ A217G/K234V/ N247W/Q256D/ H363R	37	51	65	89	100	97	69	20	2	-3	-5	-4
Y48H/D92Y/T98S/ E100W/ K139C/ T152A/I201C/ A217G/K234V/ N247W/Q256D/ H363R	39	50	69	89	100	99	73	28	8	0	-1	-1
K234E	44	53	75	88	100	99	95	71	47	19	3	1
D92Y/E100W/ K139C/D173N/ P175S/I201C/ A217G/ K234V/ N247D/ Q256D/ H363R	44	54	70	87	100	93	62	22	5	1	0	-1
K207R	38	51	71	85	100	97	95	81	50	27	3	3
D33C/E54C/A101C/ Y179C	37	59	74	84	100	88	82	65	41	21	5	2
Q162N/D138N	39	58	81	95	100	100	91	71	47	21	4	3
Q162R	38	58	78	88	100	100	96	72	48	22	3	0
N285D	45	61	81	96	100	100	97	71	39	18	2	7
E66C/L370C	33	58	80	94	100	100	87	66	41	14	2	0
T369S	46	56	79	92	100	100	94	72	47	22	3 2	-1
S192A	46	58	81	90	100	100	93	62	42	15	2	0

ES 2 544 645 T3

Y48H/E54C/D92Y/ A101C/K139C/ T152A/I201C/ K207Q/V208T/ A217G/K234V/ N247D/ R289W/ H363R	36	63	83	96	100	100	85	61	36	14	2	-1
Tipo salvaje	41	57	77	93	99	100	94	75	48	20	3	0
K131L	45	59	75	93	98	100	96	84	71	44	13	-1
D33C/P178C	37	61	77	90	94	100	88	66	43	15	1	1
F63C/L368C	29	55	78	92	98	100	83	65	38	14	2	-1
S1QS	45	56	80	86	99	100	83	63	45	14	3	0
1303L	40	59	75	89	98	100	91	73	45	18	2	0
F8Y	44	59	78	93	98	100	88	64	37	14	3	-4
1201V	36	53	73	91	98	100	88	68	40	13	-1	-2
Y48H/D92Y/E100W/ K139C/I201C/ V208T/A217G/ K234V/ N247D/ Q256D/H363R	46	60	76	88	98	100	74	35	10	1	0	1
K176R	38	58	76	90	97	100	94	72	45	18	0	-4
S1P	46	56	80	90	97	100	84	64	40	15	2	-2
T242S	38	58	73	85	97	100	97	73	48	22	2	-1
S396D	41	54	76	87	97	100	93	71	47	19	4	0
F8M	48	57	71	90	96	100	82	70	40	14	5	1
N239R	32	46	69	93	96	100	98	74	50	24	1	2
N239K	38	52	70	91	96	100	95	73	48	20	3	0
S396K	37	51	72	87	96	100	96	73	46	21	3	-1
K139C/I201C	34	48	69	84	96	100	94	72	45	17	1	-2
K148R	35	57	70	90	95	100	92	75	47	15	1	-1
P348R	38	54	73	91	95	100	98	72	48	25	3	1
I201G	36	52	73	93	95	100	89	68	41	14	-1	-5
V130UM137U V146I/I201V/ M260L/I266V	32	53	69	88	95	100	89	71	52	26	8	2
T152G	30	50	67	84	94	100	95	73	47	19	2	0
L401N	30	50	63	87	94	100	100	72	50	23	2	1
I294L	37	53	78	83	93	100	94	73	46	20	2	-1
G346S	34	55	71	86	93	100	90	69	43	18	2	-5
H363R	29	50	67	87	92	100	96	77	49	22	2	0
T369D G72A	35	54	68	82	92	100	90	72	51	18	3	0
	35	47	67	85	90	100	80	61	37	14	-1	-2
E54C/A101C/ K139C/I201C	37	49	75	87	90	100	89	66	50	23	6	0

ES 2 544 645 T3

S261A	30	46	69	83	90	100	84	67	43	19	-1	-3
K187E	34	57	72	88	89	100	92	70	44	21	1	-1
E54C/A101C/ K139C/1201C/ K207Q	28	48	65	79	89	100	98	85	71	47	18	1
A217G	39	54	73	85	88	100	85	59	39		-1	-1
K207L	41	52	69	84	92	98	100	92	69	41	11	1
K207Q	38	49	69	83	95	95	100	92	65	45	10	5
S403N	33	51	72	85	99	99	100	77	49	22	1	-1
K45P	34	60	72	90	91	98	100	75	48	23	2	0
E100W	29	44	69	78	93	98	100	84	57	28	3	0
S1QGPS/K26H/ E54C/A101C/ K139C/Q162N/ G186S/I201C/ K207Q/ G346S	38	54	69	83	92	98	100	88	64	29	2	-1
K234V	35	54	65	94	93	96	100	74	44	26	3	1
E54C/A101C/K207Q	34	52	70	85	96	96	100	92	76	47	14	1
K207Q	38	49	69	83	95	95	100	92	65	45	10	5

Ejemplo 7: Estabilidad del vapor

Método 1

5

[0243] La actividad residual de las moléculas de fitasa después del tratamiento de vapor fue evaluada usando el siguiente ensayo:

10

20 µL de cada muestra de enzima purificada se dispensa en un único pocillo de una placa de 96 pocillos de Corning® (1 x 8 Stripwell™) (Corning, Lowell, MA, EE. UU.) y posteriormente es evaporada a sequedad en un centrifugador de vacío (Genevac EZ-1 Plus, Genevac Ltd, Suffolk, Reino Unido). La incubación de vapor se realiza en un contenedor styropor cerrado con las dimensiones internas 27 x 18 x 20 cm. Las muestras, en bandas abiertas, se colocan aproximadamente 10 cm sobre el fondo del contenedor en una cremallera metálica, para no estar en contacto con el agua.

15

[0244] Un litro de agua hirviendo se vierte en el contenedor, la tapa se cierra y la temperatura del vapor producido es monitoreada usando un termómetro montado en la tapa del contenedor. La incubación procede durante 60 segundos desde el momento que el agua se vierte en el contenedor. Durante este periodo, la temperatura aumenta a aproximadamente 85° C. Inmediatamente después de la incubación, las muestras son enfriadas en hielo, resuspendidas y evaluadas respecto a la actividad de la fitasa usando ensayo de fosfato de p-nitrofenilo colorimétrico (pNPP) (Sigma, Broendby, DK). Cada muestra enzimática es comparada con una muestra similar que ha sido tratada con vapor para calcular la actividad residual.

20

[0245] Los resultados se presentan en tablas 7 y 8 más abajo.

Tabla 7: Estabilidad al vapor determinada por el método 1

Variante	Actividad residual [%]
<i>Experimento 1</i>	<i>Wt 12</i>
E66C/L370C	23
D33C/E54C/A101C/Y179C	22
<i>Experimento 2</i>	<i>Wt 14</i>
G346S	25

Q109G	22
H143C/I201C	16
<i>Experimento 3</i>	<i>Wt 10</i>
Q162N (realizado dos veces)	31;35
<i>Experimento 4</i>	<i>Wt 20</i>
E54C/D92Y/A101C/K139C/I201C/A217G/H363R	88
Q9S/N78Q/A89A/D92Y/H115M/A132V/K139C/ Q162R/Q181L/I201C/A217G/K234V/P348R	62
D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/N247D/H363R	51
D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/N247D/ Q256D/H363R	54
Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152I/I201C/ A217G/K234V/N247D/H363R	45
Y48H/D92Y/T98S/E100W/K139C/T152A/ I201C/A217G/K234V/N247W/Q256D/H363R	86
E54C/D92Y/A101C/K139C/I201C/A217G/ K234V/N247D/Q256D/H363R	91
Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152A/I201C/ A217G/K234V/N247W/Q256D/H363R	88
Y48H/E54C/D92Y/A101C/K139C/T152A/ I201C/A217G/K234V/N247D/R289W/H363R	90
Y48H/E54C/D92Y/A101C/K139C/T152A/I201C/ V208T/A217G/K234VM247D/R289W/H363R	95
T35A/Y48H/E54C/P75N/K76N/D77Q/N78T/ D92Y/A101C/K139C/T152A/I201C/A217G/K234V/ N247D/R289W/H363R	81
Y48H/E54C/D92Y/A101C/K139C/T152A/I201C/ K207Q/V208T/A217G/K234V/N247D/R289W/H363R	95
<i>Experimento 5</i>	<i>Wt 25,9</i>
D92Y/E100W/A217G/H363R	39,5
D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/N247D/H363R	57,5
Q9S/N78Q/A89A/D92Y/H115M/A132V/K139C/ Q162R/Q181L/I201C/A217G/K234V/P348R	68,5

Método 2

- 5 [0246] En estos experimentos, se usó una configuración modificada por la cual el vapor es provisto desde un generador de vapor y conducido a la caja. Las muestras colocadas en una placa se insertan en la caja a través de un cajón cuando se ha alcanzado la temperatura. Tras la inserción de las muestras, la temperatura cae 4° C. La incubación se realiza durante 30 segundos mientras la temperatura permanece aproximadamente constante a 90° C. Luego la placa es rápidamente quitada de la caja y las muestras son colocadas en hielo. Las muestras se analizan como en el método 1. Tabla 8: Estabilidad al vapor determinada por el método 2

Variante	Actividad residual [%]
<i>Experimento 1</i>	<i>Wt 15</i>
V130L/M137L/V1461/I201V/M260L/I266V	27
<i>Experimento 2</i>	<i>Wt 6</i>
S1QGPS/K26H/E54C/A101C/K139C/Q162N/ G186S/I201C/K207Q/G346S	29
<i>Experimento 3</i>	<i>Wt 4</i>
S261A	12
T308A	9

<i>Experimento 4</i>	<i>wt 8</i>
L401N	14
S403N	9
T308A	11
<i>Experimento 5</i>	<i>wt 4</i>
E54C/A101C	9
<i>Experimento 6</i>	<i>wt 6</i>
T152G	10
<i>Experimento 7</i>	<i>wt 5</i>
S1P	10
F8M	14
<i>Experimento 1</i>	<i>wt 15</i>
<i>Experimento 8</i>	<i>wt 3</i>
K139C/I201C	13
<i>Experimento 9</i>	<i>wt 5</i>
S1QS	9
A217G	9

Ejemplo 8: actividad residual de glicación

[0247] Inactivación por glicación

5

[0248] El efecto de glicación fue investigado por incubación de variantes de fitasa purificadas con glucosa. Para esto 0,5mg/ml de enzima en 0,1 M HEPES pH 7,5 se mezcló con 1 M de glucosa y se incubó a 50° C durante 5 h. La actividad de fosfatasa fue medida antes y después de la incubación y los resultados se indicaron más abajo en la tabla 9

Tabla 9: Modificación de glicación

mutación	Actividad residual
Wt	18%
K26Q	55%
K26R	47%

10

[0249] Los resultados mostrados arriba indican que la enzima de tipo salvaje es fuertemente inhibida por glicación (18% de actividad residual). Las variantes en la posición K26 son claramente mucho mejores en este aspecto siendo menos afectadas.

Ejemplo 9: pruebas de estabilidad de granulación

15

Mediciones de estabilidad de granulación

[0250] Aproximadamente 50 g de granulado enzimático fue premezclado con 10 kg de alimento durante 10 minutos en un mezclador horizontal pequeño. Esta premezcla fue mezclada con 90 kg de alimento durante 10 minutos en un mezclador horizontal más grande. Del mezclador, el alimento fue llevado al acondicionador (un mezclador de cascada con inyección de vapor) a razón de aproximadamente 300 kg/hora. El acondicionador calentó el alimento a 95 °C (medido a la salida) por vapor de inyección. El periodo de permanencia en el acondicionador fue 30 segundos. Del acondicionador, el alimento fue llevado a una prensa Simon Heesen equipada con boquilla horizontal de 3,0x35 mm y se prensó a gránulos con una longitud de alrededor de 15 mm. Después de la prensa, los gránulos fueron colocados en un refrigerador de aire y enfriados durante 15 minutos.

20

25

Formulación del alimento

[0251]

5

74,0% maíz molido
5,0% aceite de soja
20,7% sémola de soja tostada
0,3% premezcla de minerales y vitaminas Solivit Mikro 106
10 12% contenido de agua

Prueba 1

[0252] Un polvo consistente en:

15

1,5 Kg celulosa fibrosa, Arbocel BC200
0,75 Kg ligante de carbohidrato, Avedex W80
11,552 kg sulfato de sodio finamente molido
se granula en un mezclador Lödige FM 50 con un líquido de granulación que consiste en:
20 0.75 Kg ligante de carbohidrato, Avedex W80
2,49 kg concentrado de fitasa de Hafnia wt
0,45 kg agua

[0253] La granulación se realiza en una manera como se describe en la patente estadounidense n.º 4,106,991, Ejemplo 1. El granulado obtenido se seca en un lecho fluido a un contenido de agua debajo de 1% y tamizado para obtener un producto con el rango de partícula 250 µm a 850 µm. Finalmente, el producto se reviste con 10% de aceite de palma y 22% de carbonato de calcio de una manera descrita en la estadounidense n.º 4,106,991, Ejemplo 22.

25

Prueba 2

30

[0254] Un polvo consistente en:

35

1,6 kg de celulosa fibrosa, Arbocel BC200
0.80 kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80
12,027 kg desulfato de sodio finamente molido
se granula en un mezclador Lödige FM 50 con un líquido de granulación que consiste en:

40

0.80 kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80
3.5 kg de concentrado de variante Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152I/I201C/A217G/K234V/N247D/H363R
0,02 kg de agua

[0255] La granulación, el secado y el tamizado se realizan como se indicó anteriormente. Finalmente, el producto se reviste con 9% de aceite de palma y 22% carbonato de calcio en una manera como se indicó anteriormente.

45

Prueba 3

[0256] Un polvo consistente en:

50

1,6 kg de celulosa fibrosa, Arbocel BC200
0.80 kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80
12,013 kg de sulfato de sodio finamente molido
se granula en un mezclador Lödige FM 50 con un líquido de granulación que consiste en:
0.80 kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80
3.2 kg concentrado de variante 2 de fitasa
55 0,30 kg de agua

[0257] La granulación, el secado y el tamizado se realizan como se indicó anteriormente. Finalmente, el producto se reviste con 9,8% de aceite de palma y 22% de carbonato de calcio en una manera como se indicó anteriormente.

60

Prueba 4

[0258] Un polvo consistente en:

- 5 1,6 kg de celulosa fibrosa, Arbocel BC200
 0,80 kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80
 12,225 kg de sulfato de sodio finamente molido
 se granula en un mezclador Lödige FM 50 con un líquido de granulación que consiste en:
 0,80 kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80
 10 3,50 kg de concentrado de variante E54C/D92Y/A101C/K139C/I201C/A217G/H363R

[0259] La granulación, el secado y el tamizado se realizan como se indicó anteriormente. Finalmente, el producto se reviste con 9,0% de aceite de palma y 22% de carbonato de calcio en una manera como se indicó anteriormente.

Prueba 5

15 [0260] Un polvo consistente en:

- 20 1,6 kg de celulosa fibrosa, Arbocel BC200
 0,80 kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80
 12,225 kg de sulfato de sodio finamente molido
 se granula en un mezclador Lödige FM 50 con un líquido de granulación que consiste en:
 0,80 kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80
 3,50 kg de concentrado de variante Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/N247D/Q256D/H363R

25 [0261] La granulación, el secado y el tamizado se realizan como se indicó anteriormente. Finalmente, el producto se reviste con 9,0% de aceite de palma y 22% de carbonato de calcio en una manera como se indicó anteriormente.

Prueba 6

30 [0262] Un polvo consistente en:

- 35 1,6 kg de celulosa fibrosa, Arbocel BC200
 0,80 kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80
 12,435 kg de sulfato de sodio finamente molido
 se granula en un mezclador Lödige FM 50 con un líquido de granulación que consiste en:
 0,80 kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80
 3,50 kg de concentrado de variante Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152A/I201C/A217G/K234V/N247W/Q256D/H363R
 40 0,30 kg de agua

[0263] La granulación, el secado y el tamizado se realizan como se indicó anteriormente. Finalmente, el producto se reviste con 9,7% de aceite de palma y 22% carbonato de calcio en una manera como se indicó anteriormente:

Prueba 7

45 [0264] Un polvo consistente en:

- 50 1,6 kg de celulosa fibrosa, Arbocel BC200
 0,80 kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80
 12,193 kg de sulfato de sodio finamente molido
 se granula en un mezclador Lödige FM 50 con un líquido de granulación que consiste en:
 0,64 kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80
 3,50 kg de concentrado de variante 5 de fitasa
 55 0,16 kg de agua

[0265] La granulación, el secado y el tamizado se realizan como se indicó anteriormente. Finalmente, el producto se reviste con 8,3% de aceite de palma y 22% de carbonato de calcio en una manera como se indicó anteriormente.

60 [0266] Las muestras producidas en la prueba 1 a la prueba 7 fueron evaluadas en una prueba de granulación a 95° C, salida del acondicionador. El contenido de fitasa fue medido usando método analítico EB-SM 0559.02 versión 01

(disponible de Novozymes por pedido) antes de la granulación y en los gránulos de alimento después de la granulación. Se encontraron las siguientes actividades residuales de la fitasa:

Tabla 10: Estabilidad de granulación

Prueba	Actividad residual de fitasa [%]	
		Variante
1	13	Wt
2	26	Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152I/I201C/A217G/K234V/N247D/H363R
3	20	D92Y E100W K139C I201C A217G K234V N247D H363R
4	30	E54C/D92Y/A101C/K139C/I201C/A217G/H363R
5	26	Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/N247D/Q256D/H363R
6	28	Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152A/I201C/A217G/K234V/N247W/Q256D/H363R
7	43	Y48H/E54C/D92Y/A101C/K139C/T152A/I201C/A217G/K234V/N247D/R289W/H363R

5 [0267] La conclusión es que las variantes tienen mejor estabilidad de granulación en comparación con la prueba de referencia 1.

Ejemplo 10: Rendimiento en el alimento para animales en un modelo *in vitro*

10 [0268] El rendimiento en el alimento para animales de una variante de fitasa de la invención es comparada, en un modelo *in vitro*, con el rendimiento de una proteína de referencia tales como SEQ ID NO:2. El modelo *in vitro* simula condiciones gastrointestinales en un animal monogástrico y se correlaciona bien con resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* en animales. La versión usada en este ejemplo simula el buche y estómago de un pollo de engorde. La comparación se realiza de la siguiente manera:

15 La actividad de fitasa en la muestra variante se determina como se describe en el Ejemplo 1 bajo "Determinación de la actividad de fitasa".

20 [0269] Gránulos de alimentación de una prueba de alimento para pollos de engorde- y con maíz, harina de soja y aceite de soja como constituyentes principales- se preincuban a 40° C y pH 4,6 durante 5 minutos seguidos por la adición de dosificaciones adecuadas de las fitasas (se usan dosificaciones idénticas para todas las fitasas que deben evaluarse para permitir comparación), por ejemplo entre 125 y 1000 unidades de fitasa FTU/kg alimentación, o tampón en las muestras de control. Después de 5 minutos de incubación, se añade pepsina (3000 U/g alimento) en una solución de HCl y de esta manera el pH se reduce a 3. Las muestras luego son incubadas a 40° C durante otros 5 minutos.

25 [0270] 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.

30 [0271] 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, pp. 431-436 .

35 [0272] La degradación de fitato luego se calcula como la diferencia en el fósforo ligado al inositol fosfato (IP6-P) entre la fitasa tratada y las muestras no tratadas. El rendimiento relativo de la variante se calcula como el porcentaje de degradación de fitato por la fitasa de tipo salvaje.

40 [0273] La degradación relativa de las variantes de fitasa (Tabla 11) muestra que las variantes son todas capaces de degradar inositol-6-fosfato en el sistema *in vitro* aplicado. Candidatos determinados tuvieron mejor rendimiento que el tipo salvaje (por ejemplo, variante: D92Y/E100W/A217G/H363R, variante: Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/N247D/0256D/H363R, variante: Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152I/I201C/A217G/K234V/N247D/H363R) mientras que otras no fueron tan eficaces *in vitro* como el tipo salvaje (por ejemplo, variante: K207Q).

45 Tabla 11. Degradación *in vitro* de IP6-P de una dieta a base de semilla de soja/maíz. La degradación de fitato de la variante se calcula como el porcentaje de degradación de fitato por la fitasa de tipo salvaje.

ES 2 544 645 T3

Degradación de fitato de la variante como porcentaje de degradación de fitato por el tipo salvaje (dos números representan datos de dos ensayos diferentes)		
Dosificación de fitasa (FYT/kg de alimento)		
Variante de fitasa		
D92Y/E100W/A217G/H363R	125	181
Como se indica arriba	250	199
D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/N247D/H363R	125	74; 101
Como se indica arriba	250	71; 137
Como se indica arriba	500	72
Como se indica arriba	1000	76
Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/N247D/Q256D/H363R	125	252; 543
Como se indica arriba	250	219; 347
Como se indica arriba	500	184; 215
Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152I/I201C/A217G/K234V/N247D/H363R	125	237; 297
Como se indica arriba	250	160; 246
Como se indica arriba	500	148; 197
K207Q	250	57
E54C/A101C	250	119
G346S	250	79
Q162N	250	180
S1QS	255	68*
S1P	277	70*
F8M	246	74*
F8Y	229	71*
K139C/I201C	250	105
S1QG/PS/K26H/E54C/A101C/K139C/Q162N/G186S/I201C/K207Q/G346S	250	90
* Para estos datos el peso fue evaluado a 250 FTU/kg		

Ejemplo 11: rendimiento en una prueba de cerdo *in vivo*

- 5 [0274] Evaluación comparativa de los efectos de cantidades valoradas de dos variantes de fitasa *Hafnla alveii* en la digestibilidad fecal y excreción de fósforo y calcio en cerdos en crecimiento.
- [0275] Se utilizaron sesenta y cuatro cerdos blancos grandes Landrace con un peso corporal inicial de $43,55 \pm 4,35$ kg.
- 10 [0276] Los animales fueron alojados en jaulas de corral de piso en una cámara del medio ambiente controlado. Cada corral tenía un suelo con cables soldados revestidos de plástico y estaba equipado con dos boquillas de agua y cuatro alimentadores individualizados de acero inoxidable. La temperatura ambiente fue 21-22° C y el porcentaje de humedad fue 50 %.
- 15 [0277] Los cerdos fueron alimentados con una dieta básica formulada para proporcionar fósforo (P) exclusivamente de origen vegetal durante un periodo adaptativo de 14 días. Después de ese periodo, fueron asignados en 16 grupos iguales de 4 animales cada uno.

[0278] Fueron alimentados durante 12 días con la dieta básica o esta dieta suplementada con 1000, 2000 U/kg y 4000 U/kg de fitasa *Hafnia alveii* de tipo salvaje, con 500,1000 y 2000 U/kg de la variante Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/N247D/Q256D/H363R o con 500,1000 y 2000 U/kg de la variante Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152I/I201C/A217G/K234V / N247D/H363R.

5

[0279] Un marcador indigerible (óxido de cromo) se añadió a una concentración de 0,4 % a todas las dietas permitiendo el cálculo de la digestibilidad de P y calcio (Ca). El alimento fue distribuido *ad libitum* en la forma de trituración, bajo control de consumo de alimentación de corral y los animales tenían libre acceso al agua potable. La digestibilidad de Ca no era corregida para la ingesta de Ca con el agua potable.

10

[0280] Las concentraciones de P Fecal, Ca y Cr fueron medidas al 12º día del segundo periodo. Las heces fueron muestreadas individualmente, en aproximadamente la misma cantidad al mismo tiempo del día, durante los últimos 3 días antes de esa fecha. De ese modo, para cada tratamiento dietético y para cada criterio, se han realizado un total de 12 determinaciones individuales. Todos los minerales fueron determinados según los métodos estándares de Association of Official Analytical Chemists (1990) usando un espectrómetro Vista-MPX ICP-OES. La digestibilidad aparente (% de la toma) de los minerales fue calculada para el periodo mencionado de 3 días.

15

[0281] La concentración media de P fecal de los animales suplementados con enzima fue muy significativamente inferior a la observada para los animales que ingirieron la dieta de control (a).

20

[0282] La digestibilidad P dependió de la dosis y mejoró muy significativamente con las cinco fitasas en todos los grupos suplementados (b). La máxima digestibilidad P fue observada en la dieta suplementada con 4000 U/kg de *Hafnia alvei* de tipo salvaje y en el grupo JHP113 con 2000 U/kg.

25

[0283] La excreción fecal de P fue significativamente reducida en todos los animales suplementados con fitasa y para todos los niveles de inclusión evaluados (c).

[0284] El P aparente absorbido fue superior al 2,25 g/kg recomendado para los cerdos en crecimiento en el grupo de 4000 U/kg de *Hafnia alvei* de tipo salvaje y muy cerca de éste con JHP113 y "C. *braakii*" de tipo salvaje con 2000 U/kg y 4000 U/kg respectivamente (d).

30

[0285] Las equivalencias P, consideradas como P suplementario digerido comparativamente con el control no suplementado, fueron muy significantivamente superiores al control en las cinco dietas suplementadas con fitasas (e).

35

[0286] La digestibilidad de Ca fue mejorada y la excreción fecal de Ca fue reducida con todas las enzimas evaluadas y en todos los niveles de inclusión (f).

[0287] El máximo de eficiencia en estos parámetros fue observado con *Hafnia alvei* de tipo salvaje al nivel de inclusión de 4000 U/kg, mientras que la variante Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C / A217G/K234V/N247D/Q256D/H363R tuvo el mejor rendimiento al comparar la eficacia con las suplementaciones de 1000 U/kg y 2000 U/kg.

40

[0288] Los resultados se presentan en la siguiente tabla 12

Tabla 12: Niveles residuales de de parámetros para digestibilidad

	Dosis (U/kg)			
	0	500	1000	2000
(a) concentración fecal de fósforo (mg/g DM)				
Wt			14,3	11,5
Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/ N247D/Q256D/H363R		13,7	12,6	11,5
Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152I/I201C/A217G/ K234V/N247D/H363R		14,5	13,9	11,0
Control	18,3			
(b) digestibilidad fecal aparente de fósforo (%)				
Wt			47,3	50,1
Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/ N247D/Q256D/H363R		44,1	55,3	58,0
Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152I/I201C/A217G/ K234V/N247D/H363R		43,1	48,6	51,4
Control	27,9			
(c) excreción de fósforo (mg/g DM)				

ES 2 544 645 T3

Wt			2,06	1,93
Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/ N247D/Q256D/H363R		2,14	1,74	1,61
Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152I/I201C/A217G/ K234V/N247D/H363R		2,16	1,97	1,81
Control	2,80			
(d) absorción de fósforo (mg/g)				
Wt			1,85	1,94
Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/ N247D/Q256D/H363R		1,69	2,16	2,22
Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152I/I201C/A217G/ K234V/N247D/H363R		1,63	1,86	1,91
Control	1,09			
(e) equivalencias de fósforo (mg/g)				
Wt			0,77	0,86
Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/ N247D/Q256D/H363R		0,61	1,07	1,14
Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152I/I201C/A217G/ K234V/N247D/H363R		0,56	0,78	0,83
Control	0,00			
(f) Digestibilidad aparente de calcio (%)				
Wt			58,9	55,2
Y48H/D92Y/E100W/K139C/I201C/A217G/K234V/ N247D/Q256D/H363R		54,1	63,1	63,5
Y48H/D92Y/E100W/K139C/T152I/I201C/A217G/ K234V/N247D/H363R		53,2	55,3	57,9
Control	51,0			

LISTADO DE SECUENCIAS

[0289]

- 5
- <110> Novozymes A/S
- <120> Fitasa de Hafnia
- 10
- <130> 11422.204-WO
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.5
- 15
- <210> 1
- <211> 1338
- <212> DNA
- <213> Hafnia alvei
- 20
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1338)
- 25
- <220>
- <221> sig_peptide
- <222> (1)..(99)
- 30
- <220>
- <221> mat_peptide
- <222> (100)..(1338)

<400> 1

ES 2 544 645 T3

atg aca atc tct ctg ttt aac cgt aat aac ccc gct att gca cag cgt	48
Met Thr Ile Ser Leu Phe Asn Arg Asn Lys Pro Ala Ile Ala Gln Arg	
-30 -25 -20	
att tta tgt cct ctg atc gtg gct tta ttc tca ggt tta ccg gca tac	96
Ile Leu Cys Pro Leu Ile Val Ala Leu Phe Ser Gly Leu Pro Ala Tyr	
-15 -10 -5	
gcc agt gat acc gcc cct gct ggg ttc cag ttg gaa aag gtt gtt atc	144
Ala Ser Asp Thr Ala Pro Ala Gly Phe Gln Leu Glu Lys Val Val Ile	
-1 1 5 10 15	
cta agc aga cat ggt gta cgc gcg cca acc aaa atg aca caa acg atg	192
Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met	
20 25 30	
cgc gac gtc aca cct cac cag tgg cct gaa tgg ccg gta aaa ctg ggc	240
Arg Asp Val Thr Pro His Gln Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly	
35 40 45	
tat atc acg cca cgc ggc gaa cat ctg att agc ctg atg ggc ggt ttt	288
Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe	
50 55 60	
tat cga gag cgc ttt cag caa caa ggt tta tta cct aag gat aac tgt	336
Tyr Arg Glu Arg Phe Gln Gln Gln Gly Leu Leu Pro Lys Asp Asn Cys	
65 70 75	
cct aca cca gat gcc gtg tat gtt tgg goa gac gtc gat caa cgc aca	384
Pro Thr Pro Asp Ala Val Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr	

80		85		90		95										
cgt	aaa	acc	ggc	gag	gct	ttc	tta	gca	ggt	ctt	gct	ccc	cag	tgt	gat	432
Arg	Lys	Thr	Gly	Glu	Ala	Phe	Leu	Ala	Gly	Leu	Ala	Pro	Gln	Cys	Asp	
			100						105					110		
tta	gcg	atc	cac	cat	cag	caa	aac	act	cag	cag	gcc	gat	ccg	ctg	ttc	480
Leu	Ala	Ile	His	His	Gln	Gln	Asn	Thr	Gln	Gln	Ala	Asp	Pro	Leu	Phe	
			115					120					125			
cac	cct	gtg	aaa	gcc	ggt	att	tgt	tcg	atg	gat	aaa	tca	cag	gta	cac	528
His	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Ile	Cys	Ser	Met	Asp	Lys	Ser	Gln	Val	His	
		130				135						140				
gcc	gcg	gtt	gaa	aag	cag	gca	ggc	aca	ccg	att	gag	acg	ctc	aat	caa	576
Ala	Ala	Val	Glu	Lys	Gln	Ala	Gly	Thr	Pro	Ile	Glu	Thr	Leu	Asn	Gln	
	145				150						155					
cgc	tat	caa	gcc	tct	tta	gcg	ctg	atg	agt	tcg	gta	ctc	gat	ttt	cca	624
Arg	Tyr	Gln	Ala	Ser	Leu	Ala	Leu	Met	Ser	Ser	Val	Leu	Asp	Phe	Pro	
160					165					170					175	
aaa	tcg	ccc	tat	tgt	cag	cag	cac	aac	att	ggc	aaa	ctc	tgc	gat	ttt	672
Lys	Ser	Pro	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Asn	Ile	Gly	Lys	Leu	Cys	Asp	Phe	
			180						185					190		
tca	cag	gcg	atg	cct	agc	aga	ctg	gcg	ata	aat	gac	gac	ggt	aat	aaa	720
Ser	Gln	Ala	Met	Pro	Ser	Arg	Leu	Ala	Ile	Asn	Asp	Asp	Gly	Asn	Lys	
			195				200						205			
gtg	gct	ctc	gaa	ggt	gcc	gtg	gga	ctt	gca	tcg	acg	ttg	gct	gaa	att	768
Val	Ala	Leu	Glu	Gly	Ala	Val	Gly	Leu	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Glu	Ile	
		210				215						220				
ttc	ctg	ctg	gaa	cac	gct	cag	gga	atg	cct	aaa	gtg	gct	tgg	ggg	aat	816
Phe	Leu	Leu	Glu	His	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Lys	Val	Ala	Trp	Gly	Asn	
	225				230						235					
att	cac	act	gag	cag	caa	tgg	aac	tct	ctg	ttg	aaa	ttg	cat	aat	gcg	864
Ile	His	Thr	Glu	Gln	Gln	Trp	Asn	Ser	Leu	Leu	Lys	Leu	His	Asn	Ala	
240					245				250						255	
cag	ttt	gac	ttg	atg	tcg	cgc	acg	ccc	tat	ctc	gcc	aag	cat	aac	ggt	912
Gln	Phe	Asp	Leu	Met	Ser	Arg	Thr	Pro	Tyr	Ile	Ala	Lys	His	Asn	Gly	
			260						265					270		
act	cca	ctg	ctg	caa	acc	atc	gcc	cac	gca	ctg	ggt	tcc	aat	ctc	acg	960
Thr	Pro	Leu	Leu	Gln	Thr	Ile	Ala	His	Ala	Leu	Gly	Ser	Asn	Ile	Thr	
			275					280					285			
agt	cgc	cca	ctg	ccg	gat	att	tcg	cca	gac	aat	aag	atc	ctg	ttt	att	1008
Ser	Arg	Pro	Leu	Pro	Asp	Ile	Ser	Pro	Asp	Asn	Lys	Ile	Leu	Phe	Ile	
		290					295					300				
gcc	ggt	cac	gac	acc	aat	att	gcc	aat	att	tct	ggc	atg	tta	ggg	atg	1056
Ala	Gly	His	Asp	Thr	Asn	Ile	Ala	Asn	Ile	Ser	Gly	Met	Leu	Gly	Met	
	305				310						315					
aca	tgg	aca	ctt	ccg	gga	caa	cca	gat	aac	acg	cct	ccg	ggt	ggc	gct	1104
Thr	Trp	Thr	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Ala	
320					325					330					335	

ES 2 544 645 T3

ttg gtg ttt gaa cgc tgg gta gat aac gcg ggg aaa ccg tat gtt agc	1152
Leu Val Phe Glu Arg Trp Val Asp Asn Ala Gly Lys Pro Tyr Val Ser	
340 345 350	
gtg aat atg gtg tat caa aca ctg qca cag ttg cac gac cag gcg ccg	1200
Val Aan Met Val Tyr Gln Thr Leu Ala Gln Leu His Asp Gln Ala Pro	
355 360 365	
cta acg ttg cag cat cct gcg ggc agc gta cga cta aac ata ccg ggt	1248
Leu Thr Leu Gln His Pro Ala Gly Ser Val Arg Leu Asn Ile Pro Gly	
370 375 380	
tgc agc gat caa acg ccc gat ggc tat tgc ccg atc too acc ttc agc	1296
Cys Ser Asp Gln Thr Pro Asp Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Ser	
385 390 395	
cgc tta gtc agc cac agc gtt gag cct gcg tgc cag ctt cct	1338
Arg Leu Val Ser His Ser Val Glu Pro Ala Cys Gln Leu Pro	
400 405 410	

<210> 2
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Hafnia alvei

 <400> 2

5

ES 2 544 645 T3

Met Thr Ile Ser Leu Phe Asn Arg Asn Lys Pro Ala Ile Ala Gln Arg
 -30 -25 -20

Ile Leu Cys Pro Leu Ile Val Ala Leu Phe Ser Gly Leu Pro Ala Tyr
 -15 -10 -5

Ala Ser Asp Thr Ala Pro Ala Gly Phe Gln Leu Glu Lys Val Val Ile
 -1 1 5 10 15

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

Arg Asp Val Thr Pro His Gln Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 35 40 45

Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 50 55 60

Tyr Arg Glu Arg Phe Gln Gln Gln Gly Leu Leu Pro Lys Asp Asn Cys
 65 70 75

Pro Thr Pro Asp Ala Val Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 80 85 90 95

ES 2 544 645 T3

Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Asp
 100 105 110
 Leu Ala Ile His His Gln Gln Asn Thr Gln Gln Ala Asp Pro Leu Phe
 115 120 125
 His Pro Val Lys Ala Gly Ile Cys Ser Met Asp Lys Ser Gln Val His
 130 135 140
 Ala Ala Val Glu Lys Gln Ala Gly Thr Pro Ile Glu Thr Leu Asn Gln
 145 150 155
 Arg Tyr Gln Ala Ser Leu Ala Leu Met Ser Ser Val Leu Asp Phe Pro
 160 165 170 175
 Lys Ser Pro Tyr Cys Gln Gln His Asn Ile Gly Lys Leu Cys Asp Phe
 180 185 190
 Ser Gln Ala Met Pro Ser Arg Leu Ala Ile Asn Asp Asp Gly Asn Lys
 195 200 205
 Val Ala Leu Glu Gly Ala Val Gly Leu Ala Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 210 215 220
 Phe Leu Leu Glu His Ala Gln Gly Met Pro Lys Val Ala Trp Gly Asn
 225 230 235
 Ile His Thr Glu Gln Gln Trp Asn Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Ala
 240 245 250 255
 Gln Phe Asp Leu Met Ser Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Lys His Asn Gly
 260 265 270
 Thr Pro Leu Leu Gln Thr Ile Ala His Ala Leu Gly Ser Asn Ile Thr
 275 280 285
 Ser Arg Pro Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 290 295 300
 Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ser Gly Met Leu Gly Met
 305 310 315
 Thr Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 320 325 330 335
 Leu Val Phe Glu Arg Trp Val Asp Asn Ala Gly Lys Pro Tyr Val Ser

ES 2 544 645 T3

340 345 350
Val Asn Met Val Tyr Gln Thr Leu Ala Gln Leu His Asp Gln Ala Pro
355 360 365
Leu Thr Leu Gln His Pro Ala Gly Ser Val Arg Leu Asn Ile Pro Gly
370 375 380
Cys Ser Asp Gln Thr Pro Asp Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Ser
385 390 395
Arg Leu Val Ser His Ser Val Glu Pro Ala Cys Gln Leu Pro
400 405 410

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para producir una variante de fitasa de una fitasa de referencia o progenitora, con propiedades mejoradas con respecto al perfil de pH y con al menos 90 % de identidad con SEQ ID N.º:2, donde dicha variante muestra al menos una sustitución, inserción o delección en una o varias de las posiciones: 92, 48, 26, 45, 49, 68, 100, 162, 217, 228, 304, 308 y 358, donde las posiciones corresponden a las posiciones de la fitasa con los aminoácidos 1-413 de SEQ ID N.º:2, el método comprende
- 10 a) mutación del ADN o gen que codifica la fitasa progenitora de una manera por la cual el ADN o el gen codifican para dicha sustitución, inserción y/o delección,
- b) conexión operativa de dicho ADN o gen a una o más secuencias de control que dirigen la producción de la fitasa en un huésped de expresión adecuado para crear un constructo de ADN o un vector de expresión recombinante,
- 15 c) transferencia de dicho constructo o vector a un huésped adecuado,
- d) cultivo de dicho huésped para producir la variante de fitasa y
- e) recuperación de la fitasa.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, donde las modificaciones son seleccionadas de las siguientes sustituciones o inserciones: 92Y, 48H,W,N, 26R,Q,H, 49L, 100W, 162N,R, 217S,G, 304V, 308A, y 358C.
- 25 3. Variante de fitasa con al menos 90% de identidad con SEQ ID N.º:2 y con propiedades mejoradas con respecto al perfil de pH según se determina a 37° C, midiendo la actividad con respecto a la actividad máxima, es mejorada en comparación con el perfil de pH de la fitasa de SEQ ID N.º:2 y producida según la reivindicación 1 o 2 con la condición de que la fitasa no sea la fitasa de *Hafnia alvei* con los aminoácidos 1-413 de SEQ ID N.º:2
- 30 4. Fitasa según la reivindicación 3, que comprende al menos una modificación seleccionada de las siguientes: 228C, 325C, 358C, y 363C.
5. Fitasa según la reivindicación 4, que comprende al menos un conjunto de modificaciones seleccionado de las siguientes: 325C/358C y 228C/363C.
- 35 6. Fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, que comprende al menos una modificación seleccionada de 1, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 16, 18, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 37, 38, 39, 40, 41, 45, 48, 49, 55, 59, 64, 68, 69, 70, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 89, 91, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 103, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 138, 140, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 168, 173, 175, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 189, 190, 192, 193, 194, 195, 196, 198, 199, 200, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 215, 217, 219, 221, 227, 230, 233, 234, 235, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 251, 256, 258, 260, 261, 266, 268, 270, 279, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 301, 303, 304, 308, 310, 312, 313, 314, 316, 318, 319, 320, 322, 324, 335, 344, 345, 346, 347, 348, 354, 355, 356, 360, 362, 364, 365, 366, 367, 369, 371, 372, 373, 375, 376, 378, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 394, 395, 396, 397, 400, 401, 403, 404, 406, 408, 409, 411, 412 und 413:.
- 40 7. Fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 3-6, que comprende al menos una modificación seleccionada de las siguientes: 49L.
- 45 8. Fitasa según la reivindicación 3-7, que comprende al menos una modificación seleccionada de las siguientes: T35C, P36C, F63C, L172C, S177C, P178C, F224C, H228C, A236C, Q326C, P331C, T358C, L368C, y A374C.
- 50 9. Fitasa según la reivindicación 8, que comprende al menos un conjunto de modificaciones seleccionadas de las siguientes: F8C/D343C, P178C/D33C, F63C/L368C, F224C/A236C, P331C/Q326C, T358C/G325C, H228C/H363C, and L368C/A374C.
- 55 10. Fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, que comprende al menos una modificación seleccionada de la siguiente: I49L.
11. Fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, que comprende al menos una modificación seleccionada de las siguientes: Q162N, and A304V.

12. Secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 3-11.
- 5 13. Constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de ácidos nucleicos según la reivindicación 12 operativamente enlazada a una o más secuencias de control que dirigen la producción de la fitasa en un huésped de expresión adecuado.
14. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 13.
- 10 15. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 13 y/o el vector de expresión según la reivindicación 14.
- 15 16. Composición que comprende al menos una fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 3-11 y
(a) al menos una vitamina liposoluble;
(b) al menos una vitamina hidrosoluble y/o
(c) y/o al menos un oligoelemento.
- 20 17. Composición según la reivindicación 16 que comprende además al menos una enzima seleccionada del siguiente grupo de enzimas: amilasa, fitasa, fosfatasa, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasa, fosfolipasa y/o beta-glucanasas.
18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 16-17 que es un aditivo de pienso.
- 25 19. Método para producir un producto de fermentación, que comprende (a) fermentación usando un microorganismo fermentador de un material que contiene carbohidrato en presencia de una fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 3-11 y (b) producción del producto de fermentación o coproducto de fermentación del material que contiene carbohidrato fermentado.
- 30 20. Método según la reivindicación 19, caracterizado por el hecho de que el producto de fermentación es etanol, cerveza, vino, o granos secos de destilería (DDG).