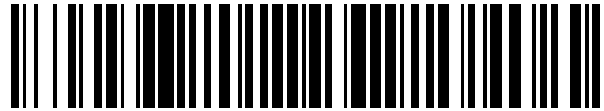


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 458**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2012 E 12773864 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2699675**

54 Título: **Variantes sintéticas de fitasa**

30 Prioridad:

21.04.2011 US 201161477637 P
21.04.2011 EP 11163410

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.12.2015

73 Titular/es:

BASF SE (100.0%)
67056 Ludwigshafen, DE

72 Inventor/es:

HAEFNER, STEFAN;
WELZEL, ANNEGRET y
THUMMER, ROBERT

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 553 458 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 sintéticas de fitasa

La presente invención se refiere a fitasas, a secuencias de aminoácidos que codifican enzimas fitasas y a secuencias nucleotídicas que codifican fitasas y a procesos para la preparación y el uso de fitasas y a alimentos para animales que comprenden estas fitasas.

El fósforo es un elemento esencial para el crecimiento de los organismos vivos. En la producción animal, los alimentos, como norma, tienen que suplementarse con fósforo inorgánico con el fin de alcanzar buenas tasas de crecimiento. En los cereales y las legumbres, el fósforo se almacena principalmente en forma de fitato. Sin embargo, los animales monogástricos, tales como el cerdo, las aves de corral y los peces, no son capaces de absorber directamente el fitato o ácido fítico, lo que tiene como resultado la excreción de fitato, lo que significa sobrecargas de fósforo en las áreas de producción intensiva de ganado. Además, el ácido fítico, que se une a metales tales como calcio, cobre o cinc, actúa como sustancia con un efecto negativo sobre el metabolismo de los animales monogástricos. Con objeto de compensar el déficit de fosfato de estos animales y garantizar un crecimiento suficiente y salud suficiente se añade el fosfato inorgánico en la dieta del animal. Esta adición de fosfato inorgánico es costosa y conduce a un efecto adverso adicional sobre el ambiente. Mediante el uso de una fitasa en los alimentos para animales, el fitato se hidroliza y da lugar a un menor contenido de fosfato de inositol y fosfatos inorgánicos en el estiércol. La adición de fitasas a alimentos para animales mejora la disponibilidad de fósforo orgánico y reduce el efecto adverso sobre el medio ambiente por los fosfatos unidos a fitato excretados. En la literatura se han descrito varias fitasas naturales tanto fúngicas como bacterianas.

Las fitasas, también conocidas como mioinositol hexakisfosfato fosfohidrolasa, son una clase de fosfatasas que son capaces de escindir al menos un residuo de fosfato a partir de fitato.

El documento EP 420 358 describe generalmente la clonación y expresión de fitasas microbianas, el documento WO 2006/38062 describe fitasas microbianas derivadas de *Citrobacter freundii* como aditivo para alimentos para animales y el documento WO 2007/112739 describe fitasas sobre la base de una fitasa natural de *Citrobacter braakii* y procesos para su preparación y el uso de alimentos para animales.

Haefner y col., (Haefner S., Knietsch A., Scholten E., Braun J., Lohscheidt M. y Zelder O. (2005) Biotechnological production and application of phytases. Appl Microbiol Biotechnol 68:588–597) describen una multiplicidad de usos conocidos de las fitasas en el campo de la nutrición humana o animal. Usos adicionales de las fitasas tal como, por ejemplo, el uso para la hidrólisis de biomasa o almidón en la producción de bioetanol se describen en el documento WO 2008/097620.

El documento WO 2008/116878 y el documento WO 2010/034835 describe una fitasa de *Hafnia alvei*, su secuencia de proteínas y variantes de la misma. Zinin y col., (FEMS Microbiology Letters (2004) 236:283–290) divulgan una fitasa de *Obesumbacterium proteus*, cuya secuencia está depositada en la base de datos UNIPROT con el número de acceso Q6U677. Las solicitudes de patentes WO 2006/043178, WO 2008/097619 y WO 2008/092901 describen fitasas de diversas especies de *Buttiauxella sp.* Las fitasas naturales con las actividades específicas más altas actualmente incluyen las fitasas naturales de *Yersinia intermedia* (documento WO 2007/128160) y *Yersinia pestis* (documento WO 02/048332).

No obstante, ninguna de estas fitasas disponibles actualmente presenta las propiedades necesarias para la preparación de aditivos para alimentos para animales. Las fitasas disponibles en la actualidad no son suficientemente termoestables para su uso en la preparación de gránulos de alimento para animales sin una pérdida considerable de su actividad. En la preparación de gránulos de alimentos para animales, la fitasa junto con otros componentes de la alimentación de los animales usuales se comprime a temperaturas y humedad altas con el fin de administrar al ganado como una sola entidad. Una destrucción efectiva de salmonella sp. y la gelatinización del almidón solo se alcanza por encima de una temperatura de 80 °C durante la preparación (Amerah y col., Worlds Poultry Science Journal (2011) 67:29–45). Esta compresión en condiciones de calor y humedad da lugar a pérdidas considerables de actividad fitasa. Una posibilidad de evitar esta pérdida de actividad es el laborioso recubrimiento de las partículas de fitasa, de modo que estén protegidas contra el efecto del calor. Este recubrimiento de las adiciones de fitasa provoca costes adicionales considerables como resultado de las grasas o polímeros empleados para el recubrimiento. Las dosis de fitasas comerciales se determinan por lo general sobre la base de la determinación de la actividad a pH 5,5 (DIN ISO 30024: 2009) y no están adaptadas para coincidir con el pH en los respectivos tractos digestivos. Esto se traduce en considerables dosis erróneas por la variación de la actividad a valores de pH distintos de 5,5.

Por lo tanto, era un objeto de la presente invención proporcionar una fitasa que tiene una estabilidad térmica suficiente, de modo que se puede emplear en la preparación de gránulos de pienso sin salmonella sin medidas de protección adicionales, tales como el recubrimiento, y con pérdidas de actividad que son las más bajas posibles. Otro objeto de la invención era proporcionar una fitasa que se puede usar en un amplio intervalo de pH acompañado por una reducción de la actividad enzimática lo más baja posible, de forma que se pueda usar en los diversos intervalos de pH de los tractos digestivos de diferentes especies animales y, por tanto, que se asegure una actividad

enzimática suficiente en el tracto digestivo incluso cuando el intervalo de pH fluctúa como resultado de variar los componentes del pienso.

5 Estos objetos se consiguen mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 85 % con la secuencia de aminoácidos de SEC ID 24. Estas fitasas de acuerdo con la invención tienen una termoestabilidad de al menos 80 °C y, por tanto, son adecuadas para su uso en la preparación de gránulos de pienso sufrir una pérdida de actividad considerable como resultado de las condiciones de calor y humedad durante la formación de los gránulos.

10 Adicionalmente tiene un amplio intervalo de pH de más de 3 unidades de pH dentro del cual conservan al menos un 50 % de la actividad determinada a pH 5,5, de modo que, cuando la dosis se determina sobre la base de la actividad en 5,5, que pueden ser empleados en una multiplicidad de animales con diferente pH digestivo y junto con diferentes componentes del pienso, sin una dosis excesivamente baja que resulta en pérdidas de actividad y, por lo tanto, un aumento de la excreción del fosfato por los animales.

15 Además, la fitasa de acuerdo con la invención sorprendentemente tiene una estabilidad proteolítica elevada, y por lo tanto, puede atravesar el estómago sin pérdidas sustanciales de actividad y se conserva la actividad en el sitio real de la acción, en el intestino. Además, las fitasas de acuerdo con la invención tienen una estabilidad a pH 2 de al menos 85 % y, por lo tanto, garantizan solo pequeñas pérdidas de actividad en el intervalo altamente ácido.

La fitasa sintético también puede tener una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 90 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 24.

20 Preferiblemente, la fitasa sintética de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 94 %, en particular de preferencia del 95 %, y preferiblemente del 96, 97, 98 o 99 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 24.

El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-001 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).

25 El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-002 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).

30 El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-003 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).

El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-004 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).

35 El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-005 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).

El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-006 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).

40 El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-007 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).

45 El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-008 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).

El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-009 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).

50 El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-0010 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).

El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de

- El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-132 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).
- 5 El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-133 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).
- El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-134 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).
- 10 El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-135 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).
- 15 El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-136 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).
- El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-137 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).
- 20 El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-138 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).
- El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-139 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).
- 25 El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-140 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).
- 30 El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-141 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).
- El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-142 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).
- 35 El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-143 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).
- El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-144 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).
- 40 El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-145 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).
- 45 El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-146 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).
- El objeto se consigue además mediante una fitasa sintética que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 %, preferentemente 96 %, preferiblemente 97, 98 o 99 %, con la secuencia de aminoácidos del PHV-147 mutante (véase la Tabla 1, las mutaciones según la columna 2 basado en la SEC ID 24).
- 50 La identidad entre dos secuencias de proteínas o secuencias de ácido nucleico se define como la identidad calculada mediante el programa *Needle* en la versión disponible en abril de 2011. *Needle* es parte del paquete de software EMBOSS de libre acceso, que se puede descargar del sitio web [http:// emboss.sourceforge.net/](http://emboss.sourceforge.net/). Se utilizan los parámetros estándar: gapopen 10,0 ("penalización por abertura de espacio"), gapextend 0,5 ("penalización por extensión de espacio"), archivo de datos EBLOSUM62 (matriz) en el caso de la proteína y archivo

de datos EDNAFULL (matriz) en el caso del ADN.

En una realización, la fitasa sintética tiene al menos un intercambio conservador de aminoácidos en al menos una posición en comparación con una de las fitasas descritas anteriormente de acuerdo con la invención:

5 Para los fines de la presente invención, conservador significa un intercambio del aminoácido G a A; A a G, S; V a I, L, A, T, S; I a V, L, M; L a I, M, V; M a L, I, V; P a A, S, N; F a Y, W, H; Y a F, W, H; W a Y, F, H; R a K, E, D; K a R, E, D; H a Q, N, S; D a N, E, K, R, Q; E a Q, D, K, R, N; S a T, A; T a S, V, A; C a S, T, A; N a D, Q, H, S; Q a E, N, H, K, R. Aquí, es posible combinar cualquier intercambio conservador de un aminoácido con cualquier intercambio conservador de otro aminoácido, siempre y cuando se mantenga la actividad de fitasa.

10 Ventajosamente, la fitasa sintética es una fitasa aislada. También es viable que la fitasa sintético está presente no como una fitasa purificada aislada, sino como un licor de fermentación, con la biomasa separada totalmente, parcialmente o no separada. Aquí, el licor se puede concentrar o secar completamente eliminando el líquido. Es posible emplear estas soluciones de fitasa no purificadas o parcialmente purificadas o sólidos de fitasa como aditivos en diversos productos.

15 La fitasa sintética de acuerdo con la invención tiene, ventajosamente, una estabilidad elevada a la pepsina, una estabilidad al ácido mejorada a pH 2, una ampliación del intervalo de pH activo y / o un termoestabilidad elevada en comparación con los dos fitasas de tipo salvaje de los organismos *Yersinia mollaretii* y *Hafnia sp.*, que eran la base de la construcción del constructo de fitasa sintética de la SEC ID 18.

20 La invención también comprende una secuencia de nucleico aislada que codifica la fitasa con una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad del 81 %, ventajosamente del 85 o 90 %, especialmente preferiblemente del 94 % y en particular del 95, 96, 97, 98 o 99 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 24.

25 Asimismo la invención comprende una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica una enzima con actividad fitasa, en la que la secuencia de ácido nucleico tiene una identidad de al menos 85 % con la secuencia de ácido nucleico de SEC ID 25, o una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones altamente rigurosas con la cadena complementaria de una de las secuencias mencionadas anteriormente con una identidad de al menos 85 % con la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID 25. En una realización particular, la secuencia de ácido nucleico aislada que tiene una identidad de más de 90 %, en particular de al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % con la SEC ID 25.

La invención comprende además un vector de expresión recombinante que comprende una de las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

30 Asimismo La invención comprende una célula huésped recombinante que comprende uno de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención o que comprende el vector de expresión recombinante de acuerdo con la invención.

35 El objeto se consigue adicionalmente mediante un organismo de producción recombinante, que es un organismo de producción no humano que comprende una de las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención o que comprende el vector de expresión recombinante de acuerdo con la invención. El organismo de producción recombinante es especialmente preferiblemente uno de los géneros *Aspergillus*, *Pichia*, *Trichoderma*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Bacillus*, *Escherischia*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*.

40 La invención comprende adicionalmente un aditivo alimenticio para animales que comprende al menos una de las fitasas de acuerdo con la invención, en particular con una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEC ID 24 o uno de los mutantes PhV-001, PhV-002, PhV-003, PhV-004, PhV-005, PhV-006, PhV-007, PhV-008, PhV-009, PhV-010, PhV-011, PhV-012, PhV-013, PhV-014, PhV-015, PhV-016, PhV-017, PhV-018, PhV-019, PhV-020, PhV-021, PhV-022, PhV-023, PhV-024, PhV-025, PhV-026, PhV-027, PhV-028, PhV-029, PhV-030, PhV-031, PhV-032, PhV-033, PhV-034, PhV-035, PhV-036, PhV-037, PhV-038, PhV-039, PhV-040, PhV-041, PhV-042, PhV-043, PhV-044, PhV-045, PhV-046, PhV-047, PhV-048, PhV-049, PhV-050, PhV-051, PhV-052, PhV-053, PhV-054, PhV-055, PhV-056, PhV-057, PhV-058, PhV-059, PhV-060, PhV-061, PhV-062, PhV-063, PhV-064, PhV-065, PhV-066, PhV-067, PhV-068, PhV-069, PhV-070, PhV-071, PhV-072, PhV-073, PhV-074, PhV-075, PhV-076, PhV-077, PhV-078, PhV-079, PhV-080, PhV-081, PhV-082, PhV-083, PhV-084, PhV-085, PhV-086, PhV-087, PhV-088, PhV-089, PhV-090, PhV-091, PhV-092, PhV-093, PhV-094, PhV-095, PhV-096, PhV-097, PhV-098, PhV-099, PhV-100, PhV-101, PhV-102, PhV-103, PhV-104, PhV-105, PhV-106, PhV-107, PhV-109, PhV-110, PhV-111, PhV-112, PhV-113, PhV-114, PhV-115, PhV-116, PhV-117, PhV-118, PhV-119, PhV-120, PhV-121, PhV-122, PhV-123, PhV-124, PhV-125, PhV-126, PhV-127, PhV-128, PhV-129, PhV-130, PhV-131, PhV-132, PhV-133, PhV-134, PhV-135, PhV-136, PhV-137, PhV-138, PhV-139, PhV-140, PhV-141, PhV-142, PhV-143, PhV-144, PhV-145, PhV-146 o PhV-147 (según la definición en la Tabla 1) o con una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % con la misma, y aditivos para pienso habituales, por ejemplo para ganado, aves de corral o cerdos, tales como, por ejemplo, vitaminas, minerales u otros aditivos.

55 La invención comprende adicionalmente un alimento para animales que comprende al menos una de las fitasas sintéticas descritas de acuerdo con la invención, en particular con una secuencia de aminoácidos correspondiente a

la SEC ID 24 o uno de los mutantes PhV-001, PhV-002, PhV-003, PhV-004, PhV-005, PhV-006, PhV-007, PhV-008, PhV-009, PhV-010, PhV-011, PhV-012, PhV-013, PhV-014, PhV-015, PhV-016, PhV-017, PhV-018, PhV-019, PhV-020, PhV-021, PhV-022, PhV-023, PhV-024, PhV-025, PhV-026, PhV-027, PhV-028, PhV-029, PhV-030, PhV-031, PhV-032, PhV-033, PhV-034, PhV-035, PhV-036, PhV-037, PhV-038, PhV-039, PhV-040, PhV-041, PhV-042, PhV-043, PhV-044, PhV-045, PhV-046, PhV-047, PhV-048, PhV-049, PhV-050, PhV-051, PhV-052, PhV-053, PhV-054, PhV-055, PhV-056, PhV-057, PhV-058, PhV-059, PhV-060, PhV-061, PhV-062, PhV-063, PhV-064, PhV-065, PhV-066, PhV-067, PhV-068, PhV-069, PhV-070, PhV-071, PhV-072, PhV-073, PhV-074, PhV-075, PhV-076, PhV-077, PhV-078, PhV-079, PhV-080, PhV-081, PhV-082, PhV-083, PhV-084, PhV-085, PhV-086, PhV-087, PhV-088, PhV-089, PhV-090, PhV-091, PhV-092, PhV-093, PhV-094, PhV-095, PhV-096, PhV-097, PhV-098, PhV-099, PhV-100, PhV-101, PhV-102, PhV-103, PhV-104, PhV-105, PhV-106, PhV-107, PhV-109, PhV-110, PhV-111, PhV-112, PhV-113, PhV-114, PhV-115, PhV-116, PhV-117, PhV-118, PhV-119, PhV-120, PhV-121, PhV-122, PhV-123, PhV-124, PhV-125, PhV-126, PhV-127, PhV-128, PhV-129, PhV-130, PhV-131, PhV-132, PhV-133, PhV-134, PhV-135, PhV-136, PhV-137, PhV-138, PhV-139, PhV-140, PhV-141, PhV-142, PhV-143, PhV-144, PhV-145, PhV-146 o PhV-147 (según la definición en la Tabla 1) o con una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % con la misma, junto con los componentes del alimento habituales. En este contexto, los componentes del alimento viables son todos aquellos que se emplean convencionalmente en los gránulos de pienso para el engorde de la carne, vacas lecheras, aves o cerdos.

La invención comprende además el uso de una de las fitasas sintéticas descritas de acuerdo con la invención, en particular con una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEC ID 24 o uno de los mutantes PhV-001, PhV-002, PhV-003, PhV-004, PhV-005, PhV-006, PhV-007, PhV-008, PhV-009, PhV-010, PhV-011, PhV-012, PhV-013, PhV-014, PhV-015, PhV-016, PhV-017, PhV-018, PhV-019, PhV-020, PhV-021, PhV-022, PhV-023, PhV-024, PhV-025, PhV-026, PhV-027, PhV-028, PhV-029, PhV-030, PhV-031, PhV-032, PhV-033, PhV-034, PhV-035, PhV-036, PhV-037, PhV-038, PhV-039, PhV-040, PhV-041, PhV-042, PhV-043, PhV-044, PhV-045, PhV-046, PhV-047, PhV-048, PhV-049, PhV-050, PhV-051, PhV-052, PhV-053, PhV-054, PhV-055, PhV-056, PhV-057, PhV-058, PhV-059, PhV-060, PhV-061, PhV-062, PhV-063, PhV-064, PhV-065, PhV-066, PhV-067, PhV-068, PhV-069, PhV-070, PhV-071, PhV-072, PhV-073, PhV-074, PhV-075, PhV-076, PhV-077, PhV-078, PhV-079, PhV-080, PhV-081, PhV-082, PhV-083, PhV-084, PhV-085, PhV-086, PhV-087, PhV-088, PhV-089, PhV-090, PhV-091, PhV-092, PhV-093, PhV-094, PhV-095, PhV-096, PhV-097, PhV-098, PhV-099, PhV-100, PhV-101, PhV-102, PhV-103, PhV-104, PhV-105, PhV-106, PhV-107, PhV-109, PhV-110, PhV-111, PhV-112, PhV-113, PhV-114, PhV-115, PhV-116, PhV-117, PhV-118, PhV-119, PhV-120, PhV-121, PhV-122, PhV-123, PhV-124, PhV-125, PhV-126, PhV-127, PhV-128, PhV-129, PhV-130, PhV-131, PhV-132, PhV-133, PhV-134, PhV-135, PhV-136, PhV-137, PhV-138, PhV-139, PhV-140, PhV-141, PhV-142, PhV-143, PhV-144, PhV-145, PhV-146 o PhV-147 (según la definición en la Tabla 1) o con una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % con la misma, o del aditivo para alimentos para animales de acuerdo con la invención que comprende al menos una de las fitasas sintéticas de acuerdo con la invención, en particular con una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEC ID 24 o uno de los mutantes PhV-001, PhV-002, PhV-003, PhV-004, PhV-005, PhV-006, PhV-007, PhV-008, PhV-009, PhV-010, PhV-011, PhV-012, PhV-013, PhV-014, PhV-015, PhV-016, PhV-017, PhV-018, PhV-019, PhV-020, PhV-021, PhV-022, PhV-023, PhV-024, PhV-025, PhV-026, PhV-027, PhV-028, PhV-029, PhV-030, PhV-031, PhV-032, PhV-033, PhV-034, PhV-035, PhV-036, PhV-037, PhV-038, PhV-039, PhV-040, PhV-041, PhV-042, PhV-043, PhV-044, PhV-045, PhV-046, PhV-047, PhV-048, PhV-049, PhV-050, PhV-051, PhV-052, PhV-053, PhV-054, PhV-055, PhV-056, PhV-057, PhV-058, PhV-059, PhV-060, PhV-061, PhV-062, PhV-063, PhV-064, PhV-065, PhV-066, PhV-067, PhV-068, PhV-069, PhV-070, PhV-071, PhV-072, PhV-073, PhV-074, PhV-075, PhV-076, PhV-077, PhV-078, PhV-079, PhV-080, PhV-081, PhV-082, PhV-083, PhV-084, PhV-085, PhV-086, PhV-087, PhV-088, PhV-089, PhV-090, PhV-091, PhV-092, PhV-093, PhV-094, PhV-095, PhV-096, PhV-097, PhV-098, PhV-099, PhV-100, PhV-101, PhV-102, PhV-103, PhV-104, PhV-105, PhV-106, PhV-107, PhV-109, PhV-110, PhV-111, PhV-112, PhV-113, PhV-114, PhV-115, PhV-116, PhV-117, PhV-118, PhV-119, PhV-120, PhV-121, PhV-122, PhV-123, PhV-124, PhV-125, PhV-126, PhV-127, PhV-128, PhV-129, PhV-130, PhV-131, PhV-132, PhV-133, PhV-134, PhV-135, PhV-136, PhV-137, PhV-138, PhV-139, PhV-140, PhV-141, PhV-142, PhV-143, PhV-144, PhV-145, PhV-146 o PhV-147 (según la definición en la Tabla 1) o con una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % con la misma, en un alimento para animales. En este contexto, el uso puede tener lugar en la forma de la adición de la fitasa de acuerdo con la invención o del aditivo para alimentos para animales de acuerdo con la invención antes de la granulación de los componentes del alimento restantes. También es factible aplicar la fitasa a estos gránulos después de la preparación de gránulos de pienso, en particular, en forma líquida.

La invención se consigue adicionalmente mediante el uso de una de las fitasas sintéticas descritas anteriormente de acuerdo con la invención, en particular con una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEC ID 24 o uno de los mutantes PhV-001, PhV-002, PhV-003, PhV-004, PhV-005, PhV-006, PhV-007, PhV-008, PhV-009, PhV-010, PhV-011, PhV-012, PhV-013, PhV-014, PhV-015, PhV-016, PhV-017, PhV-018, PhV-019, PhV-020, PhV-021, PhV-022, PhV-023, PhV-024, PhV-025, PhV-026, PhV-027, PhV-028, PhV-029, PhV-030, PhV-031, PhV-032, PhV-033, PhV-034, PhV-035, PhV-036, PhV-037, PhV-038, PhV-039, PhV-040, PhV-041, PhV-042, PhV-043, PhV-044, PhV-045, PhV-046, PhV-047, PhV-048, PhV-049, PhV-050, PhV-051, PhV-052, PhV-053, PhV-054, PhV-055, PhV-056, PhV-057, PhV-058, PhV-059, PhV-060, PhV-061, PhV-062, PhV-063, PhV-064, PhV-065, PhV-066, PhV-067, PhV-068, PhV-069, PhV-070, PhV-071, PhV-072, PhV-073, PhV-074, PhV-075, PhV-

076, PhV-077, PhV-078, PhV-079, PhV-080, PhV-081, PhV-082, PhV-083, PhV-084, PhV-085, PhV-086, PhV-087, PhV-088, PhV-089, PhV-090, PhV-091, PhV-092, PhV-093, PhV-094, PhV-095, PhV-096, PhV-097, PhV-098, PhV-099, PhV-100, PhV-101, PhV-102, PhV-103, PhV-104, PhV-105, PhV-106, PhV-107, PhV-109, PhV-110, PhV-111, PhV-112, PhV-113, PhV-114, PhV-115, PhV-116, PhV-117, PhV-118, PhV-119, PhV-120, PhV-121, PhV-122, PhV-123, PhV-124, PhV-125, PhV-126, PhV-127, PhV-128, PhV-129, PhV-130, PhV-131, PhV-132, PhV-133, PhV-134, PhV-135, PhV-136, PhV-137, PhV-138, PhV-139, PhV-140, PhV-141, PhV-142, PhV-143, PhV-144, PhV-145, PhV-146 o PhV-147 (según la definición en la Tabla 1) o con una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % con la misma, o del aditivo para alimentos para animales de acuerdo con la invención que comprende al menos una de las fitasas sintéticas de acuerdo con la invención, en particular con una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEC ID 24 o uno de los mutantes PhV-001, PhV-002, PhV-003, PhV-004, PhV-005, PhV-006, PhV-007, PhV-008, PhV-009, PhV-010, PhV-011, PhV-012, PhV-013, PhV-014, PhV-015, PhV-016, PhV-017, PhV-018, PhV-019, PhV-020, PhV-021, PhV-022, PhV-023, PhV-024, PhV-025, PhV-026, PhV-027, PhV-028, PhV-029, PhV-030, PhV-031, PhV-032, PhV-033, PhV-034, PhV-035, PhV-036, PhV-037, PhV-038, PhV-039, PhV-040, PhV-041, PhV-042, PhV-043, PhV-044, PhV-045, PhV-046, PhV-047, PhV-048, PhV-049, PhV-050, PhV-051, PhV-052, PhV-053, PhV-054, PhV-055, PhV-056, PhV-057, PhV-058, PhV-059, PhV-060, PhV-061, PhV-062, PhV-063, PhV-064, PhV-065, PhV-066, PhV-067, PhV-068, PhV-069, PhV-070, PhV-071, PhV-072, PhV-073, PhV-074, PhV-075, PhV-076, PhV-077, PhV-078, PhV-079, PhV-080, PhV-081, PhV-082, PhV-083, PhV-084, PhV-085, PhV-086, PhV-087, PhV-088, PhV-089, PhV-090, PhV-091, PhV-092, PhV-093, PhV-094, PhV-095, PhV-096, PhV-097, PhV-098, PhV-099, PhV-100, PhV-101, PhV-102, PhV-103, PhV-104, PhV-105, PhV-106, PhV-107, PhV-109, PhV-110, PhV-111, PhV-112, PhV-113, PhV-114, PhV-115, PhV-116, PhV-117, PhV-118, PhV-119, PhV-120, PhV-121, PhV-122, PhV-123, PhV-124, PhV-125, PhV-126, PhV-127, PhV-128, PhV-129, PhV-130, PhV-131, PhV-132, PhV-133, PhV-134, PhV-135, PhV-136, PhV-137, PhV-138, PhV-139, PhV-140, PhV-141, PhV-142, PhV-143, PhV-144, PhV-145, PhV-146 o PhV-147 (según la definición en la Tabla 1) o con una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % con la misma, en un alimento para animales que comprende al menos una de las fitasas sintéticas descritas, en particular con la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEC ID 24 o uno de los mutantes PhV-001, PhV-002, PhV-003, PhV-004, PhV-005, PhV-006, PhV-007, PhV-008, PhV-009, PhV-010, PhV-011, PhV-012, PhV-013, PhV-014, PhV-015, PhV-016, PhV-017, PhV-018, PhV-019, PhV-020, PhV-021, PhV-022, PhV-023, PhV-024, PhV-025, PhV-026, PhV-027, PhV-028, PhV-029, PhV-030, PhV-031, PhV-032, PhV-033, PhV-034, PhV-035, PhV-036, PhV-037, PhV-038, PhV-039, PhV-040, PhV-041, PhV-042, PhV-043, PhV-044, PhV-045, PhV-046, PhV-047, PhV-048, PhV-049, PhV-050, PhV-051, PhV-052, PhV-053, PhV-054, PhV-055, PhV-056, PhV-057, PhV-058, PhV-059, PhV-060, PhV-061, PhV-062, PhV-063, PhV-064, PhV-065, PhV-066, PhV-067, PhV-068, PhV-069, PhV-070, PhV-071, PhV-072, PhV-073, PhV-074, PhV-075, PhV-076, PhV-077, PhV-078, PhV-079, PhV-080, PhV-081, PhV-082, PhV-083, PhV-084, PhV-085, PhV-086, PhV-087, PhV-088, PhV-089, PhV-090, PhV-091, PhV-092, PhV-093, PhV-094, PhV-095, PhV-096, PhV-097, PhV-098, PhV-099, PhV-100, PhV-101, PhV-102, PhV-103, PhV-104, PhV-105, PhV-106, PhV-107, PhV-109, PhV-110, PhV-111, PhV-112, PhV-113, PhV-114, PhV-115, PhV-116, PhV-117, PhV-118, PhV-119, PhV-120, PhV-121, PhV-122, PhV-123, PhV-124, PhV-125, PhV-126, PhV-127, PhV-128, PhV-129, PhV-130, PhV-131, PhV-132, PhV-133, PhV-134, PhV-135, PhV-136, PhV-137, PhV-138, PhV-139, PhV-140, PhV-141, PhV-142, PhV-143, PhV-144, PhV-145, PhV-146 o PhV-147 (según la definición en la Tabla 1) o con una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % con la misma, para reducir el contenido de fosfato en el estiércol del ganado.

Las realizaciones descritas son para ilustrar y proporcionar mejor comprensión de la invención y de ninguna manera deben interpretarse como limitantes. Otras características de la invención son el resultado de la descripción siguiente en el presente documento de realizaciones preferidas junto con las reivindicaciones dependientes. En este contexto, las características individuales de la invención pueden, en una realización, realizarse en cada caso individualmente o en conjunto y no constituyen limitación alguna de la invención a la realización descrita. La redacción de las reivindicaciones de la patente se hace expresamente por la presente materia objeto de la descripción.

50 **Descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra la estabilidad térmica de la fitasa HF598 (SEC ID 24). La fitasa se calienta durante 20 minutos a pH 5,5 a la temperatura indicada. Después de enfriar, se determina la actividad residual a pH 5,5 y 37 °C. Para determinar la actividad residual relativa, la actividad de una muestra de referencia incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente se fija en 100 %.

55 Las Figuras 2 A y B muestran los perfiles de pH de la fitasa HF598 (SEC ID 24) y algunas variantes de los mismos. La actividad fitasa se determina al pH respectivo especificado. Para determinar los datos de actividad relativa, la actividad determinada a pH 5,5 se fija en 100 %. A) Las fitasas se expresan en *A. niger* y se miden en el sobrenadante del cultivo. B) Las fitasas se expresan en *E. coli*, se concentraron utilizando una columna de Ni-NTA y después se midieron.

60 La Figura 3 muestra el mapa del plásmido del plásmido de expresión pGLA53-HF598.

La Figura 4 muestra el mapa del plásmido del plásmido de expresión pFus5#2.

La Figura 5 muestra el mapa del plásmido del plásmido de expresión pH6-Fus5#2.

La Figura 6 muestra el mapa del plásmido del plásmido de expresión pGLA53-Fus5#2.

Ejemplos

Clonación de la fitasa de *Hafnia* sp. LU11047

5 Las fitasas se buscan en una serie de enterobacterias de forma análoga a las publicaciones de Huang y col., (2006) A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. *Biochem Biophys Res Commun* 350: 884–889, Shi y col., (2008) A novel phytase gene *appA* from *Buttiauxella* sp. GC21 isolated from grass carp intestine. *Aquaculture* 275:70–75 y el documento WO2008116878 (Ejemplo 1) con la ayuda de los oligos degenerados Haf1090 5'–GAYCCNYTNTTYCAYCC–3' (SEC ID: 1) y Haf1092 5'–GGNGTRTTRTCNGGYTG–3' (SEC ID: 2) a
10 temperaturas de hibridación de entre 40 °C y 50 °C, utilizando PCR. Los productos de la PCR formados se emplean como molde para una PCR semianidada utilizando los oligos Haf1090 5'–GAYCCNYTNTTYCAYCC–3' (SEC ID 1) y Haf1091 5'–GCDATRTTNGTRTCRTG–3' (SEC ID 3) en condiciones de hibridación idénticas. Se puede aislar un fragmento de una cepa bacteriana del género *Hafnia* (*Hafnia* sp. LU11047). El fragmento aislado se subclonó con la ayuda del kit "TOPO TA Cloning ® Kit" (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente se
15 secuenció. A partir de esta secuencia parcial se amplifica la secuencia de longitud completa de la fitasa por medio del procedimiento denominado TAIL-PCR (Yao–Guang Liu y Robert F. Whittier (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25, 674–681). Para este fin se usan los siguientes oligonucleótidos:

Amplificación del extremo 3':

20 1. Haf1165 (5'–WCAGNTGWTNGTNCTG– 3', SEC ID 4) y Haf1167 (5'–CTTCGAGAGCCACTTTATTACCGTCCG – 3', SEC ID 5)
2. Haf1165 (5'– WCAGNTGWTNGTNCTG – 3', SEC ID 4) y Haf1168 (5'–CCAATGTTGTGCTGCTGACAATAGG– 3', SEC ID 6)
25 3. Haf1165 (5'– WCAGNTGWTNGTNCTG– 3', SEC ID 4) y Haf1169 (5'–CCGAACATCATCAGCGCTAAAGATGC– 3', SEC ID 7)

Amplificación del extremo 5':

30 1. Haf1077 (5'– CAWCGWNGASASGAA– 3', SEC ID 8) y Haf1170 (5'– CGCAGTTTGACTTGATGTCGCGCACG– 3', SEC ID 9)
2. Haf1077 (5'– CAWCGWNGASASGAA– 3', SEC ID 8) y Haf1171 (5'– GTCGCGCACGCCCTATATCGCCAAGC–3', SEC ID 10)
3. Haf1077 (5'– CAWCGWNGASASGAA– 3', SEC ID 8) y Haf1172 (5'– CTGCAAACCATCGCACACGCACTGG– 3', SEC ID 11)

Los fragmentos de ADN obtenidos se clonan con la ayuda del kit· TOPO TA Cloning ® Kit" (Invitrogen) y se secuencian. Las secuencias de nucleótidos dan el gen de SEC ID 12, que codifica la fitasa de *Hafnia* sp. LU11047.
35 La secuencia de aminoácidos SEC ID 13, que deriva del mismo, tiene una identidad del 98 % con la secuencia de la fitasa de una fitasa de *Hafnia alvei* del documento WO200811678. Usando el software SignalP 2.0, se prevé que los aminoácidos 1-33 sean un péptido señal. La enzima madura, en consecuencia, comienza con la serina en la posición 34.

1. Fitasa sintética Fus5 # 2

40 Clonación de la fitasa Fus5#2

Comenzando a partir del ADN cromosómico de *Hafnia* sp. LU11047, un fragmento de las bases 1 - 1.074 de la fitasa (SEC ID 14) se amplifica por medio de PCR. Los oligonucleótidos derivan de la secuencia de ADN de una supuesta fitasa (o fosfatasa ácida) de *Yersinia mollaretii* ATCC43969, NCBI Sequenz ID ZP_00824387 para amplificar los nucleótidos 1057 - 1323. Esto se utiliza para amplificar un segundo fragmento de la fitasa del ADN cromosómico de
45 *Yersinia mollaretii* ATCC 43969 (SEC ID 15). Tras la amplificación de los dos fragmentos de fitasa se genera un solapamiento de 20 pb con el respectivo otro fragmento de fitasa, con la ayuda de los oligos utilizados, tanto en el extremo 3' del fragmento de *Hafnia* y el extremo 5' del fragmento de *Yersinia*. De esta manera, los dos fragmentos se pueden combinar mediante fusión de PCR para dar la secuencia de la fitasa SEC ID 16, que codifica la fitasa sintética Fus5 #2. Para la secuencia de aminoácidos SEC ID 17 derivada de la misma, mediante el software SignalP 2.0 se predice que los aminoácidos 1-33 son un péptido señal. La fitasa madura Fus5#2 (SEC ID 18) está codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID 19.

Para clonar un plásmido de expresión para *E. coli* se genera un sitio de escisión de restricción *NdeI* en el extremo 5' del fragmento de ADN de la fitasa de SEC ID 16 y se generan un sitio de escisión de restricción *HindIII* y un codón de terminación en el extremo 3'. Las secuencias adicionalmente necesarias para esto se introducen por medio de
55 una reacción de PCR a través de los cebadores utilizados, con la ayuda de la SEC ID 16 de fitasa como molde.

Usando estos sitios de corte, el gen que codifica la fitasa se clona en el vector de expresión de *E. coli* pET22b (Novagen). Usando el sitio de escisión de restricción *NdeI* y mediante la introducción del codón de terminación se elimina la secuencia señal pelB del vector y se evita la lectura en el marcador 6xHis, que está presente en el plásmido. El plásmido pFus5 # 2 (SEC ID 20) generado de este modo se transforma en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen).

Para la mejora de la purificación de la proteína fitasa, una variante de la fitasa con un marcador 6xHis en N-terminal se clona. Utilizando el oligocebador sentido H6: 5'-ctatggatccgcatcatcatcatcacagtgataccgccctgc-3' (SEC ID 21), que introduce no solo el marcador 6xHis, sino también un sitio de escisión *BamHI* y que actúa como molde para la secuencia SEC ID 19, que codifica la proteína fitasa madura, se amplifica un producto de PCR. En el extremo 3' del producto de la PCR, de nuevo se introducen un codón de terminación y un sitio de escisión de restricción *NdeI* utilizando el mismo oligo antisentido. El fragmento generado de este modo se clona en el vector pET22b a través de *BamHI/NdeI*, dando lugar al plásmido pH 6-Fus5 # 2 (SEC ID 22), que asimismo se transforma en *E. coli* BL21 (DE3). En el caso de esta construcción, la secuencia señal pelB, que está comprendida en pET22b, se utiliza para el transporte hacia el periplasma.

Ensayo de fitasa

La actividad fitasa se determina en placas de microtitulación. La muestra de enzima se diluye en tampón de reacción (acetato Na 250 mM de, CaCl₂, 1 mM, 0,01 % de Tween 20, pH 5,5). 10 µl de la solución de enzima se incuban con 140 µl de la solución de sustrato (fitato Na 6 mM (Sigma P3168) en tampón de reacción) durante 1 hora a 37 °C. La reacción se inactiva mediante la adición de 150 µl de solución de ácido tricloroacético (15 % p/p). Para detectar el fosfato liberado, 20 µl de la solución de reacción inactivada se tratan con 280 µl de reactivo de color recién preparado (ácido L-ascórbico 60 mM (Sigma A7506), molibdato de amonio tetrahidrato 2,2 mM, H₂SO₄ 325 mM), y se incuban durante 25 minutos a 50 °C, y la absorción a 820 nm se determinó posteriormente. Para el valor en blanco, el tampón de sustrato por sí solo se incubó a 37 °C y los 10 µl de la muestra de enzima solamente se añaden después de inactivar con ácido tricloroacético. La reacción de color se lleva a cabo de manera análoga a las mediciones restantes. La cantidad de fosfato liberado se determina a través de una curva de calibración de la reacción de color con una solución de fosfato de concentración conocida.

Expresión en *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* BL21 (DE3), que albergan un plásmido con un casete de expresión de fitasa, se cultivan a 37 °C en medio LB suplementado con ampicilina (100 mg / l). La expresión de la fitasa se induce a una DO (600 nm) de 0,6 mediante la adición de IPTG 1 mM. Después de 4 horas de inducción, se añade 10 % (v / v) de una solución 10x BugBuster (Novogen) y la mezcla se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, el sobrenadante se utiliza para determinar la actividad fitasa.

Purificación mediante cromatografía de afinidad de Ni

Para purificar las variantes de fitasa marcadas con 6xHis, un caldo de cultivo de *E. coli* que expresa fitasa inducido se trata con NaCl 300 mM, inhibidor de proteasa Complete™ sin EDTA (siguiendo las instrucciones del fabricante Roche Applied Science) y con 10 % (v / v) de una solución 10x BugBuster (Novogen) y la mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, el sobrenadante se une a columnas de Ni-NTA / KIT (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución después de las etapas de lavado se lleva a cabo usando tampón de elución en frío (tampón de acetato de Na 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM, CaCl₂ 1 mM). Antes de determinar el contenido de proteína, la muestra se somete a un intercambio de tampón para citrato de sodio 2 mM a pH 5,5 mediante diálisis.

Expresión en *Aspergillus niger*

Para expresar la fitasa Fus5#2 en *Aspergillus niger*, se prepara primero una construcción de expresión que comprende el gen de la fitasa bajo el control del promotor de la glucoamilasa de *A. niger* (*glaA*), flanqueado por la región no codificante 3'-*glaA*. De esta manera, la construcción se destina a la integración en la región 3'-*glaA* en *A. niger*. La secuencia señal utilizada para la secreción de proteína extracelular es la secuencia señal de la fitasa de *A. ficuum*. La base utilizada para la construcción de expresión es el plásmido pGBGLA-53 (también denominado pGBTOPFYT-1 en el documento WO9846772), que se describe en detalle en el documento EP0635574B1. Con la ayuda de técnicas de clonación basadas en PCR conocidas por un experto en la técnica, el segmento génico de la fitasa de *A. ficuum*, que codifica la proteína fitasa madura a comenzando con la secuencia de aminoácidos ASRNQSS, en pGBGLA-53 se sustituye por el segmento génico de la SEC ID 19, que codifica la fitasa Fus5 # 2 madura. Esto da lugar al plásmido resultante pGLA53-Fus5 # 2 (SEC ID 23). La cotransformación del casete de expresión lineal, aislado a partir del plásmido resultante usando *HindIII*, junto con un casete marcador amdS, aislado del plásmido pGBLA50 (documento EP0635574B1) / pGBAAS-1 (nombre del mismo plásmido en el documento WO9846772), en una cepa de expresión de *A. niger* con delección de *gla-A* y la posterior expresión de la fitasa en matraces de agitación se lleva a cabo como se describe en las dos especificaciones de patentes citadas. La actividad fitasa en el sobrenadante del cultivo se determina diariamente después de que se han centrifugado las células. La máxima actividad se alcanza entre el día 3 y el día 6.

2. Variantes de fitasa de la fitasa Fus5#2

Las variantes de la fitasa se generan mediante la mutación de la secuencia génica de SEC ID 19 por medio de PCR. El "Quickchange Site-directed Mutagenesis Kit" (Stratagene) se utiliza para llevar a cabo una mutagénesis dirigida. Una mutagénesis aleatoria sobre toda la secuencia de codificación, o bien sobre solo una parte de la misma, de la SEC ID 19 se realiza con la ayuda del kit "GeneMorph II Random Mutagenesis Kit" (Stratagene). La tasa de mutagénesis se establece en la cantidad deseada de 1-5 mutaciones a través de la cantidad de molde de ADN usada. Se generan mutaciones mediante la combinación dirigida de mutaciones individuales o mediante la realización secuencial de varios ciclos de mutagénesis.

Las variantes de fitasa generadas se analizan para determinar la actividad fitasa y la termoestabilidad en un ensayo con capacidad de alto rendimiento. Con este fin, los clones de *E. coli* BL21 (DE3) obtenidos después de la transformación con la construcción de expresión basada en pET22b se incuban (30 °C, 900 rpm, desviación del agitador de 2 mm) en placas de microtitulación de 96 pocillos en medio LB (2 % de glucosa, ampicilina 100 mg / l). La inducción se lleva a cabo con IPTG 1 mM durante 4 horas a una DO (600 nm) de aproximadamente 0,5. A continuación se añade 10 % (v / v) de una solución 10x BugBuster (Novogen) y la mezcla se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se determinan la actividad fitasa y la actividad residual después de 20 minutos de estrés térmico.

La fitasa HF598 (SEC ID 24) generada de esta manera y las variantes de la misma se clonan en el vector de expresión de *E. coli* pET22b (Novagen) de forma análoga a los procedimientos descritos en la sección anterior y, posteriormente, se expresa con la ayuda de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Además, las construcciones de expresión adecuados para *Aspergillus niger* se clonan de modo que la fitasa se pueda expresar después de la transformación en *A. niger*. Cuando se utiliza un gen sintético (SEC ID 25), que codifica la variante HF598 madura (SEC ID 24) y que se había adaptado al uso de codones de *A. niger* (GENEART AG, Regensburg), se obtiene el plásmido pGla53-HF598 (SEC ID 26).

Determinación de la termoestabilidad (T_{50})

Para registrar la curva de inactivación térmica, la muestra de enzima que se diluye en tampón de reacción (acetato de Na 250 mM, CaCl_2 1 mM, 0,01 % de Tween 20, pH 5,5) se calienta durante 20 minutos a las respectivas temperaturas y posteriormente se enfría a 4 °C. Una muestra de referencia que no ha sufrido tratamiento térmico se deja a temperatura ambiente durante 20 minutos y, después, también se enfría a 4 °C. Después del pretratamiento térmico, la actividad enzimática de las muestras se determina por medio del ensayo de fitasa. La actividad de la muestra de referencia se normaliza a 100 %. La termoestabilidad de las diversas variantes de fitasa se caracteriza por lo que se conoce como el valor de T_{50} . La T_{50} indica la temperatura a la cual todavía hay actividad residual del 50 % después de la inactivación térmica, en comparación con una muestra de referencia que no ha sufrido tratamiento térmico. Los cambios en la termoestabilidad de dos variantes de fitasa dos, expresada en °C, es el resultado de la diferencia de los respectivos valores de T_{50} .

Tabla 1: Termoestabilidad (T_{50}) de la fitasa HF598 (véase la Figura 1) y sus variantes en °C. Los cambios sobre la SEC ID 24 se especifican en los intercambios de aminoácidos individuales en la forma [aminoácido original] [posición 4] [nuevo aminoácido]. El símbolo "-" indica una delección del aminoácido en cuestión. La numeración de la posición del aminoácido se refiere siempre a la SEC ID 24.

Mutante	Mutación	T_{50} [°C]
HF598	SEC ID 24	84
PhV-001	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T E144A G217S D398E	84
PhV-002	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T N92A E144A G217S D398E	85
PhV-003	D2E A4E A6S F8Y D33M R67L K76N N78T N92A E144A G217S M260I D398E	85
PhV-004	D2E A4E A6S F8Y D33M R67L K76N N78T Q109N Q159N M260I D398E	85
PhV-005	D33N P75N D77T V123A E144A G152T G217S	81
PhV-006	D33N Q71E T121Q V123A E144A G152T G217S	81
PhV-007	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A E144A G152T G217S	81
PhV-008	D33N T121Q V123A S136K E144A G152T G217S Q406K	81
PhV-009	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M H37Y K76N N78T V123A E144A G152T G217S	81
PhV-010	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A E144A G152T G217S	82
PhV-011	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M H37Y P75N D77T V123A E144A G152T G217S	81

ES 2 553 458 T3

(continuación)

Mutante	Mutación	T ₅₀ [°C]
PhV-012	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A E144A G152T G217S D398E	82
PhV-013	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A E144A G152T G217S D398K	81
PhV-014	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A E144A G152T G217S D398G	81
PhV-015	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T Q109E V123A E144A G152T G217S	81
PhV-016	S1-D2-T3Q A4G P5AA6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T Q109N V123A E144A G152T G217S	81
PhV-017	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A E144A G152T Q159N G217S	82
PhV-018	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A E144A G152T G217S T322Q	81
PhV-019	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A E144A G152A G217S	82
PhV-020	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A E144A G217S	83
PhV-021	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M V123A E144A G152T G217S	82
PhV-022	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A E144A G217S	82
PhV-023	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A E144A G152T G217S I300L	82
PhV-024	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A S136K Q141K E144A G152T G217S	82
PhV-025	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A S136K E144A G152T G217S	81
PhV-026	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N 77SQD79 V123A E144A G152T G217S	82
PhV-027	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N 77SQG79 V123A E144A G152T G217S	81
PhV-028	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A S136K E144A G152T A166E G217S	81
PhV-029	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A S136K E144A G152T A166H G217S	81
PhV-030	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A S136K E144A G152T	82
PhV-031	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T V123A E144A G152T G217S	83
PhV-032	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A E144A G152T N159K G217S	81
PhV-033	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A E144A G152T G217S Q406K	81
PhV-034	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T E144A G152T G217S	81
PhV-035	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T E144A G152T G217S I300L	81
PhV-036	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A G152T A166E G217S	82
PhV-037	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A G152T A166H G217S	82
PhV-038	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A G152T	82
PhV-039	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A E144A G152T A166H G217S D398E	82
PhV-040	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A E144A G152T D398E	82

ES 2 553 458 T3

(continuación)

Mutante	Mutación	T ₅₀ [°C]
PhV-041	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A S136K E144A G152T G217S D398E	82
PhV-042	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A S136K E144A G152T Q193L G217S	82
PhV-043	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T N119A V123A E144A G152T G217S	81
PhV-044	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T N119T V123A E144A G152T G217S	81
PhV-045	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T Q109N V123A E144A G217S I300L	83
PhV-046	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T Q109N V123A E144A G217S K268N I300L	81
PhV-047	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T Q109N V123A E144A G152T G217S K268N I300L	81
PhV-048	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76I N78T V123A E144A G217S	83
PhV-049	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76R N78T V123A E144A G217S	82
PhV-050	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76D N78T V123A E144A G217S	82
PhV-051	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T Q118S V123A E144A G152T G217S	82
PhV-052	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T Q118S N119A V123A E144A G152T G217S	81
PhV-053	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T E144A G217S I300L	83
PhV-054	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T Q118S N119A V123A E144A G217S	82
PhV-055	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T V123A E144A G217S Q276N	83
PhV-056	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T V123A E144A G152T G217S Q276N N346G	82
PhV-057	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T Q109N V123A E144A G217S Q276N I300L N346G	82
PhV-058	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T V123A E144A G217S	83
PhV-059	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T V123A E144A G217S D398E	83
PhV-060	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T Q109N V123A E144A G217S I300L N346G	83
PhV-061	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A E144A G152T E155N G217S D345G	81
PhV-062	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T S136K E144A G217S	82
PhV-063	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A E144A G152T E155N G217S Q276N	82
PhV-064	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T N92A V123A E144A G152T G217S	84
PhV-065	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T N92T V123A E144A G152T G217S	83
PhV-066	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T N92V V123A E144A G152T G217S	83
PhV-067	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T N92A E144A G152T G217S	85
PhV-068	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T N92E E144A G152T G217S	84
PhV-069	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T N92T E144A G152T G217S	84
PhV-070	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T N92V E144A G152T G217S	85

ES 2 553 458 T3

(continuación)

Mutante	Mutación	T ₅₀ [°C]
PhV-071	S1A D2S T3R A4N P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A E144A G152T G217S	83
PhV-072	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T N92E V123A E144A G152T G217S	84
PhV-073	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76I N78T Q109N V123A E144A G152T G217S I300L	83
PhV-074	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76I N78T Q109N V123A E144A G152T G217S I300L D398E	83
PhV-075	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T Q109N V123A G152T I300L	83
PhV-076	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T N92A E144A G152T G217S I300L	84
PhV-077	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T N92E E144A G152T G217S I300L	83
PhV-078	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T N92T E144A G152T G217S I300L	84
PhV-079	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T N92V E144A G152T G217S I300L	83
PhV-080	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A S136K Q141 K E144A G152T G217S I300L	81
PhV-081	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T E144A G217S D398E	84
PhV-082	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T V123A E144A T156G G217S Q276N D398E	82
PhV-083	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T V123A E144A G217S Q276N I300L D398E	83
PhV-084	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T N92A V123A S136K E144A G152T G217S	83
PhV-085	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76I N78T N92A Q109N V123A E144A G152T G217S I300L	84
PhV-086	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T Q109N E144A G152T G217S K268A Q276N I300L N346G	82
PhV-087	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A E144A G152T E155N G217S	82
PhV-088	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T V123A E144A T156G G217S D398E	83
PhV-089	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T V123A E144A G217S I300L D398E	83
PhV-090	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A E144A G152T E155H G217S	82
PhV-091	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A E144A G152T E155G G217S D345G	82
PhV-092	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A E144A G152T E155N G217S D345G	82
PhV-093	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A E144A G152T E155H G217S D345M	82
PhV-094	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T Q109N E144A T156G G217S Q276N I300L N346G	83
PhV-095	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76I N78T V123A D398E	83
PhV-096	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76I N78T N92A E144A G152T G217S	84
PhV-097	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T N92A Q109N E144A G152T Q159N G217S	85
PhV-098	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76I N78T N92A V123A S136K E144A G152T G217S	84
PhV-099	D2E A4E A6S F8Y K76N N78T V123A E144A G217S	84
PhV-100	K76N N78T V123A E144A G152T G217S N258D H261S Q270N	82
PhV-101	K76N N78T V123A E144A G217S N258D H261S Q270N	83

ES 2 553 458 T3

(continuación)

Mutante	Mutación	T ₅₀ [°C]
PhV-102	D33M K76N N78T V123A E144A G152T G217S N258D H261S Q270N	82
PhV-103	V123A E144A G217S	84
PhV-104	D33M K76N N78T V123A E144A G217S	84
PhV-105	T121Q V123A E144A G152T G217S	83
PhV-106	K76N N78T V123A E144A G217S Q270N	83
PhV-107	K76N N78T V123A E144A G152T G217S	83
PhV-109	Q159N G217S	83
PhV-110	V123A E144A Q159N M260I	84
PhV-111	N92A V123A E144A Q159N M260I	85
PhV-112	S1-D2-T3Q A4G P5A V123A E144A G217S	84
PhV-113	S1-D2-T3Q A4G P5A V123A E144A G217S	84
PhV-114	A6D G7K F8M Q9K V123A E144A G217S	84
PhV-115	N92A Q159N M260I	85
PhV-116	Q159N M260I	84
PhV-117	S1A D2S T3R A4N V123A E144A G217S	84
PhV-118	M260I	84
PhV-119	V123A E144A Q159N M260I	84
PhV-120	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T V123A E144A G217S	84
PhV-121	S1-D2-T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T V123A E144A G217S	84
PhV-122	D33M K76N N78T V123A E144A G217S	84
PhV-123	D2E A4E A6S F8Y T121Q V123A E144A G152T G217S N258D H261S Q270N	82
PhV-124	D2E A4E A6S F8Y K76N N78T V123A E144A G217S Q270N	85
PhV-125	N92A E144A G217S	84
PhV-126	N92A E144A G217S M260I	84
PhV-127	V123A Q159N M260I	84
PhV-128	A4E A6S V123A E144A G217S	84
PhV-129	R67L V123A Q159N M260I	84
PhV-130	L16V V123A Q159N M260I	83
PhV-131	K12R V123A Q159N M260I	84
PhV-132	K12R L16V V123A E144A Q159N M260I	83
PhV-133	R67L E144A Q159N M260I	85
PhV-134	V123A Q159N A166E M260I	85
PhV-135	R67L Q159N A166E M260I	84
PhV-136	N92A Q159N A166E M260I	84
PhV-137	N92A V123A E144A Q159N A166E M260I D398E	83
PhV-138	Q159N A166E M260I D398E	84
PhV-139	V123A Q159N	84
PhV-140	K12R R67L	84
PhV-141	L16V R67L	84
PhV-142	R67L A166E	84
PhV-143	A166E I300L	84
PhV-144	I120L I300L	84
PhV-145	I120L L371A	84
PhV-146	R67L I120L A166E L371A	84
PhV-147	I120L I300L L371A	84

Determinación del perfil de pH

Para determinar el perfil de pH, un tampón de reacción modificado (acetato de Na 100 mM, glicina 100 mM, imidazol 100 mM, CaCl₂ 1 mM, 0,01 % de Tween 20), que se lleva a valores de pH en el intervalo de pH 1,5 – 7 usando ácido clorhídrico diluido, se utiliza para el ensayo de fitasa. Para determinar la actividad relativa, la actividad determinada a pH 5,5 se fija en 100 %. Los resultados se muestran en las tablas 2 y 3.

5

Tabla 2: Perfiles de pH de la fitasa HF598 y sus variantes. La fitasa se expresa en *A. niger* y se mide directamente en el sobrenadante del cultivo. La actividad de la fitasa se muestra en % como un valor relativo de la actividad determinada a pH 5,5 (véase la figura 2A).

pH	1,5	2	3	4	5,0	5,5	6	7,0
HF598	8	30	57	81	123	100	68	4
PhV-107	8	24	51	78	117	100	60	3
PhV-109	6	24	49	76	127	100	59	3
PhV-110	6	27	48	85	134	100	70	4
PhV-111	7	38	76	105	134	100	57	3
PhV-124	7	41	61	76	125	100	67	4

5 Tabla 3: perfiles de pH de algunas variantes de la fitasa. La fitasa se expresa en *E. coli* y se purifica mediante cromatografía de afinidad de Ni. La actividad de la fitasa se muestra en % como un valor relativo de la actividad determinada a pH 5,5 (véase la figura 2B).

pH	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7
PhV-007	7	23	43	80	126	155	160	142	100	45	13	4
PhV-058	3	22	44	75	108	138	147	132	100	51	15	4
PhV-067	6	32	70	123	171	201	182	158	100	52	17	5
PhV-071	4	23	44	77	119	151	157	143	100	53	16	4
PhV-081	4	23	55	79	110	125	131	130	100	53	16	1

Determinación de la estabilidad a pH 2

- 10 Para determinar la estabilidad a pH 2, la muestra de fitasa se diluye en tampón (glicina 250 mM, 3 mg / ml de BSA, pH 2) a 30 U / ml. La muestra se incuba durante 30 minutos a 37 °C. Después, la muestra se diluye directamente con tampón de reacción (acetato de Na 250 mM, CaCl₂ 1 mM, 0,01 % de Tween 20, pH 5,5) al intervalo de medición óptimo de la determinación de la actividad fitasa (aprox. 0,6 U / ml) y se mide la actividad de fitasa. A modo de referencia, la muestra se incuba en paralelo durante 30 minutos a 37 °C en tampón de reacción a una concentración de 30 U / ml y también se analiza la actividad de fitasa. Las actividades de las muestras sometidas a estrés de pH estresadas se normalizan con el valor de referencia, que se establece como una estabilidad del 100 %. En el ensayo también se usa Natuphos® (BASF) a modo de comparación con una fitasa comercial.
- 15

20 Tabla 4: Determinación de la estabilidad a pH 2 de la fitasa HF598 y sus variantes y de la fitasa Fus5 # 2 y la fitasa comercial Natuphos®. Las muestras con una estabilidad de > 90 % se marcan como "estables". Para una mejor diferenciación gradual entre las muestras inestables, las estabilidades medidas se indican en %.

Fitasa	Estabilidad a pH 2
Natuphos® Fus5#2	65 % estable
<u>Mutante</u> HF598	<u>Mutación</u> SEC ID 24
PhV-056	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T V123A E144A G152T G217S Q276N N346G
PhV-057	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T Q109N V123A E144A G217S Q276N I300L N346G
PhV-058	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T V123A E144A G217S
	estable

ES 2 553 458 T3

(continuación)

Fitasa		Estabilidad a pH 2
PhV-059	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T V123A E144A G217S D398E	estable
PhV-067	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T N92A E144A G152T G217S	estable
PhV-071	S1A D2S T3R A4N P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A E144A G152T G217S	estable
PhV-081	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T E144A G217S D398E	estable
PhV-107	K76N N78T V123A E144A G152T G217S	estable
PhV-109	Q159N G217S	estable
PhV-110	V123A E144A Q159N M260I	estable
PhV-111	N92A V123A E144A Q159N M260I	estable

Determinación de la estabilidad a la pepsina

- 5 Para determinar la estabilidad a la pepsina, la muestra de fitasa se diluye hasta 30 U / ml en tampón que comprende pepsina (glicina 250 mM, 3 mg / ml de BSA, pH 2, 10 mg / ml de pepsina (Sigma P-7000, 445 U / mg). La muestra se incuba durante 30 minutos a 37 °C. Después, la muestra se diluye directamente con tampón de reacción (acetato de Na 250 mM, CaCl₂ 1 mM, 0,01 % de Tween 20, pH 5,5) al intervalo de medición óptimo de la determinación de la actividad fitasa (aprox. 0,6 U / ml) y se determina la actividad de fitasa. A modo de referencia, la muestra se incuba en paralelo durante 30 minutos a 37 °C en tampón de reacción a pH 5,5 a una concentración de 30 U / ml y también se analiza la actividad de fitasa. Las actividades de las muestras previamente tratadas con pepsina se normalizan con el valor de referencia, que se establece como una estabilidad del 100 %. En el ensayo también se usó Natuphos® (Natuphos® 10000L, BASF SE) a modo de comparación con una fitasa comercial.

- 15 Tabla 5: Determinación de la estabilidad a la pepsina de la fitasa HF598 y sus variantes y de la fitasa Fus5 # 2 y la fitasa comercial Natuphos®. Las muestras con una estabilidad de > 80 % se marcan como "estables". Para una mejor diferenciación gradual entre las muestras inestables, las estabilidades medidas se indican en %.

Fitasa		Estabilidad a la pepsina
Natuphos®		20 %
Fus5#2	SEC ID 18	1 %
<u>Mutante</u>	<u>Mutación</u>	
HF598	SEC ID 24	estable
PhV-056	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T V123A E144A G152T G217S Q276N N346G	estable
PhV-057	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33M K76N N78T Q109N V123A E144A G217S Q276N I300L N346G	estable
PhV-058	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T V123A E144A G217S	estable
PhV-059	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T V123A E144A G217S D398E	estable
PhV-067	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T N92A E144A G152T G217S	estable
PhV-071	S1A D2S T3R A4N P5A A6D G7K F8M Q9K K12R D33N K76N N78T V123A E144A G152T G217S	estable
PhV-081	D2E A4E A6S F8Y D33M K76N N78T E144A G217S D398E	estable
PhV-107	K76N N78T V123A E144A G152T G217S	estable
PhV-109	Q159N G217S	estable
PhV-110	V123A E144A Q159N M260I	estable
PhV-111	N92A V123A E144A Q159N M260I	estable

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> BASF SE
- 20 <120> Variantes sintéticas de fitasa
- <130> PF 72013
- <140> PCT/US
- 25 <141>

<150> 61/477637 (Solicitud provisional de Estados Unidos) 11163410.1 (Solicitud de prioridad EP)
<151> 21 de abril del 2011

<160> 26

5

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 17

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n es a, c, g, o t

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n es a, c, g, o t

25

<400> 1

gayccnytnt tycaycc 17

<210> 2

30

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Cebador

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

40

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

45

<223> n es a, c, g, o t

<400> 2

ggngtrtrtrt cnggytg 17

50

<210> 3

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55

<223> Cebador

<220>

<221> misc_feature

60

<222> (9)..(9)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 3

gdatrttng trtrctg 17

65

<210> 4
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n e s a , c , g , o t
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n e s a , c , g , o t
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n e s a , c , g , o t
 <400> 4
 25 wcagntgwn gtnctg 16
 <210> 5
 <211> 26
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 35 <400> 5
 ctcgagagc cactttatta ccgtcg 26
 <210> 6
 <211> 25
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 45 <400> 6
 ccaatgtgt gctgctgaca atagg 25
 <210> 7
 <211> 25
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Cebador
 <400> 7
 ccgaactcat cagcgctaaa gatgc 25
 60 <210> 8
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n e s a , c , g , o t
 5
 <400> 8
 cawcgwcn ga sasgaa 16
 <210> 9
 10 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador
 <400> 9
 cgcagtttga ctgatgtcg cgcacg 26
 20 <210> 10
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 10
 30 gtcg'gcacg ccctatatcg ccaagc 26
 <210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 11
 40 ctgcaaacca tcgcacacgc actgg 25
 <210> 12
 <211> 1341
 <212> ADN
 45 <213> *Hafnia sp.*
 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(99)
 50 <400> 12

atgacaatct ctctgtttaa ccgtaataaa cccgctattg cacagcgtat tttatgtcct 60
 ctgatcgtgg ctttattctc aggtttaccg gcatacgcca gtgataccgc cctgtctggg 120
 ttccagttgg aaaaggttgt taccctaagc agacatggcg tacgcgcgcc aaccaaaatg 180
 acacaaacga tgcgcaacgt cacacctcac cagtggcctg aatggccggt aaaactcggc 240
 tatatcaccg cccgcggtga acatctgatt agcctgatgg gcggttttta tcgagagcgc 300
 tttcagcaac aaggcttatt acctaaggat aactgtccta caccagatgc cgtgtatggt 360
 tgggcagacg tcgatcaacg cacacgtaaa accggcgagg ccttcttagc gggctctgct 420
 ccccagtggtg atttagcgat ccaccatcag caaaacattc agcaggccga tccgctgttc 480
 catcctgtga aagccggtat ctgttcgatg gataaatcac aggcacacgc cgccgttgaa 540
 aagcaggcag gcacaccgat tgagacgctc aatcaacgct atcaagcacc ttagcgcgtg 600
 atgagttcgg tactcgattt tccaaaatcc ccctattgtc agcagcacia cattggcaaa 660
 ctctgcgatt tttcacaggc gatgcctagc aggctggcga taaatgacga cggtaataaa 720
 gtggctctcg aagggtccgt gggactttca tcgacgttgg ctgaaatttt cctgctggaa 780
 cacgctcagg gaatgcctaa agtggcttgg gggaaatctc aactgagca gcaatgggac 840
 tctctgttaa aattgcataa tgcgcagttt gacttgatgt cgcgcacgcc ctatatcgcc 900
 aagcataacg gtactccact gctgcaaacc atcgcacacg cactgggttc caatatcgcg 960
 agtcgcccac tgcgggatat ttcgcccagc aataagatcc tgtttattgc cggtcacgac 1020
 accaatattg ccaatatttc tggcatgcta gggatgacat ggacacttcc gggacagcca 1080
 gataacacgc ctccgggagg ggctttagtg tttgaacggt gggtagataa cgcggggaaa 1140
 ccgtatgtta gcgtgaatat ggtgtatcaa aactggcac agttgcacga ccagacgcgg 1200
 ctaacgttgc agcatcctgc gggcagcgtc cgactaaaca taccgggttg cagcgatcaa 1260
 acgcccgatg gctattgccg gctctccacc ttcagccggt tagtcaacca cagcgttgag 1320
 cctgcgtgcc agcttcctta a 1341

<210> 13
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> *Hafnia* sp.

5

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(33)

10

<400> 13

ES 2 553 458 T3

Met Thr Ile Ser Leu Phe Asn Arg Asn Lys Pro Ala Ile Ala Gln Arg
 1 5 10 15

Ile Leu Cys Pro Leu Ile Val Ala Leu Phe Ser Gly Leu Pro Ala Tyr
 20 25 30

Ala Ser Asp Thr Ala Pro Ala Gly Phe Gln Leu Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 50 55 60

Arg Asn Val Thr Pro His Gln Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 65 70 75 80

Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 85 90 95

Tyr Arg Glu Arg Phe Gln Gln Gln Gly Leu Leu Pro Lys Asp Asn Cys
 100 105 110

Pro Thr Pro Asp Ala Val Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 115 120 125

Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Asp
 130 135 140

Leu Ala Ile His His Gln Gln Asn Ile Gln Gln Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160

His Pro Val Lys Ala Gly Ile Cys Ser Met Asp Lys Ser Gln Ala His
 165 170 175

ES 2 553 458 T3

Ala Ala Val Glu Lys Gln Ala Gly Thr Pro Ile Glu Thr Leu Asn Gln
180 185 190

Arg Tyr Gln Ala Ser Leu Ala Leu Met Ser Ser Val Leu Asp Phe Pro
195 200 205

Lys Ser Pro Tyr Cys Gln Gln His Asn Ile Gly Lys Leu Cys Asp Phe
210 215 220

Ser Gln Ala Met Pro Ser Arg Leu Ala Ile Asn Asp Asp Gly Asn Lys
225 230 235 240

Val Ala Leu Glu Gly Ala Val Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
245 250 255

Phe Leu Leu Glu His Ala Gln Gly Met Pro Lys Val Ala Trp Gly Asn
260 265 270

Ile His Thr Glu Gln Gln Trp Asp Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Ala
275 280 285

Gln Phe Asp Leu Met Ser Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Lys His Asn Gly
290 295 300

Thr Pro Leu Leu Gln Thr Ile Ala His Ala Leu Gly Ser Asn Ile Ala
305 310 315 320

Ser Arg Pro Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
325 330 335

Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ser Gly Met Leu Gly Met
340 345 350

Thr Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
355 360 365

Leu Val Phe Glu Arg Trp Val Asp Asn Ala Gly Lys Pro Tyr Val Ser
370 375 380

Val Asn Met Val Tyr Gln Thr Leu Ala Gln Leu His Asp Gln Thr Pro
385 390 395 400

Leu Thr Leu Gln His Pro Ala Gly Ser Val Arg Leu Asn Ile Pro Gly
405 410 415

Cys Ser Asp Gln Thr Pro Asp Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Ser
420 425 430

Arg Leu Val Asn His Ser Val Glu Pro Ala Cys Gln Leu Pro
 435 440 445

5 <210> 14
 <211> 1074
 <212> ADN
 <213> *Hafnia sp.*

<400> 14

```

atgacaatct ctctgtttaa ccgtaataaa cccgctattg cacagcgtat tttatgtcct      60
ctgatcgtgg ctttattctc aggtttaccg gcatacagcca gtgataccgc ccctgctggg      120
ttccagttgg aaaaggttgt tatectaagc agacatggcg tacgcgcgcc aacccaaatg      180
acacaaacga tgcgcaacgt cacacctcac cagtggcctg aatggccggt aaaactcggc      240
tatatcacgc ccgcgggtga acatctgatt agcctgatgg gcggttttta tcgagagcgc      300
tttcagcaac aaggcttatt acctaaggat aactgtccta caccagatgc cgtgtatggt      360
tgggcagacg tcgatcaacg cacacgtaaa accggcgagg ccttccttagc gggctctgct      420
cccagtgtyg atttagcgat ccaccatcag caaaacattc agcaggccga tccgctgttc      480
catcctgtga aagccggtat ctgttcgatg gataaatcac aggcacacgc cgcggttgaa      540
aagcaggcag gcacaccgat tgagacgctc aatcaacgct atcaagcadc tttagcgcctg      600
atgagttcgg tactcgattt tccaaaatcc ccctattgtc agcagcacia cattggcaaaa      660
ctctgcgatt tttcacaggc gatgcctagc aggctggcga taaatgacga cggtaataaa      720
gtggctctcg aaggtgccgt gggactttca tcgacgttgg ctgaaathtt cctgctggaa      780
cacgctcagg gaatgcctaa agtggcttgg gggaaatatt acactgagca gcaatgggac      840
tctctgttaa aattgcataa tgcgcagttt gacttgatgt cgcgcacgcc ctatatcgcc      900
aagcataacg gtactccact gctgcaaacc atcgcacacg cactgggttc caatatcgcg      960
agtcgcccac tgccggatat ttgcgcagac aataagatcc tgtttattgc cggtcacgac     1020
accaatattg ccaatatttc tggcatgcta gggatgacat ggacacttcc ggga           1074
    
```

10 <210> 15
 <211> 270
 <212> ADN
 <213> *Yersinia mollaretii*

15 <400> 15

```

cagccccgata acacccccgcc ggggtgggggg ctggtgtttg aactatggca gaatccagat      60
aaccatcagc aatatgtcgc agttaagatg ttctatcaaa caatggatca gttacgaaat      120
agtgaaaagt tagacctgaa aagtcatcca gccggtattg ttcccattga gatcgaaggt      180
tgtgagaaca tcggtacaga caaactttgc cagcttgata ccttccaaaa gagagtggct      240
caggtgattg aacctgcatg ccatatttaa                                     270
    
```

ES 2 553 458 T3

<210> 16
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> construcción sintética

10

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(99)

<400> 16

```

atgacaatct ctctgtttaa ccgtaataaa cccgctattg cacagcgtat tttatgtcct      60
ctgatcgtgg ctttattctc aggtttaccg gcatacgcca gtgataccgc ccctgctggg      120
ttccagttgg aaaaggttgt taccctaagc agacatggcg tacgcgcgcc aaccaaagt      180
acacaaacga tgcgcaacgt cacacctcac cagtggcctg aatggccggt aaaactcggc      240
tatatcacgc cccgcggtga acatctgatt agcctgatgg gcggttttta tcgagagcgc      300
tttcagcaac aaggcttatt acctaaggat aactgtccta caccagatgc cgtgtatggt      360
tgggcagacg tcgatcaacg cacacgtaa accggcgagg ccttcttagc gggcttctgt      420
ccccagtgtg atttagcgat ccaccatcag caaacattc agcaggccga tccgctgttc      480
catcctgtga aagccggtat ctgttcgatg gataaatcac aggcacacgc cgccgttgaa      540
aagcaggcag gcacaccgat tgagacgctc aatcaacgct atcaagcacc tttagcgcgt      600
atgagttcgg tactcgattt tccaaaatcc ccctattgtc agcagcacia cattggcaaa      660
ctctgcgatt tttcacaggc gatgcctagc aggcctggcg taaatgacga cggtaataaa      720
gtggctctcg aagggtgccg gggactttca tcgacgttgg ctgaaatttt cctgctggaa      780
cacgctcagg gaatgcctaa agtggcttgg gggaaatatt aactgagca gcaatgggac      840
tctctgttaa aattgcataa tgcgcagttt gacttgatgt cgcgcacgcc ctatatcgcc      900
aagcataacg gtactccact gctgcaaacc atcgcacacg cactgggttc caatatcgcg      960
agtgcgccac tgccggatat ttgccagac aataagatcc tgtttattgc cggtcacgac     1020
accaatattg ccaatatttc tggcatgcta gggatgacat ggacacttcc gggacagccc     1080
gataacaccc cgccgggtgg ggggctggtg tttgaactat ggcagaatcc agataaccat     1140
cagcaatatg tcgacgttaa gatgttctat caaacaatgg atcagttacg aatagtgaa     1200
aagttagacc tgaaaagtca tccagccggt attgttccca ttgagatcga aggttgtgag     1260
aacatcggta cagacaaact ttgccagctt gataccttcc aaaagagagt ggctcaggtg     1320
attgaacctg catgccatat ttaa                                             1344
    
```

15

<210> 17
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> construcción sintética

<220>

5 <221> SEÑAL

<222> (1)..(33)

<400> 17

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

Arg Tyr Gln Ala Ser Leu Ala Leu Met Ser Ser Val Leu Asp Phe Pro
 195 200 205

Lys Ser Pro Tyr Cys Gln Gln His Asn Ile Gly Lys Leu Cys Asp Phe
 210 215 220

Ser Gln Ala Met Pro Ser Arg Leu Ala Ile Asn Asp Asp Gly Asn Lys
 225 230 235 240

Val Ala Leu Glu Gly Ala Val Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 245 250 255

Phe Leu Leu Glu His Ala Gln Gly Met Pro Lys Val Ala Trp Gly Asn
 260 265 270

Ile His Thr Glu Gln Gln Trp Asp Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Ala
 275 280 285

Gln Phe Asp Leu Met Ser Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Lys His Asn Gly
 290 295 300

Thr Pro Leu Leu Gln Thr Ile Ala His Ala Leu Gly Ser Asn Ile Ala
 305 310 315 320

Ser Arg Pro Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 325 330 335

Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ser Gly Met Leu Gly Met
 340 345 350

Thr Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Gly
 355 360 365

Leu Val Phe Glu Leu Trp Gln Asn Pro Asp Asn His Gln Gln Tyr Val
 370 375 380

Ala Val Lys Met Phe Tyr Gln Thr Met Asp Gln Leu Arg Asn Ser Glu
 385 390 395 400

Lys Leu Asp Leu Lys Ser His Pro Ala Gly Ile Val Pro Ile Glu Ile
 405 410 415

Glu Gly Cys Glu Asn Ile Gly Thr Asp Lys Leu Cys Gln Leu Asp Thr
 420 425 430

Phe Gln Lys Arg Val Ala Gln Val Ile Glu Pro Ala Cys His Ile
 435 440 445

ES 2 553 458 T3

<210> 18
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> proteína quimérica

<400> 18

10

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

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

Asn Val Thr Pro His Gln Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly Tyr
 35 40 45

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

Arg Glu Arg Phe Gln Gln Gln Gly Leu Leu Pro Lys Asp Asn Cys Pro
 65 70 75 80

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

Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Asp Leu
 100 105 110

Ala Ile His His Gln Gln Asn Ile Gln Gln Ala Asp Pro Leu Phe His
 115 120 125

Pro Val Lys Ala Gly Ile Cys Ser Met Asp Lys Ser Gln Ala His Ala
 130 135 140

Ala Val Glu Lys Gln Ala Gly Thr Pro Ile Glu Thr Leu Asn Gln Arg
 145 150 155 160

Tyr Gln Ala Ser Leu Ala Leu Met Ser Ser Val Leu Asp Phe Pro Lys
 165 170 175

Ser Pro Tyr Cys Gln Gln His Asn Ile Gly Lys Leu Cys Asp Phe Ser
 180 185 190

Gln Ala Met Pro Ser Arg Leu Ala Ile Asn Asp Asp Gly Asn Lys Val
 195 200 205

Ala Leu Glu Gly Ala Val Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile Phe
 210 215 220

Leu Leu Glu His Ala Gln Gly Met Pro Lys Val Ala Trp Gly Asn Ile
 225 230 235 240

His Thr Glu Gln Gln Trp Asp Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Ala Gln
 245 250 255

Phe Asp Leu Met Ser Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Lys His Asn Gly Thr
 260 265 270

Pro Leu Leu Gln Thr Ile Ala His Ala Leu Gly Ser Asn Ile Ala Ser
 275 280 285

Arg Pro Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile Ala
 290 295 300

Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ser Gly Met Leu Gly Met Thr
 305 310 315 320

Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Gly Leu
 325 330 335

Val Phe Glu Leu Trp Gln Asn Pro Asp Asn His Gln Gln Tyr Val Ala
 340 345 350

Val Lys Met Phe Tyr Gln Thr Met Asp Gln Leu Arg Asn Ser Glu Lys
 355 360 365

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

Gly Cys Glu Asn Ile Gly Thr Asp Lys Leu Cys Gln Leu Asp Thr Phe
 385 390 395 400

Gln Lys Arg Val Ala Gln Val Ile Glu Pro Ala Cys His Ile
 405 410

<210> 19
 <211> 1245
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> construcción sintética

<400> 19

ES 2 553 458 T3

agtgataaccg cccctgctgg gttccagttg gaaaaggttg ttatcctaag cagacatggc 60
 gtacgcgcgc caacccaaat gacacaaacg atgcgcaacg tcacacctca ccagtggcct 120
 gaatggccgg taaaactcgg ctatatcacg ccccgcggtg aacatctgat tagcctgatg 180
 ggcggttttt atcgagagcg ctttcagcaa caaggcttat tacctaagga taactgtcct 240
 acaccagatg ccgtgtatgt ttgggcagac gtcgatcaac gcacacgtaa aaccggcgag 300
 gccttcttag cgggtcttgc tcccagtggt gatttagcga tccaccatca gcaaacatt 360
 cagcaggccg atccgctggt ccatectgtg aaagccggta tctgttcgat ggataaatca 420
 caggcacacg ccgccgttga aaagcaggca ggcacaccga ttgagacgct caatcaacgc 480
 tatcaagcat ctttagcgtc gatgagttcg gtactcgatt ttccaaaatc cccctattgt 540
 cagcagcaca acattggcaa actctgcgat ttttcacagg cgatgcctag caggctggcg 600
 ataatgacg acggtaataa agtggctctc gaaggtgccg tgggacttcc atcgacgttg 660
 gctgaaattt tcctgctgga acacgctcag ggaatgocca aagtggcttg ggggaatatt 720
 cactctgagc agcaatggga ctctctgtta aaattgcata atgcgcagtt tgacttgatg 780
 tcgcgcacgc cctatatcgc caagcataac ggtactccac tgctgcaaac catcgcacac 840
 gcactggggt ccaatatcgc gagtcgcca ctgccggata tttcgccaga caataagatc 900
 ctgtttattg ccggtcacga caccaatatt gccaatattt ctggcatgct agggatgaca 960
 tggacacttc cgggacagcc cgataacacc ccgccgggtg gggggctggt gtttgaacta 1020
 tggcagaatc cagataacca tcagcaatat gtcgcagtta agatgttcta tcaacaatg 1080
 gatcagttac gaaatagtga aaagttagac ctgaaaagtc atccagccgg tattgttccc 1140
 attgagatcg aaggttgtga gaacatcggg acagacaaac tttgccagct tgataccttc 1200
 caaaagagag tggctcaggt gattgaacct gcatgccata tttaa 1245

<210> 20
 <211> 6729
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> construcción sintética

10 <400> 20

ES 2 553 458 T3

agcttgccgc cgcactcgag caccaccacc accaccactg agatccggct gtaacaaag 60
cccgaaagga agctgagttg gctgctgcc aagctgagca ataactagca taacccttg 120
gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt tgctgaaagg aggaactata tccggattgg 180
cgaatgggac gcgccctgta gcggcgatt aagcgcggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag 240
cgtgaccgct aacttgcca gcgccctagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttcctt 300
tctcgccacg ttcgcccgtt tccccgtca agctctaat cgggggctcc ctttagggtt 360
ccgatttagt gctttacggc acctcgacc caaaaaact gattaggggtg atggttcacg 420

ES 2 553 458 T3

tagtgggcca tgcacctgat agacgggttt tgcacctttg acgttggagt ccacgttctt 480
taatagtgga ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt 540
tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattggtta aaaaatgagc tgatttaaca 600
aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgtttaca atttcaggtg gcacttttcc 660
gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc 720
gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag 780
tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc ttccgtgttt 840
tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt 900
gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga 960
acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat 1020
tgacgccggg caagagcaac tcggtgcgcg catacactat tctcagaatg acttggttga 1080
gtactacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag 1140
tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg 1200
accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg 1260
ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgc 1320
agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg 1380
gcaacaatta atagactgga tggaggcggg taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc 1440
ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggcg 1500
tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgat atcgtagtta tctacacgac 1560
ggggagttag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact 1620
gattaagcat tggttaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa 1680
acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa 1740
aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg 1800
atcttcttga gatccttttt ttctgcgctg aatctgctgc ttgcaaaaca aaaaaccacc 1860
gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac 1920
tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagcctg agttaggcca 1980
ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcctc ctgctaatac tgttaccagt 2040
ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc 2100
ggataaggcg cagcggctcg gctgaacggg gggttcgtgc acacagocca gcttgagcgg 2160
aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc 2220
cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac 2280

ES 2 553 458 T3

gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct 2340
ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc 2400
cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttctc acatgttctt 2460
tcctgcgta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac 2520
cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggagagcgc 2580
cctgatgcgg tattttctcc ttacgcctct gtgcgggtatt tcacaccgca tatatggtgc 2640
actctcagta caatctgctc tgatcccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc 2700
tacgtgactg ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgcctgac 2760
gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca 2820
tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgogag gcagctgcgg taaagctcat 2880
cagcgtggtc gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga 2940
gtttctccag aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgta agggcggttt 3000
tttctgttt ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcag ggggtaatga 3060
taccgatgaa acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgccccgt 3120
tactggaacg ttgtgagggg aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa 3180
tactcaggg tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc 3240
agcagcatcc tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgtgac ttccgcgttt 3300
ccagacttta cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg 3360
ttttgcagca gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag 3420
taaggcaacc ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgac atgcgcacc 3480
gtggggccgc catgcggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgttg gtggcgggac 3540
cagtgacgaa ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacagccga 3600
tcatcgtcgc gctccagcga aagcgtcct cgcgaaaat gaccagagc gctgcccgca 3660
cctgtcctac gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgaog atagtcatgc 3720
cccgcgcca ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatc 3780
ccggtgccta atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc 3840
agtccggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg 3900
gtttgcgtat tgggcgccag ggtggtttt cttttacca gtgagacggg caacagctga 3960
ttgcccttca ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc 4020
agcaggcgaa aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg 4080
gtatcgtcgt atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccga ctcggtaatg 4140
gcgcgcattg cgcacagcgc catctgatcg ttggcaacca gcctcgcagt gggaacgatg 4200

ES 2 553 458 T3

ccctcattca gcatttgcac ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc 4260
 cgttccgcta tcggttgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc 4320
 agacgcgccg agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgcgt gtgacccaat 4380
 gcgaccagat gctccacgcc cagtgcgcta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg 4440
 atgggtgtct ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtgcg ggcagcttcc 4500
 acagcaatgg catcctggtc atccagcggg tagttaatga tcagcccact gacgcggtgc 4560
 gcgagaagat tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcggtc taccatogac 4620
 accaccacgc tggcaccagc ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac 4680
 ggcgcgtgca gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc 4740
 agttgttgtg ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccacgcgcgc ttccactttt 4800
 tcccgcgttt tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa 4860
 gagacaccgg catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg 4920
 aattgactct cttccgggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcogatg 4980
 gtgtccggga tctcagcgtc ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag 5040
 taggttgagg ccgttgagca ccgcccgcgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc 5100
 caacagtccc ccggccacgg ggctgcccac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag 5160
 cccgaagtgg cgagcccgat cttcccacg ggtgatgtcg gcgatatagg cgcagcaac 5220
 cgcacctgtg gcgcccgtga tgcccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc 5280
 gatcccgcga aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct 5340
 ctagaataa ttttgtttaa cttaagaag gagatataca tatgatgaca atctctctgt 5400
 ttaaccgtaa taaaccgctc attgcacagc gtattttatg tctctctgatc gtggctttat 5460
 tctcaggttt accggcatac gccagtgata ccgcccctgc tgggttccag ttggaaaagg 5520
 ttgttatcct aagcagacat gggtacgcgc cgccaaccaa aatgacacaa acgatgcgca 5580
 acgtcacacc tcaccagtgg cctgaatggc cgttaaaact cggctatatac acgcccgcgc 5640
 gtgaacatct gattagcctg atgggcggtt tttatcgaga gcgctttcag caacaaggct 5700
 tattacctaa ggataactgt cctacaccag atgccgtgta tgtttgggca gacgtcgatc 5760
 aacgcacagc taaaaccggc gaggccttct tagcgggtct tgctcccagc tgtgatttag 5820
 cgatccacca tcagcaaaac attcagcagg ccgatccgct gttccatcct gtgaaagccg 5880
 gtatctgttc gatggataaa tcacaggcac acgcccgcgt tgaaaagcag gcaggcacac 5940
 cgattgagac gctcaatcaa cgctatcaag catctttagc gctgatgagt tcggctactcg 6000
 attttccaaa atccccctat tgtcagcagc acaacattgg caaactctgc gatttttccac 6060

ES 2 553 458 T3

aggcgatgcc tagcaggctg gcgataaatg acgacggtaa taaagtggct ctcgaaggctg 6120
 ccgtgggact ttcacgcagc ttggctgaaa ttttctctgt ggaacacgct cagggaatgc 6180
 ctaaagtggc ttgggggaat attcacactg agcagcaatg ggactctctg ttaaaattgc 6240
 ataatgcgca gtttgacttg atgtcggcga cgcctatat cgccaagcat aacggctactc 6300
 cactgctgca aaccatcgca cacgcactgg gttccaatat cgcgagtcgc ccaactgocgg 6360
 atatttcgcc agacaataag atcctgttta ttgccgggtca cgacaccaat attgccaaata 6420
 tttctggcat gctagggatg acatggacac ttccgggaca gcccgataac accccgocgg 6480
 gtggggggct ggtgtttgaa ctatggcaga atccagataa ccatcagcaa tatgtcgcag 6540
 ttaagatggt ctatcaaaca atggatcagt tacgaaatag tgaaaagtta gacctgaaaa 6600
 gtcacccagc cggatttgtt cccattgaga tcgaagggtg tgagaacatc ggtacagaca 6660
 aactttgcca gcttgatacc ttccaaaaga gagtggctca ggtgattgaa cctgcatgcc 6720
 atatttaaa 6729

5 <210> 21
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 21
 ctatggatcc gcatcatcat catcatcaca gtgataccgc ccctgc 46

15 <210> 22
 <211> 6738
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> construcción sintética

<400> 22

gagatataca tatgaaatac ctgctgccga ccgctgctgc tggctctgctg ctccctcgctg 60
 cccagccggc gatggccatg gatatcggaa ttaattcggg tccgcatcat catcatcatc 120
 acagtgatac cgcctctgct gggttccagt tggaaaaggt tggtatccta agcagacatg 180
 gcgtacgcgc gccaaccaaa atgacacaaa cgatgcgcaa cgtcacacct caccagtggc 240
 ctgaatggcc ggtaaaactc ggctatatca cgcctcggcg tgaacatctg attagcctga 300
 tgggocggtt ttatcgagag cgctttcagc aacaaggctt attacctaag gataactgtc 360
 ctacaccaga tgccgtgtat gtttgggcag acgtcgatca acgcacacgt aaaaccggcg 420
 aggccttctt agcgggtctt gctcccagc gtgatttagc gatccaccat cagcaaaaaca 480
 ttcagcaggc cgatccgctg ttccatcctg tgaaagccgg tatctgttcg atggataaat 540

ES 2 553 458 T3

cacaggcaca cgccgccgtt gaaaagcagg caggcacacc gattgagacg ctcaatcaac 600
gctatcaagc atcttttagcg ctgatgagtt cggactcga ttttccaaa tccccctatt 660
gtcagcagca caacattggc aaactctgcg atttttcaca ggcgatgcct agcaggctgg 720
cgataaatga cgacggtaat aaagtggctc tcgaagggtc cgtgggactt tcatcgacgt 780
tggtgaaat tttcctgctg gaacacgctc agggaatgcc taaagtggct tgggggaata 840
ttcacactga gcagcaatgg gactctctgt taaaattgca taatgcgcag tttgacttga 900
tgtcgcgcac gccctatata gcccaagcata acggtactcc actgctgcaa accatcgcac 960
acgcactggg ttccaatata gcgagtcgcc cactgccgga tatttcgcca gacaataaga 1020
tcctgtttat tgccggtcac gacaccaata ttgccaatat ttctggcatg ctagggatga 1080
catggacact tccgggacag cccgataaca ccccgccggg tggggggctg gtgtttgaac 1140
tatggcagaa tccagataac catcagcaat atgtcgcagt taagatgttc tatcaaacia 1200
tggatcagtt acgaaatagt gaaaagttag acctgaaaag tcatccagcc ggtattgttc 1260
ccattgagat cgaaggttgt gagaacatcg gtacagacaa actttgccag cttgatacct 1320
tccaaaagag agtggctcag gtgattgaac ctgcatgcca tatttaaaag cttgcggccg 1380
cactcgagca ccaccaccac caccactgag atccggctgc taacaaagcc cgaaaggaag 1440
ctgagttggc tgctgccacc gctgagcaat aactagcata accccttggg gcctctaac 1500
gggtcttgag gggttttttg ctgaaaggag gaactatata cggattggcg aatgggacgc 1560
gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac 1620
acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttcctttc tcgccacgtt 1680
cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc 1740
tttacggcac ctcgacccca aaaaacttga ttaggggtgat ggttcacgta gtgggccatc 1800
gccctgatag acggtttttc gcccttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact 1860
cttgttccaa actggaacaa cactcaacc tatctcggtc tattcttttg atttataagg 1920
gattttgccg atttcggcct attggttaaa aatgagctg atttaacaaa aatttaacgc 1980
gaattttaac aaaatattaa cgtttacaat ttcaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg 2040
cggaaccct atttgtttat ttttctaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca 2100
ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt 2160
ccgtgtcgc cttattccct tttttgcggc attttgctt cctgtttttg ctccccaga 2220
aacgctggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga 2280
actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat 2340
gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta tccggtattg acgccgggca 2400

ES 2 553 458 T3

agagcaactc ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt 2460
 cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac 2520
 catgagtgat aacctgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct 2580
 aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt ggggaaccgga 2640
 gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgcag caatggcaac 2700
 aacgttgccg aaactattaa ctggcgaact acttactcta gottcccggc aacaattaat 2760
 agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttcggctgg 2820
 ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgggta tcattgcagc 2880
 actggggcca gatggttaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc 2940
 aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt goctcactga ttaagcattg 3000
 gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt gatttaaaac ttcattttta 3060
 atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg 3120
 tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga 3180
 tccctttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcgg 3240
 ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag 3300
 agcgcagata ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa 3360
 ctctgtagca ccgectacat acctcgctct gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag 3420
 tggcgataag tcgtgtctta ccgggttga ctcaagaoga tagttaccgg ataaggcgca 3480
 gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac 3540
 cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aagggagaaa 3600
 ggcggacagg tatccggtaa gcggcaggg cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc 3660
 agggggaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcggggtt cgccacctct gacttgagcg 3720
 tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc 3780
 ctttttacgg ttccctggcct tttgctggcc ttttgcctac atgttctttc ctgcgttacc 3840
 ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcgccag 3900
 ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaagagcgcc tgatgcggta 3960
 ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc acaccgcata tatggtgcac tctcagtaca 4020
 atctgctctg atgccgcata gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg 4080
 tcatggtgce gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc 4140
 tcccggcacc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt 4200
 tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgaggc agctcgggta aagctcatca gcgtggctgt 4260
 gaagcgatcc acagatgtct goctgttcat ccgcgtccag ctogttgagt ttctccagaa 4320

ES 2 553 458 T3

gcgttaatgt ctggcttctg ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tcctgtttgg 4380
 tcactgatgc ctccgtgtaa gggggatttc tgttcatggg ggtaatgata ccgatgaaac 4440
 gagagaggat gctcacgata cgggttactg atgatgaaca tgcccggtta ctggaacgtt 4500
 gtgagggtaa acaactggcg gtatggatgc ggcgggacca gagaaaaatc actcagggtc 4560
 aatgccagcg cttegttaat acagatgtag gtgttccaca gggtagccag cagcatcctg 4620
 cgatgcagat ccggaacata atggtgcagg gcgctgactt ccgctttcc agactttacg 4680
 aaacacggaa accgaagacc attcatgttg ttgctcaggt cgcagacgtt ttgcagcagc 4740
 agtcgcttca cgttcgctcg cgtatcggtg attcattctg ctaaccagta aggcaacccc 4800
 gccagcctag ccgggtcctc aacgacagga gcacgatcat gcgcacccgt ggggccgcca 4860
 tgccggcgat aatggcctgc ttctcgccga aacgtttggt ggcgggacca gtgacgaagg 4920
 cttgagcgag ggcgtgcaag attccgaata ccgcaagcga caggccgatc atcgtcgcgc 4980
 tccagcgaaa gcggtcctcg ccgaaaatga ccagagcgc tgccggcacc tgtcctacga 5040
 gttgcatgat aaagaagaca gtcataagtg cggcgacgat agtcatgcc ccgcgccacc 5100
 ggaaggagct gactgggttg aaggctctca agggcatcgg tcgagatccc ggtgcctaat 5160
 gagtgagcta acttacatta attgcgttg cctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc 5220
 tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg 5280
 ggcgccaggg tggtttttct tttcaccagt gagacgggca acagctgatt gcccttcacc 5340
 gcctggccct gagagagttg cagcaagcgg tccacgctgg tttgccccag caggcgaaaa 5400
 tcctgtttga tggtggttaa cggcgggata taacatgagc tgtcttcggt atcgtcgtat 5460
 cccactaccg agatatccgc accaacgcgc agcccggact cggtaatggc gcgcattgcg 5520
 ccagcgcca tctgatcgtt ggcaaccagc atcgcagtgg gaacgatgcc ctcatcagc 5580
 atttgcattg tttgttgaaa accggacatg gcactccagt cgccttcccg ttccgctatc 5640
 ggctgaattt gattgcgagt gagatattta tgccagccag ccagacgcag acgcgccgag 5700
 acagaactta atgggcccgc taacagcgcg atttgcgtgt gacccaatgc gaccagatgc 5760
 tccacgcca gtcgcgtacc gtcttcatgg gagaaaataa tactgttgat ggggtgtctg 5820
 tcagagacat caagaaataa cgcgggaaca ttagtgcagg cagcttccac agcaatggca 5880
 tcctggtcat ccagcggata gttaatgatc agcccactga cgcgttgccg gagaagattg 5940
 tgcaccgccg ctttacaggc ttcgacgccg cttcgttcta ccatcgacac caccacgctg 6000
 gcaccagtt gatcggcgcg agatttaatc gccgcgacaa tttgcgacgg cgcgtgcagg 6060
 gccagactgg aggtggcaac gccaatcagc aacgactgtt tgcccgcag ttgttgtgcc 6120
 acgcggttg gaatgtaatt cagctccgcc atcgcgcgtt ccactttttc ccgcgttttc 6180

ES 2 553 458 T3

gcagaaacgt ggctggcctg gttcaccacg cgggaaacgg tctgataaga gacaccggca 6240
 tactctgoga catcgtataa cgttactggt ttcacattca ccacocctgaa ttgactctct 6300
 tccgggcgct atcatgccat accgcgaaag gttttgcgcc attcgatggt gtccgggatc 6360
 tcgacgctct ccottatgcg actcctgcat taggaagcag ccagtagta ggttgaggcc 6420
 gttgagcacc gccgccgcaa ggaatggtgc atgcaaggag atggcgccca acagtcccc 6480
 ggccacgggg cctgccacca taccacgccc gaaacaagcg ctcatgagcc cgaagtggcg 6540
 agcccgatct tcccacatcg tgatgtcggc gatataggcg ccagcaaccg cacctgtggc 6600
 gccggtgatg ccggccacga tgcgtccggc gtagaggatc gagatctcga tcccgcgaaa 6660
 ttaatacgc tcaactatag ggaattgtga gcggataaca attcccctct agaaataatt 6720
 ttgtttaact ttaagaag 6738

<210> 23
 <211> 10331
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> construcción sintética

10

<400> 23

aagcttgcat gagcatgtca cagtogaatt ctgggggtcac gcggtgcttg agggcgaata 60
 cggctccatc ggtgagtaac ctctctctta ctaccacgga aacatcactg acgtaaccag 120
 gaccocggcgg cttatccatc atgggaaaca acacctaca atccgccaga attctctcgg 180
 aagaatataa cctctactac tccgtctggt gcgacggtga ccacgagctg tacgatctct 240
 cagtaagtgc caaccggttc cggccactat cgtaaaaaca aaaaatctaa caacaccaga 300
 cggacccta ccaaatgaac aacatctaca cccaacaaga caacatccac ctcttaagca 360
 gacctctatc cagcgtgatt gatcgtatcg acgctctcct tctggttctg aaatcctgca 420
 aggtaaacac atgcatccag ccgtggcggg tctccacccc cgacgggtcc gtagagagcc 480
 tcaaagatgc actgcaggtg aaatacagatt ccttttacac caaccagccc aagggtgctg 540
 attcagtatg tgaaccocggg tacatcattg aggctgaggg gccccaggtc ggattgcagt 600
 atagagatgg gctgagttgg gaggcgtgga cttgacgatt ccgtcaagta tgagtatggg 660
 tacgaataat gagcgttatt gctatgtatt tttatagata gtttatttat atatcatgac 720
 taaacttgag agccatggaa tcaatgaaat gacatggcga gtgtagatca cgatagtcac 780
 agtagccgaa gtgggcggat agccaagaat aacaccagaa tcagataaca ggaacatcac 840
 aaccgatcac accatagata atatccaaag aagtttaaat agccgagaca aagagaatag 900
 agacaagata catggaacaa gaaaggtaca cccggtagat aaaccctggg acgggcccga 960
 gtccttacc atagatcaat cccacgggaa caaaaccaa gtcaacaacc accaccacca 1020

ES 2 553 458 T3

ttaccacaac cgcacata gaaccggtga aaaatgacac catcgaatcc ttcaccetaa 1080
 gtaaagccct gtacggtgca tategcttaa gcacaaaagt agtagaatag atatgagccc 1140
 gcacgcgcgg ccaacgatcc aaactagccc tgacatcaaa gccagcggcg attgagccat 1200
 caagcccccg tctcacttca tagtgggaatt gcgggtcacc tcaactgatt actgtctgtc 1260
 tagacacact caccacagca tgctgtctgt gcccagaacg tggactttgg ctctgccgag 1320
 ctagaggatc aatataagt agattggatg taggcccgtg tttttttat ttcgtgtgac 1380
 tcggagattt tatgcggtgt gttggtgggc ggaaaaagaa atatacttc tttttgtct 1440
 tttcttttcc tctctattgc ttgccttggg tatcccttgc atacggcggg ttgctgattg 1500
 actaagggtg ctgtcttgtg tcaactgaact gctgctcaac ctctgtctgg tattcctgtt 1560
 gtcgtgatgg tggggaaaca gttcgagttc gaggaccaga gggatggcat cgtgcctccc 1620
 ttggaggaaa agaaggctgt cgatgaggtc tataccgata atgatgttc gtcggaggag 1680
 attgtcaagg actgggatga taaggaggag ggcaagctgc ggaggaagt agtcgtcact 1740
 gtttccattc actgccatat aggttcaagc atatactgac tggatatag gatcgatc 1800
 atcctcatcc ccattctcgc tctcgtttc ttggcctcc agattgatcg cggcaatc 1860
 agcgcagctc ttacctccac taccacgaa gaactaggtg tcaccacgaa ccaaatcaat 1920
 attggaacct agttgcttcc ggctggtatt gtcacaccg agatcccgc aatattata 1980
 cttcagcga tcgggtccca ggtctggtg tcggcacagc tgatcgttg gggctctggt 2040
 ggcacattcc aggttttgt acagtcgtac ccggcgtatc tggccacgag gttggtgctg 2100
 gggctgttg agggagggtt tattcctggt ttgtctggtc gtgcgccttg gtctatggtg 2160
 gtagcgttaa caatgggtt ggtacaggtg cctgtacta tctctcgaca tggataaac 2220
 gtcctgagac gagtttccgg accactctgt tctctatgg gcagatggt gccgggtcga 2280
 cctcgagcgg ccgcttcgag gattgcctga acattgacat tcggcgtccg gccgggacca 2340
 ccgaggactc gaagctgcct gtgctggtct ggatcttgg cggaggctt gaacttggt 2400
 caaaggcgat gtatgatgtt acaacgatg tatcatcgt gatagacaag aacatgccta 2460
 tcgtgtttgt agcaatgaat tatcgcgtgg gaggttccg gttcttgccc ggaaaggaga 2520
 tcctggagga cgggtccgag aacctagggc tcctggacca acgccttgcc ctgcagtggg 2580
 ttgcccacaa catcgaggcc tttggtggag acccggacaa ggtgacgatt tggggagaat 2640
 cagcaggagc catttccgtt tttgatcaga tgatcttga cgacggaaac atcaactaca 2700
 aggataagcc cttgttccgg gggccatca tggactccgg tagtgttgt cccgcagacc 2760
 ccgtcgatgg ggtcaaggga cagcaagtat atgatcgggt agtggaatct gcaggctgtt 2820
 cctcttctaa cgacacccta gcttgtctgc gtgaactaga ctacaccgac ttcctcaatg 2880

ES 2 553 458 T3

cggcaaactc cgtgccaggc attttaagct accattctgt ggcggtatca tatgtgcctc 2940
 gaccggacgg gacggcgttg tcggcatcac cggacgtttt gggcaaagca gggaaatatg 3000
 ctgggtccc gttcatcgtg ggcgaccaag aggatgaggg gacottatte gccttgtttc 3060
 agtccaacat tacgacgac gacgaggtgg togactacct ggcctcatac ttcttctatg 3120
 acgctagccg agagcagctt gaagaactag tggccctgta cccagacacc accacgtacg 3180
 ggtctccgtt caggacaggc gcggccaaca actggtatcc gcaatttaag cgattggccg 3240
 ccattctcgg cgacttggtc ttcaccatta cccggcgggc attcctctcg tatgcagagg 3300
 aaatctcccc tgatottcog aactggtcgt acctggcgac ctatgactat ggcaccccag 3360
 ttctggggac ctccacgga agtgacctgc tgcaggtggt ctatgggatc aagccaaact 3420
 atgcagctag ttctagccac acgtactatc tgagctttgt gtatacgtg gatccgaact 3480
 ccaaccgggg ggagtacatt gagtggccgc agtgaagga atcgcggcag ttgatgaatt 3540
 tcggagcgaa cgacgccagt ctcttacgg atgatttccg caacgggaca tatgagttca 3600
 tcctgcagaa taccgcccgg ttccacatct gatgccattg gcccgggggt ccggacggtc 3660
 aggaacttag ccttatgaga tgaatgatgg acgtgtctgg cctcggaaaa ggatatatgg 3720
 ggatcatgat agtactagcc atattaatga agggcatata ccacgcgttg gacctgcgtt 3780
 atagcttccc gttagttata gtaccatcgt tataccagcc aatcaagtca ccacgcacga 3840
 cgggggacgg cgaatccccg ggaattgaaa gaaattgcat cccaggccag tgaggccagc 3900
 gattggccac ctctccaagg cacagggcca ttctgcagcg ctggtggatt catcgcaatt 3960
 tccccggcc cggcccgaca ccgctatagg ctggttctcc cacaccatcg gagattcgtc 4020
 gcctaattgc tcgtccgttc acaagctgaa gagcttgaag tggcgagatg tctctgcagg 4080
 aattcaagct agatgctaag cgatattgca tggcaatatg tgttgatgca tgtgcttctt 4140
 ccttcagctt ccctcgtgc agatgaggtt tggctataaa ttgaagtggg tggtcggggg 4200
 tccgtgaggg gctgaagtgc ttctccctt ttagacgcaa ctgagagcct gagcttcac 4260
 cccagcatca ttacacctca gcaatgggcg tctctgctgt tctacttctt ttgtatctcc 4320
 tgtctgggta tgctaagcac cacaatcaaa gtctaataag gaccctcct tccgagggcc 4380
 cctgaagctc ggactgtgtg ggactactga tcgctgacta tctgtgcaga gtcacctccg 4440
 gactggcagt cccagtgat accgcccctg ctgggttcca gttggaaaag gttgttatcc 4500
 taagcagaca tggcgtacgc gcgccaacca aatgacaca aacgatgccc aacgtcacac 4560
 ctaccagtg gcctgaatgg ccggtaaaac tcggctatat cacgccccgc ggtgaacatc 4620
 tgattagcct gatgggcggg ttttatcgag agcgtttca gcaacaaggc ttattaccta 4680
 aggataactg tctacacca gatgcctgt atgtttgggc agacgtcgat caacgcacac 4740
 gtaaaaccgg cgaggccttc ttagcgggtc ttgctcccca gtgtgattta gcgatccacc 4800

ES 2 553 458 T3

atcagcaaaa cattcagcag gccgatccgc tgttccatcc tgtgaaagcc ggtatctggt 4860
 ogatggataa atcacaggca cacgccgccg ttgaaaagca ggcaggcaca ccgattgaga 4920
 cgctcaatca acgctatcaa gcactcttag cgctgatgag ttcgggtactc gattttccaa 4980
 aatcccccta ttgtcagcag cacaacattg gcaaaactctg cgatttttca caggcgatgc 5040
 ctagcaggct ggcgataaat gacgacggta ataaagtggc tctcgaaggt gccgtgggac 5100
 tttcatcgac gttggctgaa attttctctg tggaacacgc tcagggaatg cctaaagtgg 5160
 cttgggggaa tattcacact gagcagcaat gggactctct gttaaattg cataatgcgc 5220
 agtttgactt gatgtcgcgc acgccctata tcgccaaagca taacggtaact ccaactgctgc 5280
 aaaccatcgc acacgcactg ggttccaata tcgcgagtcg cccactgccg gatatttcgc 5340
 cagacaataa gatcctggtt attgccggtc acgacaccaa tattgccaat atttctggca 5400
 tgctagggat gacatggaca cttccgggac agcccgataa caccocgccg ggtggggggc 5460
 tgggtgttga actatggcag aatccagata accatcagca atatgtcgca gttaagatgt 5520
 tctatcaaac aatggatcag ttacgaaata gtgaaaagt agacctgaaa agtcatccag 5580
 ccggtattgt tcccattgag atcgaagggt gtgagaacat cggtagacagac aaactttgcc 5640
 agcttgatac cttccaaaag agagtggctc aggtgattga acctgcatgc catatttaga 5700
 caatcaatcc atttcgctat agttaagga tggggatgag ggcaattggt tataatgatca 5760
 tgtatgtagt ggggtgtgat aatagtagtg aatggaagc caagtcatgt gattgtaatc 5820
 gaccgacgga attgaggata tccggaata cagacaccgt gaaagccatg gtctttcctt 5880
 cgtgtagaag accagacaga cagtccctga tttaccctgc acaaagcact agaaaattag 5940
 cattccatcc ttctctgctt gctctgctga taccactgtc attcaatgca tagccatgag 6000
 ctcatcttag atccaagcac gtaattccat agccgaggtc cacagtggag cagcaacatt 6060
 ccccatcatt gctttcccca ggggcctccc aacgactaaa tcaagagtat atctctaccg 6120
 tccaatagat cgtcttcgct tcaaatctt tgacaattcc aagagggtcc ccatccatca 6180
 aaccagttc aataatagcc gagatgcatg gtggagtcaa ttaggcagta ttgctggaat 6240
 gtcggggcca gttccgggtg gtcattggcc gcctgtgatg ccatctgcca ctaaatecca 6300
 tcattgatcc accgcccacg agggcgtctt tgctttttgc gcggcgtcca ggttcaactc 6360
 tctctgcagc tccagtccaa cgctgactga ctagtacc tactggtctg atcggctcca 6420
 tcagagctat ggcgttatcc cgtgccgttg ctgcgcaatc gctatcttga tcgcaacott 6480
 gaactcactc ttgttttaat agtgatcttg gtgacggagt gtcggtgagt gacaaccaac 6540
 atcgtgcaag ggagattgat acggaattgt cgctccatc atgatgttct tgccggcttt 6600
 gttggcccta ttcgtgggat cgatgccctc ctgtgcagca gcagggtactg ctggatgagg 6660

ES 2 553 458 T3

agccatcggc ctctgcacgc aaacccaact tctcttcat tctcacggat gatcaggatc 6720
 tccggatgaa ttctccggcg tatatgccgt atacgcaggc gagaatcaag gaaaagggtg 6780
 ccgagttctt gaaccatttc gtcactaccg cgctttgctg tccgtcgcgc gtgagtcttt 6840
 ggacgggaag acaggctcat aataactaatg tgacggatgt gaaccgcct tatgggatgg 6900
 aactgcttc gatcggctctt gattcttcag cgtggttaca attgctaag oggcataggc 6960
 ggatacccca aattcgtcgc tcaaggcttc aacgaaaact tcttccccgt ttggctgcag 7020
 tccgccggtt acaataccta ctacacgggg aagctgttca actcgcacag tgtcgtacc 7080
 tataacgcgc cctttgtgaa cggtttcaat ggctccgact tcttctcga cccccacaca 7140
 tattctact ggaatgacac ataccagcga aaccatgagc ctccgcggag ttacgagggg 7200
 caatatacta cggatgtgat gaaggagaag gcatcgggat tgttggcaga tgcgctggac 7260
 agtgacgcgc cattcttctt gacggtcgcg ccgatcgcac cgcacacgaa catcgtatgt 7320
 gaggggctga gcggtgcggg tggaccgaag atgacagagc cgctgcctgc accgagacat 7380
 ggcattttgt ttgctgatgc aaaggtgccg cggacgccta atttcaatcc ggacaagggtg 7440
 tgtgatatcc tgacacagtg gtggggacgg gcaactgaca gagtaggatt ctggtgcggg 7500
 gtggatccaa accatggaac tacagaacca gaccgtcatc gactacgaag accatcttta 7560
 tggccagcgt ctgcgcactt tgcaagccgt cgatgagatg gtggatgcgc tgatcacgca 7620
 gctggaagaa agtgggcaga tgcacaatac ctacatcatt tacagtgtctg ataacggcta 7680
 ccacattggc catcaccgtc tcccccccg caagacaact ggctatgaag aggacattcg 7740
 cgtaccattc tacattcgcg gacctggcat tcttgagggg aagagcgttg accgtgtaac 7800
 cacgcacatt gacattgcac ctacactgtt cgagttggct ggggttccct tgcgagagga 7860
 ctttgacggg actccgatgc ccgtgtcgc tagcaagaag acccagtcaa gcttgcacgc 7920
 ctgcaggtcg actctagagg atctgccggt ctccctatag tgagtctgtat taatttcgat 7980
 aagccaggtt aacctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 8040
 tgggcgctct tccgcttctt cgctcactga ctccgtcgc tccgtcgttc ggctgcggcg 8100
 agcggatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 8160
 aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt 8220
 gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 8280
 tcagaggtgg cgaaaccoga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 8340
 cctcgtcgc tctcctgttc cgacctgac gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc 8400
 ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagg 8460
 cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccggtt cagcccgacc gctgcgcctt 8520
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 8580

ES 2 553 458 T3

agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 8640
 gtgggtggcct aactacggct acactagaag gacagtatct ggtatctgcg ctctgctgaa 8700
 gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg 8760
 tagcgggtggt ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga 8820
 agatcctttg atcttttcta cggggctctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg 8880
 gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg 8940
 aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt 9000
 aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgcctgact 9060
 ccccgctgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat 9120
 gataccgcga gaccacgct cacgggtctc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 9180
 aagggccgag cgcagaagtg gtcttgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 9240
 ttgcccggaa gctagagtaa gtagttogcc agttaatagt ttgcgcaacg ttggtgccat 9300
 tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggctc 9360
 ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttctgc aaaaaagcgg ttagctcctt 9420
 cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc 9480
 agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga 9540
 gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcccoga ccgagttgct cttgccccggc 9600
 gtcaatacgg gataataaccg cgcacatag cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa 9660
 acgttcttct gggcgaaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcagatga 9720
 acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 9780
 agcaaaaaaca ggaaggcaaa atgcccgaaa aaaggaata agggcgacac ggaaatggtg 9840
 aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 9900
 gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt 9960
 tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 10020
 aatagggct atcacgaggc cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct 10080
 ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg cggggagcag 10140
 acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc 10200
 ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca ccatatggac atattgtcgt tagaacgcgg 10260
 ctacaattaa tacataacct tatgtatcat acacatacga tttaggtgac actatagaac 10320
 tcgagcagct g 10331

<211> 414
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 553 458 T3

<220>

<223> construcción sintética

<400> 24

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

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

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

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

Arg Glu Arg Phe Gln Gln Gln Gly Leu Leu Pro Lys Asp Asn Cys Pro
65 70 75 80

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

Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Asp Leu
100 105 110

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

Pro Val Lys Ala Gly Ile Cys Ser Met Asn Lys Ser Gln Thr Tyr Glu
130 135 140

Ala Val Glu Lys Gln Ala Gly Gly Pro Ile Glu Thr Leu Asn Gln Arg
145 150 155 160

Tyr Gln Ala Glu Leu Ala Leu Met Ser Ser Val Leu Asp Phe Pro Lys
165 170 175

Ser Pro Tyr Cys Gln Gln His Asn Ile Gly Lys Leu Cys Asp Phe Ser
180 185 190

Gln Ala Met Pro Ser Arg Leu Asn Ile Ser Asp Asp Gly Asn Glu Val
195 200 205

Gln Leu Glu Gly Ala Val Gly Leu Gly Ser Thr Leu Ala Glu Ile Phe
210 215 220

ES 2 553 458 T3

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

<210> 25
 <211> 1245
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> gen sintético adaptado para el uso de codones de *Aspergillus niger*

<400> 25

agcgataccg cccccgcggg cttccagctg gagaaggtgg tcattctctc gcgtcacggt 60
 gtccgagccc ccaccaagat gacacagacg atgcgcgatg tcactccaca tcagtggcct 120

ES 2 553 458 T3

gagtggcccg tgaagctcgg ctacatcaact cctcgtggag aacacctcat cagcctgatg 180
 ggcgggtttct ataggaacg gttccagcag cagggattgc ttoccaagga caactgtccg 240
 acccccgacg cegtctacgt gtggaccgac gttaaccagc gtaccgcaa gactggagag 300
 gctttcctcg cgggtcttgc gcctcagtgt gatctggcca tccaccacca gcagaacatc 360
 acgcaggctg acccgctggt tcacccggtc aaggccggtta tctgttcgat gaacaagtct 420
 cagacctatg aggctgtcga gaagcaggct ggcggcccta ttgagacgct aaaccagcgc 480
 taccaggccg aactggcatt gatgtcctct gtgttgatt tcccaagtc cccatattgc 540
 cagcagcata acatcgcaa actgtgogac ttttcacagg ctatgcctag ccgcctcaac 600
 atctccgatg acgggaatga ggtgcaactc gaaggcgcg tgggtcttgg ttccacgctc 660
 gccgagatct tcctactgga atacgctcag ggtatgcctg tggtcgcctg gggcaacatt 720
 cacaacgaga gccagtggaa gagcctcctt aacttgaca acgcccattt caacctgatg 780
 cacagaacgc cctacattgc caagcaccag ggaaccctt tacttcaggc tatcagcaac 840
 gctctcaacc caaatgcaac tgagtcgaag ctccccgata tctctccga caacaagatc 900
 cttttcattg cgggccacga caccaacatc gcaaacatcg gaggcattgt ggggatgaac 960
 tggactctcc cgggccagcc agacaatact ccgcccggcg gtggactggt ttctgaactc 1020
 tggcagaacc cggataacca tcagcagtac gttgcggtga agatgatcta ccagaccatg 1080
 gaccagctgc gcaattccga gaagctggac ttgaagagca acctgctgg gatcgtcccc 1140
 attgagatcg aaggttcga gaacatcgtt accgacaagc tgtgccagct ggatactttt 1200
 cagaagcgtg ttgccaggt cattgagccc gcgtgccaaa totaa 1245

<210> 26
 <211> 10331
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> construcción sintética

10

<400> 26

ES 2 553 458 T3

aagcttgcat	gagcatgtca	cagtcgaatt	ctggggtcac	gcggtgcttg	agggcgaata	60
cggctccatc	ggtgagtaac	ctctctctta	ctaccacgga	aacatcactg	acgtaaccag	120
gaccogggcg	cttatccatc	atgggaaaca	acacctacaa	atccgccaga	attctctcgg	180
aagaatataa	cctctactac	tccgtctggg	gcgacgggga	ccacgagctg	tacgatctct	240
cagtaagtgc	caaccgggtc	cggccactat	cgtaaaaaaca	aaaaatctaa	caacaccaga	300
cggaccocct	ccaaatgaac	aacatctaca	ccaacaaga	caacatccac	ctcctaagca	360
gacctctatc	cagcgtgatt	gatcgtatcg	acgctctcct	tctggttctg	aatcctgca	420
agggtaacac	atgcatccag	cgtggggggg	tcctccaccc	cgacgggtcc	gtagagagcc	480

ES 2 553 458 T3

tcaaagatgc actgcaggtg aaatacgatt ccttttacac caaccagccc aaggtgtcgt 540
attcagtatg tgaacccggg tacatcattg aggctgaggg gcccaggtc ggattgcagt 600
atagagatgg gctgagttgg gaggcgtgga cttgacgatt ccgtcaagta tgagtatggg 660
tacgaataat gagcgttatt gctatgtatt tttatagata gtttatttat atatcatgac 720
taaacttgag agccatggaa tcaatgaaat gacatggcga gtgtagatca cgatagtcac 780
agtagccgaa gtgggaggat agccaagaat aacaccagaa tcagataaca ggaacatcac 840
aaccgatcac accatagata atatccaag aagtttaaat agccgagaca aagagaatag 900
agacaagata catggaacaa gaaaggtaca cccggtagat aaaccctggg acgggccccga 960
gtccttacc c atagatcaat cccacgggaa caaaaccaa gtcaacaacc accaccacca 1020
ttaccacaac cgcacataa gaaccggtga aaaatgacac catcgaatcc ttcaccctaa 1080
gtaaagccct gtacgttgca tatcgcttaa gcacaaaagt agtagaatag atatgagccc 1140
gcacgcgagg ccaacgatcc aaactagccc tgacatcaa gccagcggcg attgcgccat 1200
caagcccccg tctcacttca tagtgggaatt gggggtcacc tcaactgatt actgtctgtc 1260
tagacacact cacccacgca tgctgtctgt gccagaacg tggactttgg ctctgcgag 1320
ctagaggatc aatatataagt agattggatg taggcccgtg tttttttat ttcgtgtgac 1380
tcggagatth tatgcgttgt gttggtgggc ggaaaaagaa atatacttc ttttgttct 1440
tttcttttct tctctattgc ttgccttggg tatcccttgc atacggtcgg ttgctgattg 1500
actaagggtg ctgtcttgtg tcaactgaact gctgctcaac ctctgtctgg tattcctgtt 1560
gtcgtgatgg tggggaacaa gttcgagttc gaggaccaga gggatggcat cgtgcctccc 1620
ttggaggaaa agaaggtcgt cgatgaggtc tataccgata atgatgttgc gtcggaggag 1680
attgtcaagg actgggatga taaggaggag ggcaagctgc ggaggaagtg agtcgtcact 1740
gttttcattc actgccatat aggttcaagc atatactgac tggatatag gatcgatc 1800
atcctcatcc ccattctcgc tctcgtttc ttcggcctcc agattgatcg cggcaatc 1860
agcgcagctc ttacctccac tatcaccgaa gacctaggtg tcaccacgaa ccaaatcaat 1920
attggaacc agttgcttcc ggctggtatt gtcacaccg agatcccgtc aatatattata 1980
cttcagcgca tcggteccca ggtctggttgc tcggcacagc tgatcgcttg gggctctggtt 2040
ggcacattcc aggtctttgt acagtcgtac cggcgtatc tggccacgag gttgttgc 2100
gggctgttgg agggagggtt tattcctggt ttgtctggtc gtgcgccttg gtctatggtg 2160
gtagcgctaa caatgggtt ggtacaggtc ccctgtacta tctctcgaca tggataaac 2220
gtcctgagac gagtttccgg accactctgt tcttctatgg gcagatgtt gccgggtcga 2280
cctcgagcgg ccgcttcgag gattgcctga acattgacat tcggcgtccg gccgggacca 2340

ES 2 553 458 T3

ccgcggaactc gaagctgcct gtgctggctt ggatctttgg cggaggcttt gaacttgggt 2400
 caaaggcgat gtatgatggt acaacgatgg tatcatcgtc gatagacaag aacatgccta 2460
 tcgtgtttgt agcaatgaat tatcgcgtgg gaggtttcgg gttcttgccc ggaaaggaga 2520
 tcctggagga cgggtccgcy aacctagggc tcctggacca acgccttgcc ctgcagtggy 2580
 ttgccgacaa catcgaggcc tttggtggag acccggacaa ggtgacgatt tggggagaat 2640
 cagcaggagc catttccggt tttgatcaga tgatcttgta cgacggaaac atcaactaca 2700
 aggataagcc cttgttccgg ggggccatca tggactccgg tagtgttggt cccgcagacc 2760
 ccgtcgatgg ggtcaaggga cagcaagtat atgatgcggt agtggaatct gcaggctggt 2820
 cctcttctaa cgacacccta gcttgtctgc gtgaaactaga ctacaccgac ttcttcaatg 2880
 cggcaaactc cgtgccaggc attttaagct accattctgt ggcgttatca tatgtgcctc 2940
 gaccggacgg gacggcgttg tcggcatcac cggacgtttt gggcaaagca gggaaatatg 3000
 ctcggtccc gttcatcgtg ggggaccaag aggatgaggg gacctattc gccttgtttc 3060
 agtccaacat tacgacgac gacgaggtgg tcgactacct ggcctcatac ttcttctatg 3120
 acgctagccg agagcagctt gaagaactag tggccctgta cccagacacc accacgtacg 3180
 ggtctccggt caggacaggc gcggccaaca actggtatcc gcaatttaag cgattggccg 3240
 ccattctcgg cgacttggtc ttcaccatta cccggcgggc attcctctcg tatgcagagg 3300
 aaatctcccc tgatcttccg aactggctgt acctggcgac ctatgactat ggcaccccag 3360
 ttctggggac cttccacgga agtgacctgc tgcaggtggt ctatgggatc aagccaaact 3420
 atgcagctag ttctagccac acgtactatc tgagctttgt gtatacgctg gatccgaact 3480
 ccaaccgggg ggagtacatt gagtggccgc agtggaaagga atcgcggcag ttgatgaatt 3540
 tcggagcgaa cgacgccagt ctccctacgg atgatttccg caacgggaca tatgagttca 3600
 tcctgcagaa taccgcggcy ttcacatct gatgccattg gcggaggggt ccggacggtc 3660
 aggaacttag ccttatgaga tgaatgatgg acgtgtctgg cctcggaaa ggatatatgg 3720
 ggatcatgat agtactagcc atattaatga agggcatata ccacgcgttg gacctgcgtt 3780
 atagcttccc gttagttata gtaccatcgt tataccagcc aatcaagtca ccacgcacga 3840
 ccggggacgg ogaatccccg ggaattgaaa gaaattgcat cccaggccag tgaggccagc 3900
 gattggccac ctctccaagg cacagggcca ttctgcagcg ctggtggatt catcgcaatt 3960
 tccccggcc cggcccgaca ccgctatagg ctggttctcc cacaccatcg gagattcgtc 4020
 gcctaattgc tcgtccgttc acaagctgaa gagcttgaag tggcgagatg tctctgcagg 4080
 aattcaagct agatgctaag cgatattgca tggcaatatg tgttgatgca tgtgcttctt 4140
 ccttcagctt cccctcgtgc agatgaggtt tggctataaa ttgaagtggg tggtcggggg 4200
 tcctgaggg gctgaagtgc ttctccctt ttagacgcaa ctgagagcct gagcttcatc 4260

cccagcatca ttacacctca gcaatgggog tctctgtgtg tctacttcoct ttgtatctcc 4320
 tgtctgggta tgctaagcac cacaatcaaa gtctaataag gacctccct tccgagggcc 4380
 cctgaagctc ggactgtgtg ggactactga tggctgacta tctgtgcaga gtcacctccg 4440
 gactggcagt cccagcgat accgcccccg cgggcttcca gctggagaag gtggctattc 4500
 tctcgcgtca cgggtgtccga gccccacca agatgacaca gacgatgccc gatgtcactc 4560
 cacatcagtg gcctgagtgg cccgtgaagc tgggtacat cactcctcgt ggagaacacc 4620
 tcatcagcct gatgggcggt ttctataggg aacggttcca gcagcagga ttgcttccca 4680
 aggacaactg tccgaccccc gacgccgtct acgtgtggac cgacgttaac cagcgtaccc 4740
 gcaagactgg agaggctttc ctgcgccgtc ttgcgcctca gtgtgatctg gccatccacc 4800
 accagcagaa catcacgcag gtgcaccccg tgtttcaccg ggtcaaggcc ggtatctggt 4860
 cgatgaacaa gtctcagacc tatgaggctg tgcagaagca ggctggcggc cctattgaga 4920
 cgctaaacca ggcctaccag gccgaactgg cattgatgtc ctctgtgttg gatttcccca 4980
 agtccccata ttgccagcag cataacatcg gcaaactgtg cgacttttca caggctatgc 5040
 ctagccgcct caacatctcc gatgacggga atgagggtgca actcgaaggc gccgtcggtc 5100
 ttggttccac gctcgcgag atcttctac tggaaatcgc tcagggtatg cctgtggtcg 5160
 cctggggcaa cattcacaac gagagccagt ggaagagcct ccttaacttg cacaacgccc 5220
 atttcaacct gatgcacaga acgccctaca ttgccaaagca ccagggaacc cctttacttc 5280
 aggctatcag caacgctctc aacccaaatg caactgagtc gaagctcccc gatatctctc 5340
 ccgacaacaa gatccttttc attgccggcc acgacaccaa catcgcaaac atcggaggca 5400
 tgttgggtat gaactggact ctccgggcc agccagacaa tactccgcc gccggtggac 5460
 tggttttcga actctggcag aacccygata accatcagca gtaogttgcg gtgaagatga 5520
 tctaccagac catggaccag ctgcgcaatt ccgagaagct ggacttgaag agcaaccctg 5580
 ctgggatcgt cccattgag atcgaaggtt gcgagaacat cggtaaccgac aagctgtgcc 5640
 agctggatac ttttcagaag cgtgttgccc aggtcattga gcccgctgc caaatctaaa 5700
 caatcaatcc atttcgctat agttaaagga tggggatgag ggcaattggt tatatgatca 5760
 tgtatgtagt ggggtgtcat aatagtagtg aatggaagc caagtcatgt gattgtaatc 5820
 gaccgacgga attgaggata tccgaaata cagacaccgt gaaagccatg gtctttcctt 5880
 cgtgtagaag accagacaga cagtccctga tttaccctgc acaaagcact agaaaattag 5940
 cattccatcc ttctctgctt gctctgctga tatcactgtc attcaatgca tagccatgag 6000
 ctcatcttag atccaagcac gtaattccat agccgaggtc cacagtggag cagcaacatt 6060
 ccccatcatt gctttcccca ggggcctccc aacgactaaa tcaagagtat atctctaccg 6120

tccaatagat cgtcttcgct tcaaaatcct tgacaattcc aagagggtcc ccatccatca 6180
 aaccagttc aataatagcc gagatgcatg gtggagtcaa ttaggcagta ttgctggaat 6240
 gtgggggcca gttccgggtg gtcattggcc gcctgtgatg ccatctgcca ctaaattcga 6300
 tcattgatcc accgcccacg agggcgtcct tgctttttgc gggcgtcca ggttcaactc 6360
 tctctgcagc tccagtccaa cgctgactga ctagtttacc tactggtctg atcggctcca 6420
 tcagagctat ggcgttatcc cgtgccgttg ctgcgcaatc gctatcttga tcgcaacctt 6480
 gaactcactc ttgttttaat agtgatcttg gtgacggagt gtcggtgagt gacaaccaac 6540
 atcgtgcaag ggagattgat acggaattgt cgctcccac c atgatgttct tgccggcttt 6600
 gttggcccta ttcgtgggat cgatgcctc ctgtgcagca gcaggactg ctggatgagg 6660
 agccatcggc ctctgcacgc aaaccaact tcctcttcat tctcacggat gatcaggatc 6720
 tccggatgaa ttctccggcg tatatgccgt ataccgagc gagaatcaag gaaaagggtg 6780
 ccgagttctt gaaccatttc gtcactaccg cgctttgctg tccgtcgcgc gtgagtcttt 6840
 ggacgggaag acaggctcat aataactaatg tgacggatgt gaaccgcct tatggtatgg 6900
 aactgcttc gatcggctt gattcttcag cgtggttaca attgctaag cggcataggc 6960
 ggatacccca aattcgtcgc tcaaggcttc aacgaaaact tcccccgt ttggctgcag 7020
 tccgccggtt acaataccta ctacacgggg aagctgttca actcgcacag tgtcgtctacc 7080
 tataacggc cctttgtgaa cggtttcaat ggtccgact tccctctcga cccccacaca 7140
 tattcctact ggaatgcgac ataccagcga aaccatgagc ctccgcggag ttacgagga 7200
 caatatacta cggatgtgat gaaggagaag gcacatggat tgttggcaga tgcgctggac 7260
 agtgacgcgc cattcttcct gacggtcgcg ccgatcgcac cgcacacgaa catcgatgtg 7320
 gaggggctga gcggtgcggg tggaccgaag atgacagagc cgctgcctgc accgagacat 7380
 gcgcatttgt ttgctgatgc aaagggtccg cggacgccta atttcaatcc ggacaagggtg 7440
 tgtgatatcc tgacacagtg gtggggacgg gcaactgaaa gaggtaggatt ctggtgcggg 7500
 gtggatccaa accatggaac tacagaacca gaccgtcatc gactacgaag accatcttta 7560
 tcgccagcgt ctgcgcactt tgcaagccgt cgatgagatg gtggatgcgc tgatcacgca 7620
 gctggaagaa agtgggcaga tcgacaatac ctacatcatt tacagtgctg ataacggcta 7680
 ccacattggc catcacctgc tacccccgg caagacaact ggctatgaag aggacattcg 7740
 cgtaccattc tacattcgcg gacctggcat tcctgagggg aagagcgttg accgtgtaac 7800
 cagcacatt gacattgcac ctacactgtt cgagttggct ggggttcctt tgcgagagga 7860
 ctttgacggg actccgatgc ccgtgtgcac tagcaagaag acccagtcaa gcttgcacgc 7920
 ctgcaggtcg actctagagg atctgccggt ctccctatag tgagtctat taatttcgat 7980
 aagccaggtt aacctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 8040

ES 2 553 458 T3

tgggcgctct tccgcttctt cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgctt ggctgcggcg 8100
 agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 8160
 aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgctt 8220
 gctggcgctt ttccatagge tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 8280
 tcagaggtgg cgaaaccoga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 8340
 cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gottaccgga tacctgtccg cttttctccc 8400
 ttcggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt 8460
 cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcaoga acccccogtt cagcccagacc gctgcgcctt 8520
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 8580
 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 8640
 gtggtggcct aactacggct aactagaag gacagtatctt ggtatctgcg ctctgctgaa 8700
 gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 8760
 tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga 8820
 agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtggt aacgaaaact cacgttaagg 8880
 gattttggtc atgagattat caaaaaggat ctccacctag atccttttaa attaaaaatg 8940
 aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt 9000
 aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgcctgact 9060
 ccccgctgtg tagataacta cgatacggga gggottacca tctggccccca gtgctgcaat 9120
 gataccgcga gacccacgct caccggctcc agatztatca gcaataaacc agccagccgg 9180
 aagggccgag cgcagaagtg gtctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 9240
 ttgccgggaa gctagagtaa gtagttogcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat 9300
 tgctacaggc atcgtgggtg caogctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggtt 9360
 ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catggtgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt 9420
 cggctctccg atcgttgtca gaagtaagtt ggcgcagtg ttatcactca tggttatggc 9480
 agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga 9540
 gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcccga cagagttgct cttgcccggc 9600
 gtcaatacgg gataataccg cggcacatag cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa 9660
 acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 9720
 acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 9780
 agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac ggaatggtg 9840
 aatactcata ctcttctttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 9900

ES 2 553 458 T3

gagcggatac	atatttgaat	gtatttagaa	aaataaaca	ataggggttc	cgcgcacatt	9960
tccccgaaaa	gtgccacctg	acgtctaaga	aaccattatt	atcatgacat	taacctataa	10020
aaataggcgt	atcacgaggc	cctttcgtct	cgcgcgtttc	ggatgatgacg	gtgaaaacct	10080
ctgacacatg	cagctcccgg	agacggtcac	agcttgtctg	taagcggatg	ccgggagcag	10140
acaagcccgt	cagggcgcgt	cagcgggtgt	tggcgggtgt	cggggctggc	ttaactatgc	10200
ggcatcagag	cagattgtac	tgagagtgca	ccatatggac	atattgtcgt	tagaacgcgg	10260
ctacaattaa	tacataacct	tatgtatcat	acacatacga	tttaggtgac	actatagaac	10320
togagcagct	g					10331

REIVINDICACIONES

1. Una fitasa que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 85 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 24.
- 5 2. La fitasa sintética de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 90 %, preferentemente de 94 % y en particular de 95, 96, 97, 98 or 99 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 24.
3. La fitasa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que tiene al menos un intercambio de aminoácidos conservador en al menos una posición en comparación con una fitasa de acuerdo con la reivindicación 1.
4. La fitasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es una fitasa aislada.
- 10 5. La fitasa según de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene una estabilidad elevada a la pepsina, una termoestabilidad elevada y / o una actividad específica elevada en comparación con los dos fitasas de tipo salvaje de *Yersinia mollaretii* y *Hafnia* sp.
6. Una secuencia de ácido nucleico aislada, que codifica una fitasa, que codifica una de las fitasas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 15 7. Una secuencia de ácido nucleico aislada, que codifica una fitasa, que
 - a) tiene al menos una identidad del 85 % con la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID 25,
 - b) hibrida en condiciones altamente rigurosas con la hebra complementaria de una de las secuencias de a).
8. Un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6 o 7.
- 20 9. Una célula huésped recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6 o 7 o el vector de acuerdo con la reivindicación 8.
10. Un organismo de producción no humano recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6 o 7 o el vector de acuerdo con la reivindicación 8.
- 25 11. Un aditivo para alimento para animales que comprende al menos una de las fitasas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y otros aditivos para alimentos para animales.
12. Un alimento para animales que comprende al menos una de las fitasas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
13. El uso de una fitasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o del aditivo para alimentos para animales de acuerdo con la reivindicación 11, en un alimento para animales.
- 30 14. El uso de una fitasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, del aditivo para alimentos para animales de acuerdo con la reivindicación 11, o del alimento para animales de acuerdo con la reivindicación 12 para reducir el contenido en fosfatos en el estiércol del ganado.

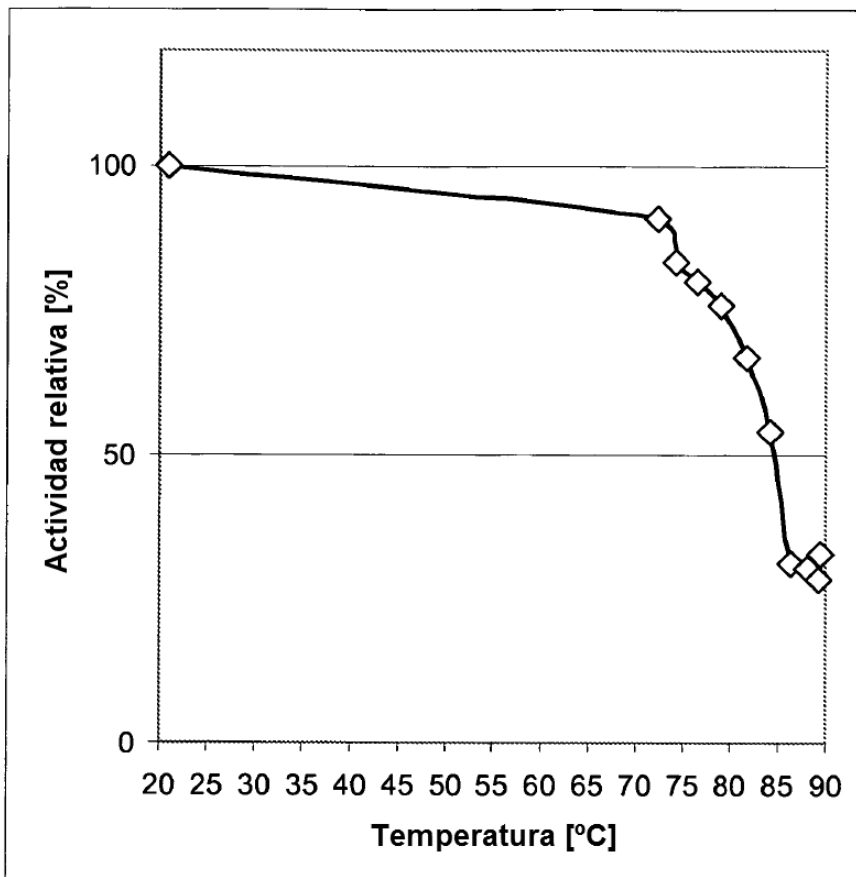


Figura 1

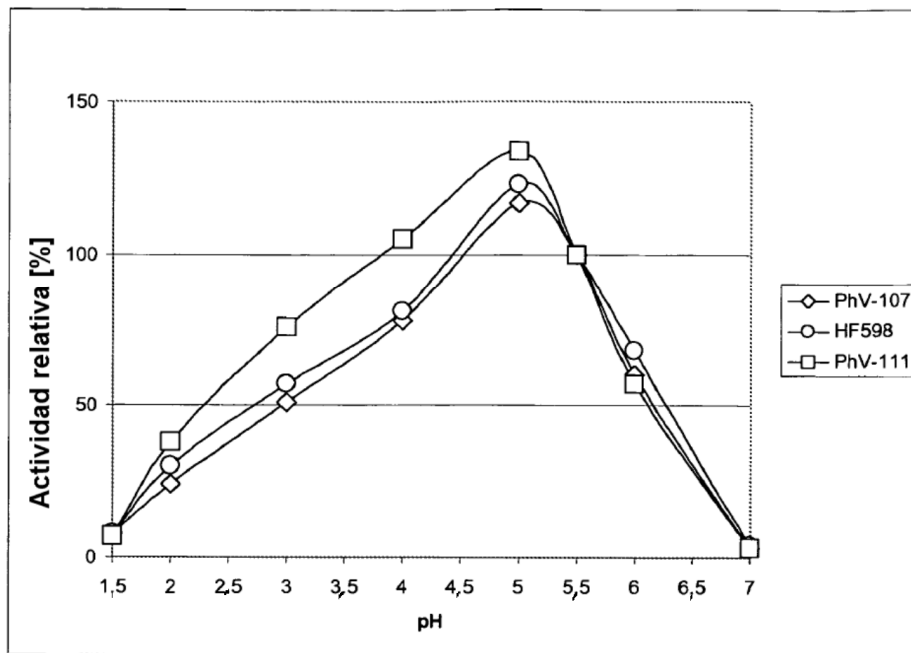


Figura 2A

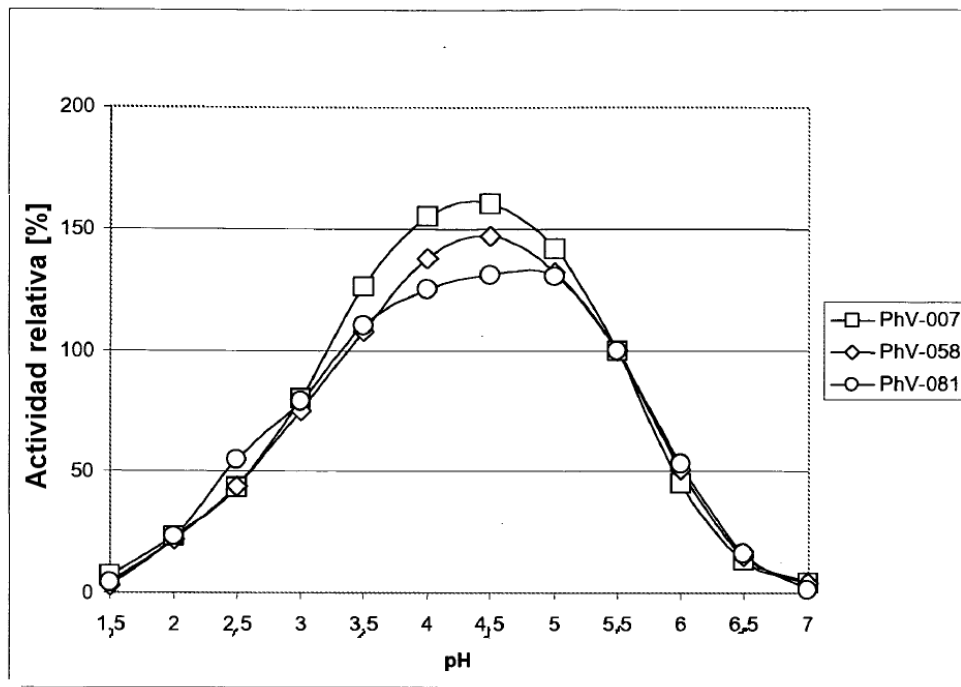


Figura 2 B

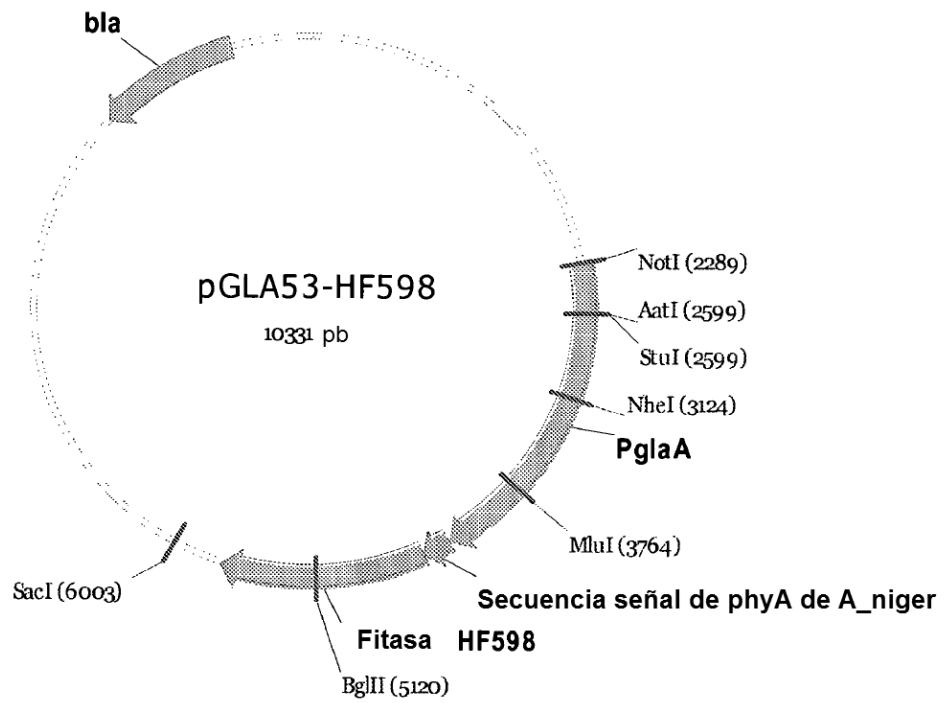


Figura 3

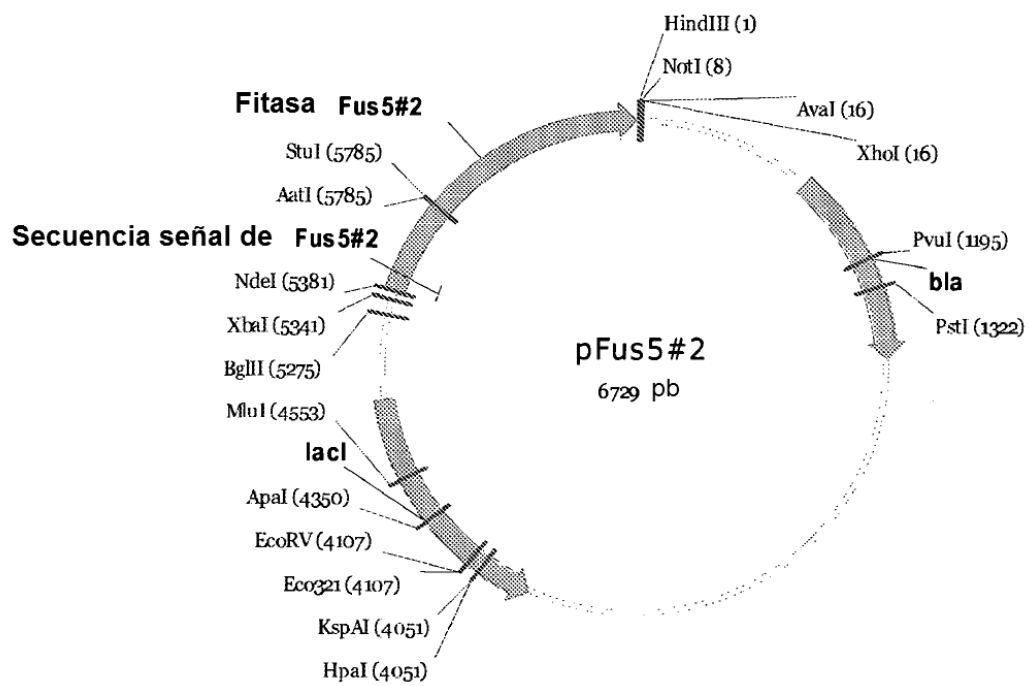


Figura 4

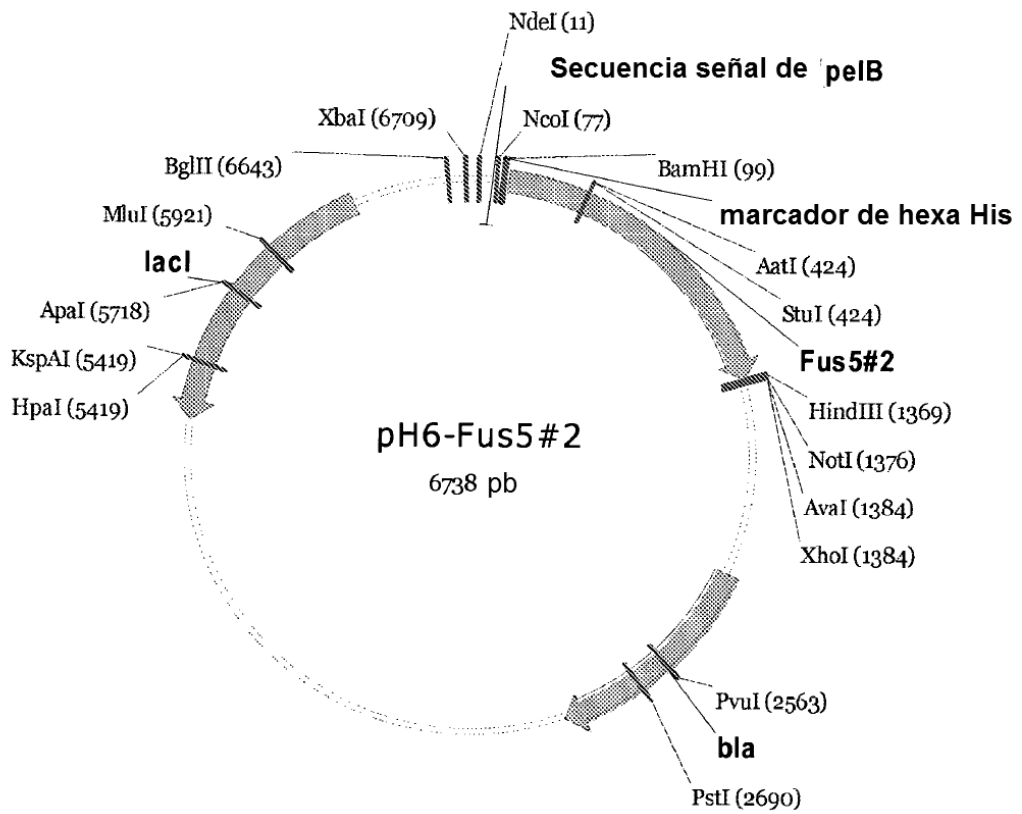


Figura 5

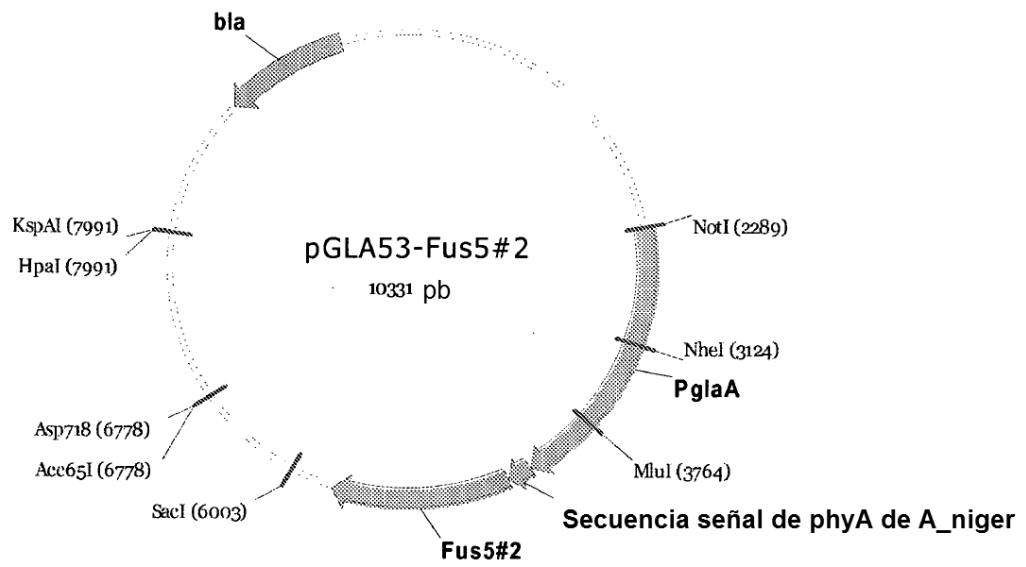


Figura 6