

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 661**

51 Int. Cl.:

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

A23L 1/015 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.1999 E 06075318 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 1688500**

54 Título: **Sobreexpresión de genes de fitasa en sistemas de levadura**

30 Prioridad:

25.06.1998 US 104769

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

22.02.2016

73 Titular/es:

**CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.
(100.0%)**

**Cornell Center for Technology Enterprise &
Commercialization 395 Pine Tree Road, Suite 310
Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

LEI, XINGEN

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el
folleto original publicado por la Oficina
Europea de Patentes**

ES 2 560 661 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

Sobreexpresión de genes de fitasa en sistemas de levadura

5 **Antecedentes de la invención**

Las fitasas, un grupo específico de monoéster fosfatasa, son necesarias para iniciar la liberación de fosfato ("P") a partir de fitato (hexafosfato de mioinositol), la forma de almacenamiento principal del P en alimentos o piensos cereales (Reddy, N.R. *et al.*, "Phytates in Legumes and Cereals", Advances in Food Research, 28:1 (1982)). Debido a que los animales con un solo estómago como cerdos y aves de corral, así como seres humanos, tienen poca actividad fitasa en sus tractos gastrointestinales, casi todo el P de fitato ingerido es indigerible. Esto da como resultado la necesidad de suplementar con P inorgánico, un nutriente costoso y no renovable, las dietas para estos animales. De forma más indeseable, el P de fitato no utilizado excretado a través del abono de estos animales se convierte en contaminación por P del ambiente (Cromwell, G.L. *et al.*, "P - A Key Essential Nutrient, Yet a Possible Major Pollutant - Its Central Role in Animal Nutrition", Biotechnology in the Feed Industry; Proceedings Alltech 7th Annual Symposium, pág. 133 (1991)). Además, el fitato quela elementos traza esenciales como zinc y produce deficiencias de nutrientes tales como retardo del crecimiento y mental en niños que ingieren principalmente alimentos de origen vegetal sin eliminación de fitato.

Se han clonado y secuenciado dos fitasas, *phyA* y *phyB*, a partir de *Aspergillus niger* NRRL3135 (Ehrlich, K.C. *et al.*, "Identification and Cloning of a Second Phytase Gene (*phys*) from *Aspergillus niger* (*ficuum*)", Biochem. Biophys. Res. Commun., 195: 53-57 (1993); Piddington, C.S. *et al.*, "The Cloning and Sequencing of the Genes Encoding Phytase (*phy*) and pH 2.5-optimum Acid Phosphatase (*aph*) from *Aspergillus niger* var. *awamori*", Gene, 133: 56-62 (1993)). Recientemente, se han aislado nuevos genes de fitasa a partir de *Aspergillus terreus* y *Myceliophthora thermophila* (Mitchell *et al.*, "The Phytase Subfamily of Histidine Acid Phosphatases: Isolation of Genes for Two Novel Phytases From the Fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*", Microbiology, 143: 245-252, (1997)), *Aspergillus fumigatus* (Pasamontes *et al.*, "Gene Cloning, Purification, and Characterization of a Heat-Stable Phytase from the Fungus *Aspergillus fumigatus*", Appl. Environ. Microbiol., 63: 1696-1700 (1997)), *Emericella nidulans* y *Talaromyces thermophilus* (Pasamontes *et al.*, "Cloning of the Phytase from *Emericella nidulans* and the Thermophilic Fungus *Talaromyces thermophilus*", Biochim. Biophys. Acta., 1353: 217-223 (1997)), y maíz (Maugenest *et al.*, "Cloning and Characterization of a cDNA Encoding a Maize Seedling Phytase", Biochem. J., 322: 511-517 (1997)).

Se han aislado y/o purificado diversos tipos de enzimas fitasa a partir de *Enterobacter sp. 4* (Yoon *et al.*, "Isolation and Identification of Phytase-Producing Bacterium, *Enterobacter sp. 4*, and Enzymatic Properties of Phytase Enzyme", Enzyme and Microbial Technology 18: 449-454 (1996)), *Klebsiella terrigena* (Greiner *et al.*, "Purificación and Characterization of a Phytase from *Klebsiella terrigena*", Arch. Biochem. Biophys. 341: 201-206 (1997)), y *Bacillus sp. DS11* (Kim *et al.*, "Purification and Properties of a Thermostable Phytase from *Bacillus sp. DS11*", Enzyme and Microbial Technology 22: 2-7 (1998)). Se han estudiado las propiedades de estas enzimas. Además, se ha informado de la estructura cristalina de *phyA* de *Aspergillus ficuum* (Kostrewa *et al.*, "Crystal Structure of Phytase from *Aspergillus ficuum* at 2.5 Å Resolution", Nature Structure Biology 4: 185-190 (1997)).

Hartingsveldt *et al.* introdujeron el gen *phyA* en *A. niger* y obtuvieron un aumento de diez veces de la actividad fitasa, en comparación con el no mutante ("Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*", Gene 127: 87-94 (1993)). Se ha demostrado que la fitasa microbiana suplementaria de esta fuente en las dietas para cerdos y aves de corral es eficaz en la mejora de la utilización de P de fitato y zinc (Simons *et al.*, "Improvement of Phosphorous Availability By Microbial Phytase in Broilers and Pigs", Br. J. Nutr., 64:525 (1990); Lei, X.G. *et al.*, "Supplementing Corn-Soybean Meal Diets With Microbial Phytase Linearly Improves Phytate P Utilization by Weaning Pigs", J. Anim. Sci., 71:3359 (1993); Lei, X.G. *et al.*, "Supplementing Corn-Soybean Meal Diets With Microbial Phytase Maximizes Phytate P Utilization by Weaning Pigs", J. Anim. Sci., 71:3368 (1993); Cromwell, G.L. *et al.*, "P- A Key Essential Nutrient, Yet a Possible Mayor Pollutant - Its Central Role In Animal Nutrition", Biotechnology in the Feed Industry; Proceedings Alltech 7th Annual Symposium", pág. 133 (1991)). Sin embargo, los gastos del suministro limitado de fitasa disponible en el mercado y la inestabilidad de la actividad de la enzima al calor de la peletización de pienso imposibilita su uso práctico en la industria animal (Jongbloed, A.W. *et al.*, "Effect of Pelleting Mixed Feeds on Phytase Activity and Apparent Absorbability of Phosphorous and Calcium in Pigs", Animal Feed Science and Technology, 28: 233-242 (1990)). Además, la fitasa producida a partir de *A. niger* no es presuntamente la fuente más segura para la fabricación de alimentos humanos.

El documento WO 99/08539 describe una enzima fitasa purificada derivada de *Escherichia coli*.

Greiner *et al.*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 303, Nº 1, 1993, páginas 107-113 describe la purificación y caracterización de dos fitasas de *Escherichia coli*.

Touati *et al.*, Biochimie, vol. 69, 1987, páginas 215-221 describe la estructura del promotor y la región amino terminal

del gen estructura de la fosfatasa ácida de pH 2,5 (APPA) de *E. coli*.

Puede usarse levadura para producir de manera eficaz enzimas mientras crece en medios sencillos y económicos. Con una secuencia señal apropiada, la enzima puede secretarse a los medios para una recogida conveniente. Algunos sistemas de expresión de levadura tienen la ventaja añadida de ser bien aceptados en la industria alimentaria y son productores seguros y eficaces de productos alimentarios.

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica capaz de metabolizar metanol como su única fuente de carbono. Este sistema es bien conocido por su capacidad de expresar niveles altos de proteínas heterólogas. Debido a que es un eucariota, *Pichia* tiene muchas de las ventajas de los sistemas de expresión de eucarióticas superiores tales como procesamiento, plegamiento y modificación post-transcripcional de proteínas.

Por tanto, existe la necesidad de desarrollar un sistema eficaz y sencillo para producir fitasa de manera económica para su aplicación a la industria de alimentos y piensos.

Sumario de la invención

Las realizaciones de la invención son:

1. Uso de AppA bacteriana como una fitasa en la que dicha AppA retiene al menos el 60 % de su actividad después de calentar la AppA durante 15 minutos a 60 °C, en la que AppA se expresa en una célula hospedadora de levadura.

2. Uso de AppA bacteriana para catalizar la conversión de fitato en inositol y fosfato, en la que dicha AppA retiene al menos el 60 % de su actividad después de calentar la AppA durante 15 minutos a 60 °C, en la que AppA se expresa en una célula hospedadora de levadura.

3. El uso de las realizaciones 1 ó 2, en el que el hospedador de levadura se selecciona entre el grupo que consiste en especies *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Torulaspota* y *Schizosaccharomyces*.

4. El uso de la realización 3, en el que el hospedador de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

5. El uso de la realización 1 ó 2, en el que dicho hospedador de levadura es una cepa de levadura metilotrófica.

6. El uso de la realización 5, en el que dicho hospedador de levadura es *Pichia pastoris*.

7. El uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en el que dicha fitasa AppA bacteriana se mezcla o pone en contacto con una composición de pienso animal.

8. El uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 7, en el que la AppA bacteriana es un polipéptido de AppA de *E. coli*.

9. Uso de una cepa de levadura que comprende un gen que codifica la AppA bacteriana, ligado funcionalmente a un promotor que dirige la expresión del gen de la AppA en la cepa de levadura, para producir una fitasa en la que dicha fitasa retiene al menos el 60 % de su actividad después de calentar la fitasa durante 15 minutos a 60 °C.

10. El uso de la realización 9, en el que el polipéptido de AppA bacteriana es un polipéptido de AppA de *E. coli*.

11. El uso de cualquiera de las realizaciones 9 a 10, en el que dicha cepa de levadura se selecciona entre el grupo que consiste en especies *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Torulaspota* y *Schizosaccharomyces*.

12. El uso de la realización 11, en el que dicha cepa de levadura es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

13. El uso de la realización 11, en el que dicha cepa de levadura es una cepa de *Pichia pastoris*.

14. Uso de un vector que comprende un gen que codifica AppA, ligado funcionalmente a un promotor que dirige la expresión del gen de la AppA en una cepa de levadura, para producir una fitasa en la que dicha fitasa retiene al menos el 60 % de su actividad después de calentar la fitasa durante 15 minutos a 60 °C.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un análisis de SDS-PAGE de proteína soluble preparada a partir de *E. coli* transformada con el gen de fitasa inducido con IPTG. Las células se cultivaron 4 horas antes de recogerse. Carril 1: marcador; carriles 2 y 3: transformantes de pEP1 (la proteína expresada era de aproximadamente 55 kDa); carril 4: transformante con sólo el vector de expresión pET25b(+).

- La Figura 2 muestra el análisis de transferencia de Western de la proteína fitasa expresada en *E. coli*. El anticuerpo se creó contra fitasa nativa purificada de *A. niger*. Cada carril contenía 50 µg de proteína intracelular total. Carriles 1 y 2: recombinantes después y antes de la inducción; carriles 3 y 4: control (sólo el vector de expresión) después y antes de la inducción.
- La Figura 3 es una imagen de barrido de análisis de transferencia de Northern del ARNm de *PhyA* en *E. coli*. Se usó una sonda de 1,4 kb de *PhyA*. Cada carril contenía 20 µg de ARN total. Carriles 1 y 2: ARN aislado a partir de las células de control (sólo el vector de expresión) antes y después de la inducción; carriles 3 y 4: ARN aislado a partir de los recombinantes que contienen *PhyA* antes y después de la inducción.
- La Figura 4 es un curso cronológico de la expresión inducida de fitasa (pEP1) en *E. coli* BL21 (DE3). Las células se indujeron cuando la DO₆₀₀ alcanzó 0,5. Se cuantificó la proteína soluble, preparada en cada momento puntual, mediante análisis de SDS-PAGE.
- La Figura 5 muestra un análisis de SDS-PAGE de la proteína fitasa extracelular expresada mediante *S. lividans* transformada con fitasa después de crecer durante 72 horas. Se centrifugaron las células durante 15 minutos a 8.000 x g, y el sobrenadante se sometió a electroforesis en gel. Carril 1: marcador; carril 2: control con sólo el vector de expresión; carril 3: la colonia positiva expresó fitasa y el tamaño fue de aproximadamente 57 kDa.
- La Figura 6 muestra el análisis de transferencia de Western de la fitasa expresada por *S. lividans*, usando un anticuerpo contra fitasa creado contra fitasa nativa purificada de *A. niger*. Se cargó cada carril con 20 µg proteína del medio (sobrenadante). Carril 1: sobrenadante del cultivo celular de control transformado con vector; carril 2: sobrenadante del cultivo inoculado con la colonia positiva.
- La Figura 7 representa un análisis de SDS-PAGE de la fitasa extracelular expresada por *S. cerevisiae*. Cada carril se cargó con 50 µg de proteína del medio (sobrenadante). Carriles 1 a 3: sobrenadante del cultivo inoculado con la colonia positiva recogido a las 5, 10 y 25 horas después de la inducción, respectivamente; carriles 4 a 6: sobrenadante del cultivo celular de control transformado con vector recogido a las 5, 10 y 25 horas después de la inducción, respectivamente; carril 7: marcador (kDa). La fitasa expresada era de aproximadamente 110 kDa (confirmado por transferencia de Western).
- La Figura 8 es un curso cronológico de la actividad fitasa extracelular expresada por *S. cerevisiae* transformada con la construcción pYPP1 después de inducción por galactosa. Se analizó la actividad en el sobrenadante del medio recogido.
- La Figura 9 muestra el análisis de transferencia de Western de la fitasa extracelular expresada por *S. cerevisiae* antes y después de desglucosilación (Endo H), usando un anticuerpo contra fitasa creado contra fitasa nativa purificada de *A. niger*. Carril 1: patrones (kDa) de SDS-PAGE preteñidos de Bio-Rad; carriles 2 y 3: 10 y 20 µg de proteína fitasa desglucosilada, respectivamente; carril 4: fitasa glucosilada (20 µg de proteína).
- La Figura 10 es una imagen de barrido de análisis de transferencia de Northern para ARN total aislado a partir de células de *S. cerevisiae* transformadas. Carril 1: control (con sólo el vector de expresión pYES2); carriles 2 y 3: transformantes de pYPP1.
- La Figura 11 es un curso cronológico de la actividad fitasa de *phyA* extracelular producida por transformantes de *Pichia pastoris* de Mut^s (KM71) y Mut⁺ (X33) después de la inducción.
- La Figura 12 representa un análisis de SDS-PAGE de la fitasa sobreexpresada en *Pichia* con la construcción de pPICZαA-PhyA en KM71 (MUT^s). Carril 1: escala de proteínas. Carril 2: 40 µl del sobrenadante de AK1 (una colonia mostró 21.700 mU/ml de fitasa extracelular), recogido 108 horas después de la inducción. Carril 3: 40 µl del sobrenadante de una cepa de control que sobreexpresa albúmina sérica humana (HAS, 6,7 kDa) a un nivel de 1 g/l. Carril 4: 40 µl del sobrenadante del control KM71.
- La Figura 13 representa los efectos de la desglucosilación por Endo H sobre la termoestabilidad de la fitasa expresada en *Pichia*. Se midió la actividad fitasa después de calentar las enzimas durante 15 minutos a 37 °C u 80 °C en tampón citrato 0,2 M, pH 5,5.
- La Figura 14 es una imagen de barrido de análisis de Northern del ARNm de *phyA* expresado por las cepas transformadas de *Pichia pastoris* (KM71 y X33). Se usó una sonda de *phyA* de 1,3 kb para la transferencia. Carriles 1 y 2: el transformante de KM71 antes y después de la inducción; carriles 3 y 4: el transformante de X33 después y antes de la inducción.
- La Figura 15 muestra el pH óptimo de la fitasa extracelular expresada por *Pichia* (X33). Se usaron tampones de glicina-HCl 0,2 M para pH 1,5, 2,5, 3,5; citrato de sodio 0,2 M para pH 4,5, 5,5, 6,5 y Tris-HCl 0,2 M para pH 7,5 y

8,5.

La Figura 16 muestra la temperatura óptima de la fitasa extracelular expresada por *Pichia* (X33). Los ensayos se realizaron en tampón citrato 0,2 M, pH 5,5.

5 La Figura 17 representa la liberación de fósforo libre a partir de soja mediante la fitasa expresada en *Pichia* (X33). Se suspendieron cinco gramos de soja en 25 ml de citrato 0,2 M, pH 5,5, con diferentes cantidades de la enzima. Se realizó la incubación durante 4 horas a 37 °C y se determinó el fósforo liberado en el sobrenadante.

10 La Figura 18 muestra un curso cronológico de la expresión de la actividad fitasa extracelular de cinco transformantes de *Pichia pastoris* que contenían el gen *appA* de *E. coli*.

La Figura 19 muestra gráficamente la relación entre el pH del medio y la expresión de actividad fitasa por *Pichia pastoris*.

15 La Figura 20 es un análisis de SDS-PAGE de la fitasa de *E. coli* sobreexpresada en *Pichia pastoris*. Carril 1: escala de proteínas; carriles 2 a 4: sobrenadantes recogidos de los cultivos de las colonias positivas 23, 22 y 11, respectivamente, 118 horas después de la inducción.

20 La Figura 21 muestra gráficamente el pH óptimo de la fitasa de *E. coli* sobreexpresada por *Pichia pastoris*.

La Figura 22 muestra gráficamente la temperatura óptima de la fitasa de *E. coli* sobreexpresada por *Pichia pastoris*.

25 La Figura 23 muestra la cantidad de fósforo libre liberado a partir de harina de soja por la fitasa de *E. coli* sobreexpresada por *Pichia pastoris* después de cuatro horas de tratamiento.

25

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona el uso de AppA bacteriana como fitasa. Preferentemente, se expresa un gen heterólogo que codifica una proteína o polipéptido con actividad fitasa en una cepa de levadura.

30

Las enzimas que catalizan la conversión de fitato en inositol y fósforo inorgánico son ampliamente conocidas como fitasas. Los microorganismos productores de fitasa comprenden bacterias tales como *Bacillus subtilis* (Paver *et al.*, *J. Bacteriol.* 151, 1102 (1982)) y *Pseudomonas* (Cosgrove, *Austral. J. Biol. Sci.* 23:1207 (1970)); levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae* (Nayini *et al.*, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 17:24 (1984)) y hongos tales como *Aspergillus terreus* (Yamada *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, 32:1275 (1986), que se incorpora por la presente por referencia) y *Aspergillus ficuum* (van Gorcom *et al.*, solicitud de patente europea 89/202.436).

35

Las fitasas están también presentes endógenamente en muchas especies de plantas. Loewus, en *Plant Biology* vol. 9, "Inositol Metabolism in Plants" (eds. D. J. Morre, W.F. Boss, F.A. Loewus) 13 (1990); y Gellatly *et al.*, *Plant Physiology* (suplemento) 93:562 (1990), citan el aislamiento y caracterización de un clon de ADNc de fitasa obtenido a partir de tubérculos de patata. Gibson *et al.*, *J. Cell. Biochem.*, 12C:L407 (1988) y Christen *et al.*, *J. Cell Biochem.*, 12C:L402 (1988), citan la síntesis de fitasa endógena durante la germinación de semillas de soja.

40

Preferentemente, la proteína o polipéptido con actividad fitasa se secreta por la célula en los medios de crecimiento. Esto permite unos mayores niveles de expresión y un aislamiento más fácil del producto. La proteína o polipéptido con actividad fitasa se acopla a una secuencia señal capaz de dirigir la proteína fuera de la célula. Preferentemente, la secuencia señal se escinde de la proteína.

45

En una realización preferida, el gen heterólogo, que codifica una proteína o polipéptido con actividad fitasa, se ajusta en fase con un elemento potenciador transcripcional.

50

Los genes heterólogos que codifican proteínas con actividad fitasa se aíslan a partir de una célula bacteriana. Se ilustra el gen *phyA* de *Aspergillus niger*. Un gen que codifica fitasa, *phyA*, de *Aspergillus niger* NRRL3135 se ha clonado y secuenciado (Piddington, C.S. *et al.*, "The Cloning and Sequencing of the Genes Encoding Phytase (*phy*) and pH 2.5-optimum Acid Phosphatase (*aph*) from *Aspergillus niger* var. *awamori*", *Gene*, 133:56-62 (1993)). Hartingsveldt *et al.* introdujeron el gen *phyA* en *A. niger*, y obtuvieron un aumento de diez veces en la actividad fitasa en comparación con el no mutante (Hartingsveldt *et al.*, "Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus Niger*", *Gene* 127:87-94 (1993)).

55

Un gen heterólogo preferido es el gen *appA* de *E. coli*. El gen, originalmente definido como gen de fosfoanhidrido fosfohidrolasa periplásmica de *E. coli* (*appA*), contiene 1.298 nucleótidos (número de acceso a GeneBank M58708). Se encontró primero que el gen codificaba una proteína fosfatasa ácida de pH óptimo de 2,5 (EcAP) en *E. coli*. La fosfatasa ácida es un monómero con una masa molecular de 44.644 dalton. La EcAP madura contiene 410 aminoácidos (Dassa, J. *et al.*, "The Complete Nucleotide Sequence of the *Escherichia Coli* Gene AppA Reveals

60

Significant Homology Between pH 2.5 Acid Phosphatase and Glucose-1 Phosphatase", *J. Bacteriology*, 172: 5497-5500 (1990)). Ostanin *et al.* sobreexpresaron *appA* en BL21 de *E. coli* usando un vector pT7, y aumentaron su actividad fosfatasa ácida en aproximadamente 400 veces (440 mU/mg de proteína) (Ostanin, K. *et al.*, "Overexpression, Site-Directed Mutagenesis, and Mechanism of *Escherichia Coli* Acid Phosphatase", *J. Biol Chem.*, 267: 22830-22836 (1992)). El producto del gen *appA* no era anteriormente conocido por tener actividad fitasa.

El gen *appA* puede expresarse en cualquier sistema de expresión procariota o eucariota. Puede utilizarse una diversidad de sistemas hospedador-vector para expresar la(s) secuencia(s) que codifica(n) proteína. Los vectores preferidos incluyen un vector viral, plásmido, cósmido o un oligonucleótido. Principalmente, el sistema vector debe ser compatible con la célula hospedadora usada. Los sistemas hospedador-vector incluyen, aunque sin limitación, los siguientes: bacterias transformadas con ADN de bacteriófago, ADN plasmídico o ADN de cósmido; microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura; sistemas celulares de mamífero infectados con virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus, etc.); sistemas celulares de insecto infectados con virus (por ejemplo, baculovirus); y células vegetales infectadas por bacterias. Los elementos de expresión de estos vectores varían en su potencia y especificidades. Dependiendo del sistema hospedador-vector utilizado, puede usarse cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados.

Los hospedadores preferidos para expresar *appA* incluyen células fúngicas, incluyendo especies de levadura u hongos filamentosos, que pueden usarse como células hospedadoras según la presente invención. Las células hospedadoras de levadura preferidas incluyen diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Pueden usarse también otras levaduras como *Kluyveromyces*, *Torulaspota* y *Schizosaccharomyces*. En una realización preferida, la cepa de levadura usada para sobreexpresar la proteína es *Saccharomyces cerevisiae*. Las células hospedadoras de hongos filamentosos preferidas incluyen *Aspergillus* y *Neurospora*. Una cepa más preferida de *Aspergillus* es *Aspergillus niger*.

En otra realización preferida de la presente invención, la cepa de levadura es una cepa de levadura metilotrófica. Las levaduras metilotróficas son aquellos géneros de levadura capaces de utilizar metanol como fuente de carbono para la producción de los recursos energéticos necesarios para mantener la función celular y que contienen un gen para la expresión de alcohol oxidasa. Las levaduras metilotróficas típicas incluyen miembros de los géneros *Pichia*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Candida* y *Karwinskia*. Estos géneros de levadura pueden usar metanol como tónica fuente de carbono. En una realización más preferida, la cepa de levadura metilotrófica es *Pichia pastoris*.

La presente invención proporciona también una proteína o polipéptido con actividad fitasa. PhyA se expresa en *Pichia* y la proteína resultante producida tiene actividad extracelular mucho más alta (~65 mU/ml). La producción de actividad fitasa fue aproximadamente 30 veces mayor que en *Saccharomyces cerevisiae* transformada con phyA, 21 veces mayor que aquella en el no mutante de *Aspergillus niger*, y 65.000 veces mayor que aquella en *Pichia* no transformada. El pH óptimo de la fitasa expresada fue de 2,5 y 5,5, y la temperatura óptima fue 60 °C. Asimismo, *appA* se expresa en *Pichia* y *Saccharomyces cerevisiae* teniendo la proteína resultante actividad extracelular mucho más alta y un pH óptimo mucho más preferido de 2,5 a 3,5.

Una realización preferida de la invención es una proteína o polipéptido que tiene actividad fitasa con actividad óptima en un intervalo de temperatura de 57 a 65 °C. Una realización más preferida es una proteína o polipéptido que tiene actividad fitasa, donde su intervalo de temperatura para actividad óptima es de 58 a 62 °C.

La AppA es una proteína o polipéptido que tiene actividad fitasa, donde la proteína retiene al menos un 60 % de su actividad después de calentar la proteína durante 15 minutos a 60 °C.

La proteína purificada puede obtenerse mediante diversos métodos. La proteína o polipéptido de la presente invención se produce preferentemente en forma purificada (preferentemente al menos aproximadamente 80 %, más preferentemente 90 % pura) mediante técnicas convencionales. Típicamente, la proteína o polipéptido de la presente invención se secreta en el medio de crecimiento de células hospedadoras recombinantes. Alternativamente, la proteína o polipéptido de la presente invención se produce, pero no se secreta en el medio de crecimiento. En dichos casos, para aislar la proteína, se propaga la célula hospedadora que porta un plásmido recombinante, se lisa mediante sonicación, calor o tratamiento térmico, y se centrifuga el homogeneizado para retirar los desechos celulares. El sobrenadante después se somete a precipitación secuencial con sulfato de amonio. La fracción que contiene el polipéptido o proteína de la presente invención se somete a filtración en gel en una columna de dextrano o poli(acrilamida) de tamaño apropiado para separar las proteínas. Si es necesario, la fracción de proteína puede purificarse adicionalmente por HPLC.

El presente uso emplea también una cepa de levadura que tiene un gen heterólogo que codifica una proteína o polipéptido con actividad fitasa. El gen heterólogo debe estar ligado funcionalmente a un promotor capaz de expresar fitasa en levadura.

Otro aspecto más de la invención es el uso de un vector para expresar fitasa en levadura. El vector porta un gen de

- un organismo no de levadura *que* codifica una proteína o polipéptido con actividad fitasa. El gen de fitasa puede clonarse en cualquier vector que se replique de forma autónoma o se integre en el genoma de levadura. El número de copias de plásmidos de replicación autónoma, por ejemplo, plásmidos YEp, puede ser alto, pero su estabilidad mitótica puede ser insuficiente (Bitter *et al.*, "Expression and Secretion Vectors for Yeast", Meth Enzymol., 153:516-544 (1987)). Pueden contener la secuencia de plásmido 2 mu responsable de la replicación autónoma, y una secuencia de *E. coli* responsable de la replicación en *E. coli*. Los vectores contienen preferentemente un marcador genético para la selección de transformantes de levadura, y un gen de resistencia a antibiótico para la selección en *E. coli*. Los vectores episómicos que contienen las secuencias ARS y CEN aparecen como una sola copia por célula, y son más estables que los vectores YEp. Se usan vectores integrativos cuando se integra un fragmento de ADN como una o múltiples copias en el genoma de levadura. En este caso, el ADN recombinante es estable y no se necesita selección (Struhl *et al.*, "High-Frequency Transformation of Yeast: Autonomous Replication of Hybrid DNA Molecules", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1035-1039 (1979); Powels *et al.*, Cloning Vectors I-IV, y siguientes, Elsevier (1985); Sakai *et al.*, "Enhanced Secretion of Human Nerve Growth Factor from *Saccharomyces cerevisiae* Using an Advanced δ -Integration System", Biotechnology 9: 1382-1385 (1991)). Algunos vectores tienen un origen de replicación, que funciona en la célula hospedadora seleccionada. Los orígenes de replicación adecuados incluyen 2 μ , ARS1 y 25 μ M. Los vectores tienen sitios de endonucleasa de restricción para la inserción del gen de fusión y secuencias promotoras, y marcadores de selección. Los vectores pueden modificarse mediante retirada o adición de sitios de restricción, o retirada de otros nucleótidos indeseados.
- El gen de fitasa puede disponerse bajo el control de cualquier promotor (Stetler *et al.*, "Secretion of Active, Full- and Half-Length Human Secretory Leukocyte Protease Inhibitor by *Saccharomyces cerevisiae*", Biotechnology 7: 55-60, (1989)). Puede elegirse un promotor de levadura constitutivo o regulado. Las secuencias promotoras adecuadas para vectores de levadura incluyen, entre otras, promotores para la metalotioneína, 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem. 255:2073 (1980)) u otras enzimas glucolíticas (Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg. 7:149 (1968); y Holland *et al.*, Biochem. 17:4900 (1978)), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa. Otros vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión en levadura se describen adicionalmente en el documento EP-A-73.657 de Hitzeman, que se incorpora por la presente por referencia. Otra alternativa es el promotor de ADH2 reprimible por glucosa descrito por Russell *et al.*, J. Biol. Chem. 258:2674 (1982) y Beier *et al.*, Nature 300:724 (1982).
- Puede elegirse un promotor de levadura constitutivo o regulado. Los promotores fuertes de, por ejemplo, el gen de la fosfoglicerato quinasa (PGK), otros genes que codifican enzimas glucolíticas y el gen del factor alfa, son constitutivos. Cuando se usa un promotor constitutivo, se sintetiza el producto durante el crecimiento celular. El promotor de ADH2 está regulado con etanol y glucosa, los promotores de GAL-1-10 y GAL7 con galactosa y glucosa, el promotor de PHO5 con fosfato, y el promotor de la metalotionina con cobre. Los promotores de choque térmico, a los que pertenece el promotor de HSP150, se regulan mediante la temperatura. Pueden usarse también promotores híbridos. Se usa un promotor regulado cuando la expresión continua del producto deseado es dañina para las células hospedadoras. En lugar de promotores de levadura, puede usarse un promotor procariota fuerte tal como el promotor de T7, pero en este caso la cepa de levadura tiene que transformarse con un gen que codifique la polimerasa respectiva. Para la terminación de la transcripción, se usa el terminador de HSP150, o cualquier otro terminador funcional. Aquí, los promotores y terminadores se denominan elementos de control. La presente invención no está restringida a ningún vector, promotor o terminador específico.
- El vector puede portar también un marcador de selección. Los marcadores de selección son a menudo genes de resistencia a antibiótico o genes capaces de complementar cepas de levadura que tienen deficiencias metabólicas bien caracterizadas, tales como mutantes deficientes en triptófano o histidina. Los marcadores de selección preferidos incluyen URA3, LEU2, HIS3, TRP1, HIS4, ARG4 o genes de resistencia a antibiótico.
- El vector puede tener también un origen de replicación con capacidad de replicación en una célula bacteriana. La manipulación de vectores es más eficaz en cepas bacterianas. Los orígenes de replicación bacterianos preferidos son ColEI, Ori u oriT.
- Puede usarse una secuencia líder de la levadura o de genes de fitasa u otras fuentes para soportar la secreción de enzima fitasa expresada en el medio. La presente invención no está restringida a ningún tipo específico de secuencia líder o péptido señal.
- Las secuencias líder adecuadas incluyen la secuencia líder del factor alfa de levadura, que puede emplearse para dirigir la secreción de la fitasa. La secuencia líder del factor alfa se inserta a menudo entre la secuencia promotora y la secuencia génica estructural (Kurjan *et al.*, Cell 30:933 (1982); Bitter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5330 (1984); patente de Estados Unidos N° 4.546.082; y solicitud de patente publicada europea N° 324.274). Otra secuencia líder adecuada es MF alfa 1 de *S. cerevisiae* (factor alfa), sintetizada como una preproforma de 165 aminoácidos, que comprende un péptido señal o prepéptido de 19 aminoácidos seguido por un péptido "líder" o

propéptido de 64 aminoácidos, que abarca tres sitios de glucosilación ligadas a N seguidos por (LysArg(Asp/Glu,Ala)₂₋₃ factor alfa)₄ (Kurjan *et al.*, Cell 30: 933-943 (1982)). La parte señal-líder de la preproMF alfa 1 se ha empleado ampliamente para obtener la síntesis y secreción de proteínas heterólogas en *S. cerevisiae*. El uso de péptidos señal/líder homólogos para levadura se conoce a partir de la patente de Estados Unidos N° 4.546.082, las solicitudes de patente europea N° 116.201; 123.294; 123.544; 163.529; y 123.289, y la solicitud de patente DK N° 3614/83. En la solicitud de patente europea N° 123.289, que se incorpora por la presente por referencia, se describe la utilización del precursor de factor a de *S. cerevisiae*, mientras que el documento WO 84/01153 indica la utilización de péptido señal de la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*, y la solicitud de patente alemana DK 3614/83, que se incorpora por la presente por referencia, indica la utilización del péptido señal PH05 de *Saccharomyces cerevisiae* para la secreción de proteínas foráneas.

La señal-líder del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* (MF alfa 1 o MF alfa 2) puede utilizarse también en el proceso de secreción de proteínas heterólogas expresadas en levadura (patente de Estados Unidos N° 4.546.082, solicitudes de patente europea N° 16.201; 123.294; 123.544; y 163.529). Fusionando una secuencia de ADN que codifica la secuencia señal/líder de MF alfa 1 de *S. cerevisiae* en el extremo 5' del gen para la proteína deseada, se demostró la secreción y el procesamiento de la proteína deseada. El uso del péptido señal de la amilasa salivar de ratón (o un mutante del mismo) para proporcionar la secreción de proteínas heterólogas expresadas en levadura se ha descrito en las solicitudes PCT publicadas N° WO 89/02463 y WO 90/10075.

La patente de Estados Unidos N° 5.726.038 describe el uso del péptido señal de la proteasa aspártica 3 de levadura, que es capaz de proporcionar secreción mejorada de proteínas expresadas en levadura. Son conocidas para los expertos en la materia otras secuencias líder adecuadas para facilitar la secreción de polipéptidos recombinantes a partir de hospedadores de levadura. Puede modificarse una secuencia líder cerca de su extremo 3' para que contenga uno o más sitios de restricción. Esto facilitará la fusión de la secuencia líder con el gen estructural.

Los protocolos de transformación de levadura son conocidos para los expertos en la materia. Se describe uno de dichos protocolos por Hinnen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929 (1978). El protocolo de Hinnen *et al.* selecciona transformantes de Trp en un medio selectivo, en el que el medio selectivo consiste en base nitrogenada de levadura al 0,67 %, casaminoácidos al 0,5 %, glucosa al 2 %, 10 µg/ml de adenina y 20 µg/ml de uracilo.

El gen puede mantenerse en un vector de expresión estable, un cromosoma artificial o mediante integración en el cromosoma de la célula hospedadora de levadura. La integración en el cromosoma puede conseguirse mediante clonación del gen de fitasa en un vector que se recombinará en un cromosoma de levadura. Los vectores adecuados pueden incluir secuencias nucleotídicas que son homologas de secuencias nucleotídicas en el cromosoma de levadura. Alternativamente, el gen de fitasa puede estar localizado entre sitios de recombinación, tal como elementos transponibles, que pueden movilizar el gen en el cromosoma.

La presente memoria descriptiva también ilustra un método para producir fitasa proporcionando un gen *appA* aislado, que codifica una proteína o polipéptido con actividad fitasa, y expresando el gen en una célula hospedadora. En el uso de la invención, el gen *appA* se aísla preferentemente de *Escherichia coli*. Las células hospedadoras preferidas incluyen levaduras y hongos filamentosos. Los hongos filamentosos preferidos son *Aspergillus niger* y las levaduras preferidas son *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* y *Schizosaccharomyces*, en particular la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Se proporciona también el uso de AppA bacteriana que convierte fitato en inositol y fósforo inorgánico. Se aísla un gen *appA* de un organismo usando técnicas bien conocidas en la técnica. Se expresa después una proteína o polipéptido con actividad fitasa a partir del gen en una célula hospedadora. La proteína o polipéptido resultante se mezcla o se pone en contacto con fitato. Esta técnica es especialmente útil para tratar fitato en alimentos o piensos animales.

El gen *appA* preferido se aísla de *Escherichia coli*.

Aunque la enzima fitasa producida en un sistema de levadura liberó P de fitato a partir de maíz y soja tan eficazmente como la fitasa comercial actual, pareció ser más termoestable. Este sistema de sobreexpresión de fitasa en levadura puede usarse para proporcionar fitasa termoestable para su uso en las industrias de alimentos y piensos.

Ejemplos

Los Ejemplos de referencia están marcados con ***

Ejemplo 1 -Materiales y métodos para la sobreexpresión de *PhyA* en *E. coli*, *S. lividans* y un sistema de *Saccharomyces

Gen de fitasa, cepas hospedadoras y plásmidos de expresión. El gen de fitasa, *phyA*, fue amablemente proporcionado por el Dr. E.J. Mullaney del USDA. El gen (número de acceso a GenBank M94550) estaba contenido en el plásmido pMD4.21 en la cepa HB101 de *E. coli*. Un fragmento SphI de 2,7 kb de ADN de *A. niger* contenía la región codificante de la fitasa desglucosilada y sus secuencias flanqueantes 5' y 3'. El plásmido que contenía la secuencia de péptido señal, Spxy, del gen de xilanasa activa de *Aureobasidium pullulans* (número de acceso a GenBank U10298) fue amablemente proporcionado por el Dr. X.L. Li de la Universidad de Georgia. La cepa DH5 α de *E. coli* se usó como hospedador inicial para todos los plásmidos recombinantes. Para expresar *phyA* en *E. coli*, se usaron el vector de expresión pET25b(+) (Novagen, Madison, WI) y el hospedador de expresión BL21(DE3)pLysS. Para expresar *phyA* en TK24 de *S. lividans*, se usó el plásmido pSES1 (Jung, E.D., *et al.*, "DNA Sequences and Expression in *Streptomyces Lividans* glucanase Gene and an Endoglucanase Gene from *Thermomonospora Fusca*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3032-3043 (1993)) para construir el plásmido lanzadera (del Dr. D.B. Wilson de la Universidad de Cornell, y él lo obtuvo del Dr. D.A. Hopwood, Instituto John Innes, Norwich, Inglaterra). Para expresar *phyA* en levadura, se usaron el vector de expresión pYES2 y la cepa hospedadora INVSc1 de *S. cerevisiae* (Invitrogen, San Diego, CA).

Construcciones y transformaciones de casete plasmídico. En la Tabla 1 se enumeran todos los plásmidos construidos y los correspondientes hospedadores. Se amplificó un fragmento de PCR de 1,4 kb del gen *phyA* a partir de pMD4.21 usando dos cebadores: cadena arriba 5'-CGG AAT TCG TCA CCT CCG GAC T-3' (SEC ID N° 1) y cadena abajo 5'-CCC AAG CTT CTA AGC AAA ACA CTC-3' (SEC ID N° 2). El fragmento resultante contenía la secuencia que codifica la fitasa desglucosilada de *A. niger*, *PhyA*, y el sitio de restricción *EcoRI* y *HindIII* cadena arriba y cadena abajo, respectivamente. Después de la purificación con el kit GeneClean II (BioL01, Inc., La Jolla, CA), se insertó el fragmento en pET25b(+) y se transformó la construcción resultante pEP1 (6893 pb) en BL21(DE3)pLysS después de la confirmación inicial en células DH5 α . La expresión estaba bajo el control del promotor de T7, seguido de la secuencia líder (pel B) que codifica 21 aminoácidos, y *phyA*. Se usó el hospedador transformado sólo con el vector pET25(+) como control.

Tabla 1. Vectores de expresión, construcciones y sus cepas hospedadoras usadas en el estudio

Plásmido	Hospedador	Descripción ¹	Referencia ²
pET25b(+)	DH5 α y BL21(DE3)pLysS de <i>E. coli</i>	Vector de expresión	Novagen
pEP1	BL21(DE3)pLysS de <i>E. coli</i>	pET25b α (+) + gen <i>phyA</i>	Este artículo
pSES2	DH5 α de <i>E. coli</i> y TK24 de <i>S. lividans</i>	Vector de expresión	Jung <i>et al.</i> ² , 1993
pSPP1	DH5 α de <i>E. coli</i> y TK24 de <i>S. lividans</i>	PSES2 + Spe2 + <i>phyA</i>	Este artículo
pYES2	DH5 α de <i>E. coli</i> e INVSc1 de <i>S. cerevisiae</i>	Vector de expresión	Invitrogen
pYEP1	DH5 α de <i>E. coli</i> e INVSc1 de <i>S. cerevisiae</i>	pYES2 + Spe2 + <i>phyA</i>	Este artículo
pYXP1	DH5 α de <i>E. coli</i> e INVSc1 de <i>S. cerevisiae</i>	pYES2 + Spxy + <i>phyA</i>	Este artículo
pYPP1	DH5 α de <i>E. coli</i> e INVSc1 de <i>S. cerevisiae</i>	pYES2 + <i>phyA</i> + Sphy	Este artículo

1 Spe2 es el péptido señal para la endoglucanasa E2 de *T. fusca* (Wilson, D.B. "Biochemistry and Genetics of Actinomycete Cellulases", *Crit. Rev. Biotechnol.*; 12: 45-63 (1992), que se incorpora por la presente por referencia); Spxy es el péptido señal para la xilanasa de *A. pullulans* (Li y Ljungdahl, "Cloning, Sequencing, and Regulation of a Xylanase Gene from the Fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2331-1", *Appl Environ. Microbiol.*, 60: 3160-66 (1994); Li y Ljungdahl, "Expression of *Aureobasidium pullulans xynA* in, and Secretion of the Xylanase from, *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl Environ. Microbiol.*, 62: 209-213 (1996), que se incorporan por la presente por referencia); y Sphy es el péptido señal para *phyA* de *A. niger* (Hartingsveldt *et al.*, "Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*", *Gene* 127: 87-94 (1993), que se incorpora por la presente por referencia).

2 Jung, E.D. *et al.*, "DNA Sequences and Expression in *Streptomyces Lividans* glucanase Gene and an Endoglucanase Gene from *Thermomonospora Fusca*", *Appl Environ. Microbiol.*, 59: 3032-3043 (1993), que se incorpora por la presente por referencia).

La construcción del plásmido para la expresión de *phyA* en *S. lividans* se inició con la síntesis de un fragmento que contenía el promotor pLT1 y el péptido señal Spe2 (Lao, G. *et al.*, "DNA Sequences of Three Beta-1,4-endoglucanase Genes from *Thermomonospora Fusca*", *J. Bacteriol.*, 173: 3397-3407 (1991)) por PCR. Un cebador cadena arriba, 5'- CAG CTA TGA CCA TGA TTA CGC C-3' (SEC ID N° 3) y un cebador cadena abajo 5'-CCT AGA ACG GGA ATT CAT TGG CCG CC-3' (SEC ID N° 4) contenían sitios de restricción *PstI* y *EcoRI*, respectivamente. Se amplificó el fragmento a partir de pBW2 (Jung, E.D. *et al.*, "DNA Sequences and Expression in *Streptomyces lividans* of an Exoglucanase Gene and an Endoglucanase Gene From *Thermomonospora Fusca*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3032-3042 (1993)), y después se digirió con *PstI* y *EcoRI*, mientras que la construcción pEP1 y el plásmido pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, CA) se digirieron con *EcoRI* y *HindIII*, y *PstI* y *HindIII*, respectivamente. Se purificaron posteriormente los tres fragmentos digeridos usando el kit GeneClean II y se ligaron en una única construcción recombinante que contenía los sitios de restricción deseados de *PstI* y *KpnI* (de

pBluescript SK+), el promotor pLT1 y el péptido líder Spe2 de la endoglucanasa E2 (551 pb, Lao, G. *et al.*, "DNA Sequences of Three Beta-1,4-endoglucanase Genes from *Thermomonospora Fusca*", *J. Bacteriol.*, 173: 3397-3407 (1991)) y el gen *phyA* (1365 pb). Después de digerir la construcción con *PstI* y *KpnI*, se insertó el fragmento resultante en el vector de expresión pSES1, y se transformó el plásmido lanzadera formado (pSPP1, 9131 pb) en protoplastos del hospedador *S. lividans* según Hopwood *et al.* (Hopwood, D.A. *et al.*, *Genetic Manipulation of Streptomyces-A Laboratory Manual*, Fundación John Innes, Norwich, Inglaterra (1985)). Asimismo, se preparó un control transformando *S. lividans* con el vector de expresión pSES2.

Se construyeron tres plásmidos lanzadera con tres secuencias de péptido señal diferentes para expresar *phyA* en el sistema de levadura (véase la Tabla 2). El primer plásmido se originó a partir de un fragmento de pSPp1 digerido con *HindIII*, incluyendo el promotor pLT1, la secuencia líder Spe2 y la secuencia de región codificante de *phyA*. El fragmento se ligó en el sitio *HindIII* de pYES2 tratado con fosfatasa alcalina intestinal de ternero, y el plásmido se denominó pYEP1 (7783 pb) después de confirmar su orientación correcta. El segundo plásmido contenía Spxy, una secuencia de péptido señal del gen de xilanasa de *A. pullulans* (Li, X.L. *et al.*, "Cloning, Sequencing and Regulation of a Xylanase Gene From the Fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1", *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 160-166 (1994); Li, X.L. *et al.*, "Expression of *Aureobasidium pullulans* XynA in, and Secretion of the Xylanase From, *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 209-213 (1996)), y el gen *phyA*. Se ajustó Spxy con *phyA* mediante extensión de superposición (Horton, R.M., "In vitro Recombination and Mutagenesis of DNA: SOEing Together Tailor-Made Genes", *PCR Protocols: Currents Methods and Applications*, 251-261 (1993)) con dos etapas sucesivas de PCR. Una fue para amplificar la secuencia Spxy de pCE4 (Li, X.L. *et al.*, "Expression of *Aureobasidium Pullulans* XynA in, and Secretion of the Xylanase From, *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 209-213 (1996)) usando el cebador cadena arriba (5'- CCC AAG CTT GAT CAC ATC CAT TCA -3') (SEC ID N° 5) con un sitio de restricción *HindIII* (cebador 1) y un cebador cadena abajo superpuesto (5'-CGG GGA CTG CTA GCG CAC GTT CGA T- 3', cebador 2) (SEC ID N° 6). La otra PCR fue para amplificar la región codificante de *phyA* de pEP1 usando el cebador cadena arriba superpuesto (5'- ATC GAA CGT GCG CTA GCA GCA GTC CCC G -3', cebador 3) (SEC ID N° 7) y el cebador cadena abajo (5'- GCT CTA GAC TAA GCA AAA CAC TCC- 3', cebador 4) (SEC ID N° 8) con un sitio de restricción *XbaI*. La segunda etapa de PCR se realizó para combinar los dos fragmentos generados por las dos PCR anteriores usando los dos fragmentos purificados como moldes y los cebadores 1 y 4. El fragmento resultante contenía los sitios de restricción *HindIII* y *XbaI* y se clonó en pSES2. Este plásmido se denominó pYXP1 (7219 pb). El tercer plásmido contenía la secuencia del péptido señal (Sphy) de *phyA* y la región codificante de *phyA*, excluyendo el intrón entre ellas (Hartingsveldt, W. van., *et al.*, "Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*", *Gene* 127: 87-94 (1993)). Se usaron dos cebadores, incluyendo 70 pb del cebador cadena arriba que contenían el péptido señal con un sitio de restricción *KpnI* introducido por ingeniería genética y un cebador cadena abajo que era el mismo usado para la construcción de pYXP1 (cebador 4) para amplificar el fragmento deseado a partir de pEP1. Se digirió el producto de PCR con *KpnI* y *XbaI* y se clonó en pSES2, dando como resultado un plásmido denominado pYPP1 (7176 pb). Se transformaron los tres construcciones anteriores en *S. cerevisiae* mediante el método de Ito *et al.*, "Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations", *J. Bacteriol.*, 153: 163-168 (1983).

Tabla 2. Péptidos señal usados para la expresión de *phyA* en *S. cerevisiae*

Tamaño de construcción (pb)	Péptido	Gen	Organismo	Actividad fitasa ¹ (mUF/ml)
pYEP1 7783	Spe2 (93 pb)	Celulasa E2	<i>T. fusca</i>	0,80
pYXP1 7219	Spxy (102 pb)	Xilanasa A	<i>A. pullulans</i>	No detectable
pYPP1 7176	Sphy (57 pb)	PhyA fitasa	<i>A. niger</i>	146
pSES1 ² 7224			<i>S. cerevisiae</i>	No detectable

1 La actividad fitasa se detectó en el sobrenadante del cultivo celular de medio Sabouraud-rafinosa 15 horas después de inducirse añadiendo galactosa. Véase el texto para la definición de unidades de fitasa.

2 Vector de expresión para *S. cerevisiae*, usado como control.

Medio de crecimiento e inducción de la expresión génica. Se cultivaron los transformantes en el sistema de *E. coli* en 50 ml de medio LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina a 30 °C. Después de que el valor de DO₆₀₀ del medio alcanzara 0,5 a 0,6, se indujo la expresión génica de fitasa añadiendo IPTG (b-D-tiogalactopiranosido de isopropilo) al medio a una concentración final de 1 mM. Tres horas después de la inducción, se recogieron las células mediante centrifugación a 8.000 x g durante 15 minutos, se lavaron con 1 x PBS y se lisaron mediante lisozima. Se prepararon las fracciones soluble e insoluble de las células, y se suspendió una muestra que contenía 500 µg de proteína total (Lowry, O.H. *et al.*, "Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent", *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275 (1951)) en el mismo volumen de tampón 2 x SDS, y se analizó mediante SDS-PAGE (Laemmli, U.K., "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature (Londres)*, 227: 680-685 (1970)).

Se cultivó *S. lividans* recombinante en caldo TSB con 5 µg/ml de tiostreptona a 30 °C (Jung, E.D. *et al.*, "DNA Sequences and Expression in *Streptomyces lividans* of an Exoglucanase Gene and an Endoglucanase Gene from *Thermomonospora Fusca*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3032-3043 (1993)). Después de 72 horas de incubación, se recogieron las células y el medio y se prepararon para SDS-PAGE (Wilson, D.B. "Biochemistry and Genetics of

Actynomycete Cellulases", Crit. Rev. Biotechnol., 12: 45-63 (1992)).

Se cultivaron los transformantes de *S. cerevisiae* inicialmente en medio Sabouraud-rafinosa (4 %) (100 ml) sin uracilo durante 48 horas, se añadió después galactosa estéril al medio (2 %) para inducir la expresión de fitasa. Se recogieron muestras de medio y células en diversos momentos puntuales, y se prepararon muestras extracelulares e intracelulares como se describe por Li y Ljungdahl, "Expression of *Aureobasidium pullulans xynA* in, and Secretion of the Xylanase from, *Saccharomyces cerevisiae*", Appl. Environ. Microbiol., 62: 209-213 (1996). Cuando fue necesario, se concentró el sobrenadante de las fracciones de cultivo celular expresado con células agitadas de Amicon (Beverly, MA) usando membranas YM10 (corte de PM de 10.000). Se ensayaron otros medios en consecuencia.

Ensayo de proteína y actividad enzimática. Se cuantificaron las cantidades de proteína fitasa expresada en diversas condiciones mediante densitometría relativa de bandas específicas en SDS-PAGE, usando el sistema de imágenes digitales IS-1000 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA). Se determinó la actividad fitasa en las muestras de medios y células como se ha descrito previamente (Piddington, C.S. *et al.*, "The Cloning and Sequencing of the Genes Encoding Phytase (*phy*) and pH 2.5-optimum Acid Phosphatase (*aph*) from *Aspergillus niger* var. *awamori*", Gene, 133: 56-62 (1993)) y se ensayó el fosfato inorgánico liberado mediante el método de Chen, P.S. *et al.*, "Microdetermination of P", Anal. Chem., 28: 1756-1758 (1956). Se definió una unidad de fitasa (UF) como la cantidad de enzima que libera un μmol de fosfato inorgánico a partir de fitato de sodio por minuto a 37 °C.

Análisis de transferencia de Western (inmunotransferencia). Se recogieron la fracción soluble de la masa celular de *E. coli* transformada con fitasa y el sobrenadante del medio de transformantes de *S. lividans* y *S. cerevisiae* como para SDS-PAGE. Después de la electroforesis, se transfirieron entonces las proteínas a membrana de nitrocelulosa Protran® (Schleicher & Schuell, Keene, NH, Estados Unidos) en Tris-HCl 20 mM (pH 8,3), metanol al 20 % y SDS al 0,1 %, usando una celda Mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories). La transferencia se hizo durante una noche a 50 V constantes, y la temperatura inicial del tampón fue de 4 °C. Las membranas después se sometieron a análisis de transferencia de Western. Se usó una IgG policlonal de conejo (amablemente proporcionada por el Dr. A.H.J. Ullah del USDA. Dilución: 1:5.000) contra fitasa nativa purificada de *A. niger* como primer anticuerpo. La transferencia se finalizó usando el kit de ensayo de inmunotransferencia (Bio-Rad Laboratories) que contenía un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante.

Aislamiento y análisis de ARN total. Se aisló el ARN total con reactivo TRIzol™ (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) a partir de transformantes de *E. coli* y *S. cerevisiae* 3 y 15 horas después de la inducción, respectivamente. Las muestras de ARN (10 μg por carril) se separaron después mediante electroforesis en gel de formaldehído-agarosa (1,5 % p/v) y se transfirieron a membranas Hyblot (National Labnet, Woodbridge, NJ) (Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, 2ª Ed., Appleton y Lange, Norwalle, CT. (1994)). Se preparó un fragmento *EcoRI-HindIII* de 1,4 kb en el plásmido pEP1 y se marcó por cebado aleatorio con ^{32}P usando un kit de mareaje de ADN seguido de purificación en columna G-50 (Farmacia Biotech., Piscataway, NJ), y después se hibridó con las membranas de ARN transferido en un horno de hibridación (Hybaid, Middlesex, RU). Las membranas hibridadas se expusieron a filtros en placa de imágenes Fuji y se analizaron mediante el analizador Bio-Imaging (Kohshin Graphic Systems, Fuji, Japón).

*Ejemplo 2 - Expresión de *PhyA* en *E. coli*

Cuatro horas después de la inducción, se observó una banda específica (~55 kDa) en SDS-PAGE (12,5 %) de la fracción celular soluble, en comparación con el control transformado sólo con vector de expresión (véanse las Figuras 1 y 2). Esta banda representaba el 3,8 % de la proteína soluble total de esta fracción. Consecuentemente, el análisis de Northern mostró la sobreexpresión de ARNm de *phyA* en estos transformantes de gen fitasa y no se observó señal en las células de control (véase la Figura 3).

Para optimizar la expresión de proteína fitasa, se estudiaron el curso cronológico y los efectos de una serie de factores sobre la expresión. Estos factores incluían la temperatura de incubación (30 y 37 °C), el pH del medio (4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 y 9,0), la anaerobiosis (añadiendo aceite mineral estéril sobre las células en crecimiento), el nivel de fosfato inorgánico en el medio (Dassa, E. *et al.*, "The Acid Phosphatases with Optimum pH of 2.5 of *Escherichia coli*". J. Bio. Chem., 257: 6669-6676 (1982)) y el fitato de sodio (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 mM). Los resultados indicaron que la expresión de proteína fitasa se acumulaba linealmente con el tiempo durante las primeras seis horas después de la inducción (véase la Figura 4). Después de ello, la expresión permaneció relativamente sin cambios aunque las células bacterianas siguieron creciendo. Sólo el pH del medio y la concentración de fitato de sodio afectaron significativamente a la expresión de proteína fitasa. Se mostró un máximo de proteína a pH 6,0 y fitato de sodio 0,3 mM, en que la proteína fitasa aumentó del 3,8 al 9,6 % de la proteína soluble total.

No se detectó actividad fitasa de forma extracelular o intracelular. Esto puede no ser completamente inesperado porque la fitasa nativa de *A. niger* es una glucoproteína con un tamaño de 70-80 kDa (Hartingsveldt *et al.*, "Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*", Gene 127: 87-94 (1993)). La proteína expresada en el sistema de *E. coli* de este estudio tenía un tamaño de aproximadamente 55

kDa. Presuntamente, la ausencia de glucosilación de la proteína y otras modificaciones post-traduccionales necesarias durante la secreción imposibilitarían la actividad fitasa.

*Ejemplo 3 - Expresión de *PhyA* en *S. lividans*

5 Se han expresado genes heterólogos en *S. lividans*, y los productos resultantes se han secretado en el medio con actividad enzimática (Changas, G.S. *et al.*, "Cloning of the *Thermomonospora Fusca* Endoglucanase E2 Gene in *Streptomyces lividans*: Affinity Purification and Functional Domains of the Cloned Gene Product", *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2521-2526 (1988); Wilson, D.B., "Biochemistry and Genetics of Actinomycete Cellulases", *Crit. Rev. Biotechnol.* 12: 45-63 (1992); Jung, E.D. *et al.*, "DNA Sequences and Expression in *Streptomyces lividans* of an Exoglucanase Gene and an Endoglucanase Gene from *Thermomonospora fusca*", *Environ. Microbiol.*, 59: 3032-3043 (1993)). Asimismo, el gen *phyA* se expresó en *S. lividans* y se introdujo la proteína en el medio, como se muestra en una banda específica en las muestras de medio analizadas por SDS-PAGE (véanse las Figuras 5 y 6). Esto sugirió que el péptido señal del gen de endoglucanasa E2 de *T. fusca* era capaz de conducir la proteína fitasa fuera de la célula. Esta proteína era de 57 kDa y representaba el 16,2 % de la proteína total en el medio. Cambiar el pH del medio a 6,0 y añadir fitato de sodio 0,3 mM al medio mejoró la producción de proteína al 20,3 % de la proteína total. Debido a que la proteína fitasa se secretaba al medio a un nivel tan alto, debe ser fácil de purificar y usar de manera eficaz para una diversidad de fines tales como producción de anticuerpo contra fitasa. De nuevo, no se encontró actividad fitasa aumentada ni en el medio ni en las células lisadas. Aunque el tamaño de la proteína aumentó un poco (2-3 %), en comparación con la expresada en *E. coli*, presuntamente debido a la glucosilación de la proteína fitasa en este sistema de expresión, siguió sin haber actividad fitasa.

*Ejemplo 4 - Expresión de *PhyA* en *S. cerevisiae*

25 Se usaron tres péptidos señal diferentes para comparar la eficacia en la conducción de la proteína expresada fuera de las células (véase la Tabla 2). La actividad fitasa aumentó sustancialmente en el medio de Sabouraud-rafinosa en el que crecen los transformantes de pYEP1 y pYPP1, pero no pYXP1. Se mostró proteína fitasa visible por SDS-PAGE 20 horas después de la inducción (Figura 7).

30 Se determinó la expresión de transformantes de pYEP1 y pYPP1 en tres tipos diferentes de medio: Sabouraud-rafinosa (Li, X.L., *et al.*, "Expression of *Aureobasidium pullulans XynA* in, and Secretion of the Xylanase From, *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 209-213 (1996)), Sabouraud-glicerol y un medio YPED para fines generales modificado. En cuanto a los transformantes de pYEP1, se expresó actividad fitasa similar en el medio Sabouraud-rafinosa y Sabouraud, pero no hubo actividad detectada en el medio YPED. En contraposición, la actividad fitasa en el medio cultivado con transformantes de pYPP1 varió en gran medida con los diferentes tipos de medio. La actividad se potenció hasta 375 mU/ml cuando se usó medio Sabouraud-glicerol. La actividad aumentó adicionalmente hasta 1.675 mU/ml cuando se cambió el medio a YEPD (véase la Tabla 3). Aunque el medio YEPD era mucho más barato que el medio Sabouraud-rafinosa, la producción de fitasa aumentó más de diez veces. Por tanto, el supuesto péptido señal del gen de fitasa fúngica conseguía la expresión más eficaz de la actividad fitasa extracelular. Casi toda la proteína producida se secretaba en el medio YEPD, porque se detectaba muy poca actividad en las células de levadura. El curso cronológico de la expresión de fitasa en este sistema se mostró en la Figura 8.

Tabla 3. Actividad fitasa expresada a partir de transformante con pYPP1 en diferentes medios

Medio	Horas después de inducción (mUF/ml) ¹		
	0	10	15
Sabouraud-rafinosa	22	136	146
Sabouraud-glicerol	6	174	375
YEPD	18	1238	1675

45 ¹ Se detectó la actividad fitasa en el sobrenadante de cultivo celular de los tres medios 0, 10 y 15 horas después de inducirse añadiendo galactosa. Véase el texto para la definición de unidades de fitasa.

50 Una diversidad de microorganismos, incluyendo bacilos, levaduras y hongos filamentosos, tienen actividad fitasa, aunque la cepa NRRL3135 de *A. niger* produce la mayor actividad (340 mU/ml, Shieh, T.R. *et al.*, "Survey of Microorganisms for the Production of Extracellular Phytase", *Appl. Environ. Microbiol.*, 16: 1348-1351 (1968)). *Schwanniomyces castellii* CBS 2863 tiene la mayor actividad fitasa entre 21 cepas de levadura (140 mU/ml, Lambrechts, C. *et al.*, "Utilization of Phytate by Some Yeasts", *Biotechnology Letters*, 14: 61-66 (1992)). Claramente, la cepa de levadura recombinante transformada con pYPP1 en el presente estudio produjo actividad fitasa mucho mayor (1.675 mU/ml) que *A. niger* (4 veces) y *S. castellii* CBS 2863 (11 veces). Puede obtenerse producción de fitasa máxima en el sistema optimizando las condiciones de incubación y modificando los casetes plasmídicos (Demolder, J.W. *et al.*, "Efficient Synthesis of Secreted Murine Interleukin-2 by *Saccharomyces cerevisiae*: Influence of 3'-Untranslated Regions and Codon Usage", *Gene*, 111: 207-213 (1992)).

El alto nivel de expresión de actividad fitasa en *S. cerevisiae* era debido lo más probablemente a la suficiente glucosilación de la proteína fitasa y otras modificaciones post-traduccionales por parte de la levadura. Después de concentrar el sobrenadante del medio y someterlo a análisis de SDS-PAGE, hubo una banda con aproximadamente 110 kDa (véanse las Figuras 7 y 9), que era mayor que el tamaño de la proteína nativa de *A. niger* (Hartingsveldt, W. van. *et al.*, "Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*", *Gene* 127: 87-94 (1993)). El análisis de Northern confirmó la sobreexpresión específica de ARNm de *phyA* (véase la Figura 10). Estos resultados indicaron que el sistema de levadura era eficaz para sobreexpresar activamente la enzima fitasa extracelular. El sistema de levadura tiene varias ventajas sobre las bacterias u otros sistemas tales como *A. niger* (Hartingsveldt, W. van. *et al.*, "Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*", *Gene* 127: 87-94 (1993)). Realiza modificaciones post-traduccionales, incluyendo plegamiento apropiado, glucosilación, formación de enlaces disulfuro y proteólisis, durante la translocación de las proteínas a través del retículo endoplasmático y la membrana celular. La secreción de proteínas está facilitada por péptidos señal cortos hidrófobos en las regiones N-terminales de los precursores proteicos (Li, X.L. *et al.*, "Expression of *Aureobasidium pullulans XynA* in, and Secretion of the Xylanase From, *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 209-213 (1996)). Las proteínas secretadas por células de levadura están protegidas de la agregación y la degradación por proteasa. Lo más importante, las proteínas enzimáticas producidas por *S. cerevisiae* se purifican fácilmente, porque secreta sólo unas pocas proteínas. Considerando la bien conocida seguridad de los productos de levadura tanto para seres humanos como para animales, el sistema es de gran potencial para la industria de alimentos humanos y piensos animales.

*Ejemplo 5 - Propiedades de la fitasa PhyA sobreexpresada en *Saccharomyces cerevisiae*

Se concentró la fitasa sobreexpresada a partir de transformantes de plásmido pYPP1 y se usó para estudiar sus propiedades (véase la Tabla 4). La enzima mostró dos intervalos de pH óptimo: 2 a 2,5 y 5,0 a 5,5. Sin embargo, la actividad enzimática a pH 2 a 2,5 fue sólo el 60 % de la actividad a pH 5 a 5,5. No se detectó actividad a pH 1 u 8. El pH óptimo fue casi el mismo que para la fitasa de *A. niger* (Simons *et al.*, "Improvement of Phosphorous Availability By Microbial Phytase in Broilers and Pigs", *Br. J. Nutr.*, 64:525 (1990)), por tanto, sin duda se esperaría función activa en la hidrólisis de P de fitato en los tractos gastrointestinales. La temperatura óptima de la enzima fue de 60 °C, mientras que la corriente en el mercado producida por Gist-Brocades es de 55 °C (BASF, 1996). Más del 80 % de la actividad a permanecía de 50 a 55 °C, pero se detectó poca actividad a 75 u 80 °C. Al calentar la enzima durante 15 min a 37 °C y a 80 °C, la actividad restante de la fitasa de levadura expresada de la presente invención fue del 100 y el 63 %, respectivamente, y para la fitasa de BASF Gist-Brocades fue del 100 y el 52 %, respectivamente. Las diferencias entre las dos fuentes enzimáticas a cualquier temperatura dada fueron significativas (véase la Tabla 5). Por tanto, la fitasa de levadura pareció ser más termoestable que el producto de fitasa comercial actual.

Tabla 4. Características de la fitasa sobreexpresada en levadura¹

pH óptimo ²	
pH	1,0 2,0 2,5 3,0 4,0 5,0 5,5 6,0 8,0
Actividad relativa (%)	0,5 ^e 59,7 ^c 64,8 ^c 48,1 ^d 81,0 ^b 100,0 ^a 95,0 ^a 66,3 ^c 0,8 ^e
	±0,2 ±3 ±6 ±4 ±5 ±1 ±6 ±1 ±0,4
Temperatura óptima ³	
°C	25 37 45 50 55 60 75 80
Actividad relativa (%)	24,2 ^e 44,6 ^d 63,9 ^c 83,6 ^b 89,8 ^b 100,0 ^a 0,6 ^f 0,9 ^f
	±0,8 ±3 ±8 ±2 ±4 ±4 ±0,1 ±0,2

¹ Los datos son medias de actividad relativa ± desviación típica (n= 4). Las medias en una fila con diferentes letras de superíndice difieren (P < 0,05). Se usó el modelo lineal general del sistema de análisis estadístico (1988) para analizar los efectos del tratamiento principal, mientras que se usaron los diseños completos aleatorios y ensayo t de Bonferroni para la comparación de medias de múltiples tratamientos. El nivel de significancia se estableció a P < 0,05.

² Se ensayó la actividad a 37 °C (véase el contexto para la definición de unidad de fitasa). Se usaron diferentes tampones: tampón glicina-HCl 0,2 mM para pH 1,0 a 3,5; tampón citrato de sodio 0,2 mM para pH 4,0 a 6,5; y tampón Tris-HCl 0,2 mM para pH superior a 7.

³ Se determinó la temperatura óptima a pH 5,5 (tampón citrato de sodio 0,2 mM)

Tabla 5. Comparación de la termoestabilidad de fitasa sobreexpresada en levadura y fitasa de Gist-Brocades producida por *A. niger*^{1,2}

Actividad relativa, %	37 °C	80 °C
Fitasa de levadura	100 ^a ±1	63 ^b ±1
Fitasa de <i>A. niger</i>	100 ^x ±3	52 ^y ±2
P ³ <		0,03

¹ Los datos son medias de actividad relativa \pm desviación típica (n= 3). Las medias en una fila con diferentes letras de superíndice difieren (P < 0,05). Se usó el modelo lineal general del sistema de análisis estadístico (1988) para analizar los efectos del tratamiento principal, mientras que se usaron los diseños completos aleatorios y ensayo t de Bonferroni para la comparación de medias de múltiples tratamientos. El nivel de significancia se estableció a P < 0,05.

² Se calentó la enzima durante 15 minutos a diferentes temperaturas antes de hacer reaccionarla a 37 °C y pH 5,5.

³ Significancia (valores P) del ensayo t entre la actividad de las dos fitasas a cada ajuste de temperatura

Aunque no está claro el modo en que dicha mejora en la termoestabilidad está relacionada con diferentes modificaciones post-traduccionales (plegamiento, escisión, glucosilación, etc.), (Li, X.L. *et al.*, "Expression of *Aureobasidium pullulans XynA* in, and Secretion of the Xylanase From, *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 209-213 (1996), que se incorpora por la presente por referencia), es ciertamente ventajoso tener una enzima fitasa más termoestable que puede ser esperanzadoramente resistente al calor durante la peletización del pienso, que es un problema con la fitasa de Gist-Brocades actual.

*Ejemplo 6 - Hidrólisis in vitro de P de fitato de maíz, soja y acemite de trigo por fitasa expresada en levadura

La fitasa expresada en levadura liberaba P de fitato a partir de harina de maíz y soja tan eficazmente como la fitasa de Gist-Brocades en base a la actividad por unidad (véase la Tabla 6). Como se esperaba, la hidrólisis de P de fitato era una función del tiempo y la dosificación de actividad. La fitasa expresada en levadura era también eficaz para liberar P de fitato a partir de acemite de trigo, lo que indica su gran potencial en la fermentación del pan. Debido a que el acemite de trigo usado en este estudio contenía actividad fitasa intrínseca mucho mayor que la harina de trigo usada habitualmente, se esperaba un efecto mucho mayor de la fitasa expresada en levadura sobre la mejora de la hidrólisis de P de fitato de harina y en la liberación de elementos traza, cuando se use en una panadería (Hall, M.N. *et al.*, "The Early Days of Yeast Genetics", *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1993), que se incorpora por la presente por referencia).

Tabla 6. Fósforo libre liberado a partir de harina de maíz, soja (SMB) y acemite de trigo por fitasa sobreexpresada en levadura y fitasa fúngica de *A. niger* in vitro¹

Fitasa de levadura (UF/kg)	0	100	250	500	1000	250 (fitasa fúngica)
Maíz: 1 hora	0,23 ^d ±0,03	0,64 ^c ±0,08	1,14 ^b ±0,18	1,46 ^a ±0,04	1,54 ^a ±0,04	1,16 ^b ±0,15
4 horas	0,36 ^c ±0,02	1,26 ^b ±0,04	1,60 ^a ±0,03	1,66 ^a ±0,06	1,72 ^a ±0,04	1,68 ^a ±0,04
SBM: 1 hora	0,68 ^d ±0,01	1,18 ^{cd} ±0,02	1,62 ^c ±0,18	2,48 ^b ±0,32	3,13 ^a ±0,19	1,68 ^c ±0,2
4 horas	0,73 ^d	1,67 ^c	2,69 ^b	3,41 ^a	3,71 ^a	2,78 ^b
Acemite de trigo:						
1 hora		3,56±0,39	4,11±0,64	4,67 ² ±0,05		
4 horas		5,63±0,5	6,02±0,48	6,38 ² ±0,07		

¹ Cada muestra de 5 g se agitó en 20 ml de tampón citrato de sodio 0,2 mM a 37 °C durante 1 ó 4 horas. Se obtuvo el sobrenadante centrifugando durante 15 minutos a 8.000 g. Después de pasarla a través de un papel de filtro Whatman 541, la muestra se sometió a ensayo de P libre mediante el método de Chen, P.S. *et al.*, "Microdetermination of P", *Anal. Chem.*, 28: 1756-1758 (1956), que se incorpora por la presente por referencia. Los datos en la tabla son medias de actividad relativa \pm desviación típica (n=4). Se usó el Modelo Lineal General del Sistema de Análisis Estadístico (1988) para analizar los efectos del tratamiento principal, mientras que se usaron diseños completos aleatorios y ensayo t de Bonferroni para la comparación de medias de múltiples tratamientos. El nivel de significancia se estableció a P < 0,05. Existía una diferencia significativa entre 1 y 4 horas para cada pienso a cada dosis de enzima analizada mediante ensayo t. Las medias en una fila con diferentes letras de superíndice difieren (P < 0,05).

² n=2

Se comparó la sobreexpresión de fitasa de *Aspergillus niger* (*phyA*) en *Escherichia coli*, *Streptomyces lividans* y *Saccharomyces cerevisiae* para desarrollar un sistema eficaz y sencillo para producir fitasa de manera económica. Se expresó en *E. coli* una proteína intracelular soluble de 55 kDa, que representaba el 9,6 % de la proteína soluble total, usando el sistema pET25b(+). Se expresó en *S. lividans* una proteína extracelular de 57 kDa, que representaba el 20,3 % de la proteína total en el medio, usando un plásmido lanzadera que contenía el promotor pLT1 y el péptido líder Spell de endoglucanasa E2. No se demostró aumento en la actividad fitasa en ningún sistema de expresión, presuntamente debido a la ausencia de glucosilación y otras modificaciones post-traduccionales necesarias. En contraposición, se produjo una alta actividad fitasa extracelular en *S. cerevisiae* transformada con el gen *phyA*. Se compararon tres péptidos señal diferentes y tres tipos diferentes de medio para identificar el mejor vector de expresión y las mejores condiciones. El uso del péptido señal Sphy del gen *phyA* y el medio YEPD produjeron la actividad fitasa extracelular mayor. La fitasa sobreexpresada en levadura era de aproximadamente 110 kDa, tenía

dos óptimos de pH: 2,0 a 2,5 y 5,5 a 6,0, y la temperatura óptima era de 60 °C.

Ejemplo 7 - Métodos y materiales para la expresión de phyA en *Pichia*

- 5 **Hospedador y vector.** Se adquirió un kit de expresión en *Pichia* EasySelect™ de Invitrogen (San Diego, CA). El kit proporciona hospedadores y vectores para expresar el gen de forma intracelular o extracelular, en cepas Mut⁺ o Mut^s (utilización de metanol normal o lenta). Se usó X33 como cepa Mut⁺ y KM71 como cepa Mut^s. Se usaron dos vectores, pPICZ B (3,3 kb) y pPICZαA (3,6 kb), ambas usan AOX1 como promotor.
- 10 **Construcción de los vectores de expresión.** Para comparar el efecto de diferentes péptidos señal sobre la expresión de PhyA en el sistema de *Pichia*, se prepararon dos construcciones. En primer lugar, se ligó un fragmento EcoRI-KpnI de 1,4 kb, que contenía la secuencia PhyA que codifica la proteína fitasa madura, en pPICZαA. En este plásmido (pPICZα-phyA), PhyA estaba conducido por un factor alfa, un péptido señal usado muy generalmente de *Saccharomyces cerevisiae*. En segundo lugar, se ligó un fragmento KpnI-XbaI de 1,4 kb de pYPP1 en el vector (la
- 15 región codificante de phyA estaba conducida por su propio péptido señal, que era muy eficaz para secretar la fitasa expresada en *Saccharomyces cerevisiae*).

- Transformación y expresión.** Se linealizaron las construcciones confirmadas mediante Pmel y se transformaron en GS115 y KM71, mediante EasyComp™ proporcionado por el kit. Se usó Neocin™ para seleccionar las colonias
- 20 positivas. Después de inocular una sola colonia en 10 ml de medio MGY y cultivar hasta DO₆₀₀ de 2-6 a 30 °C, se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en 10 ml de medio MMY (que contenía metanol al 0,5 %). Se recogieron las muestras cada 12 o 24 h después de la inducción. Se separaron las células del sobrenadante y se lisaron con perlas de vidrio en tampón de rotura. Se ensayó la actividad fitasa en el sobrenadante y las células como se ha descrito previamente. Se realizaron SDS-PAGE y transferencia de Western para determinar el tamaño y
- 25 la cantidad relativa de la proteína expresada.

Ejemplo 8 - Actividad fitasa de PhyA en *Pichia

- Se transformó la construcción de expresión usando factor alfa como péptido señal para *phyA* en dos cepas de
- 30 *Pichia*. KM71 es una cepa de utilización lenta de metanol, mientras que X33 es una *Pichia* no mutante que utiliza eficazmente el metanol. La exploración y la incubación se realizaron en matraces de agitación de 10 ml a 29-30 °C. Para los transformantes de KM71, 19 de 20 colonias picadas tenían actividad fitasa extracelular mayor de 6 unidades/ml de sobrenadante de cultivo después de inducción durante 24 horas. La colonia N° 13 mostró la actividad mayor, de 26 unidades/ml después de incubación durante 108 horas. Para los transformantes de X33, todas las
- 35 colonias (20/20) tenían más de 10 unidades/ml después de inducción durante 24 horas. Una de las colonias (N° 101) produjo una actividad fitasa de 65 unidades/ml de sobrenadante. Se resumió en la Figura 11 un estudio del curso cronológico de la expresión de fitasa en KM71 y X33. A pesar de la diferencia de estas dos cepas en la utilización de metanol y, por lo tanto, la capacidad de expresar fitasa, se encontró que el factor alfa se procesaba correctamente por las células de levadura. Además, casi toda la proteína expresada se secretó en el medio, ya que no se encontró
- 40 más de un 5 % de la actividad total expresada de forma intracelular.

- Se estudiaron los efectos del fósforo inorgánico y del pH de los medios sobre la expresión de fitasa en los medios (BMGY y BMMY) usando un recombinante de *phyA* de X33 (N° 101). El medio que contenía fosfato 50 mM produjo
- 45 la actividad fitasa mayor, 66 unidades/ml a las 168 horas después de la inducción. Al incluir fosfato 50 mM en los medios, se estudió también el efecto de diferentes pH de este tampón (3, 4, 5, 6, 7 y 8) sobre la expresión. Cuando el pH era 6, este transformante X33 produjo 75 unidades de fitasa/ml de sobrenadante. En base a la concentración de proteína y el análisis de SDS-PAGE, se estimó que la producción de proteína fitasa en expresión estaba entre 3 y 4 mg/ml.

Ejemplo 9 - Propiedades de la fitasa PhyA expresada en *Pichia

- Tamaño molecular y desglucosilación de la fitasa expresada.** Después de someter el sobrenadante del medio inoculado con el transformante de *phyA* a SDS-PAGE, se observó una fuerte banda aproximadamente a 95 kDa
- 55 (Figura 12). Esta fue casi la única proteína observada en el sobrenadante. La fitasa expresada reaccionaba eficazmente con el anticuerpo policlonal de conejo creado contra fitasa nativa purificada de *A. niger*. Esto indicaba que la inmunorreactividad de la fitasa expresada era esencialmente la misma que la de la fitasa nativa de *A. niger*. El tamaño se redujo a 50 kDa mediante desglucosilación usando Endo H. El anticuerpo contra *phyA* reaccionó también con la fitasa desglucosilada. Además, la desglucosilación, realizada en condiciones nativas, redujo la actividad fitasa aproximadamente un 15 %, lo que indica que la glucosilación era importante para la actividad de las fitasas.
- 60 Además, la glucosilación afectó a la termoestabilidad de las enzimas (Figura 13).

Análisis de Northern. Como se muestra en la Figura 14, una sonda de ADN de *phyA* de 1,3 kb hibridó con el ARNm de los transformantes inducidos tanto de KM71 (N° 13) como de X33 (N° 101). Se observó también respuesta de los transformantes antes de la inducción. Probablemente, la expresión de *phyA* en este sistema no estaba controlada

estrictamente a nivel de transcripción.

pH y temperatura óptimos e hidrólisis de fósforo de fitato. De forma similar a la fitasa de *A. niger*, la fitasa expresada tenía dos pH óptimos, 2,5 y 5,5 (Figura 15). La temperatura óptima de la fitasa expresada era de 60 °C (Figura 16). Cuando se incubó la fitasa expresada con muestras de soja a 100, 200, 400, 800 mU/g de muestra a 37 °C, el fósforo se liberaba de modo lineal con la dosis de fitasa (Figura 17).

Ejemplo 10 - Métodos y materiales para la sobreexpresión del gen *appA* de *E. coli* en *Saccharomyces cerevisiae*

Gen y proteína. Este gen, definido originalmente como gen de la fosfoanhidrido fosfohidrolasa periplásmica de *E. coli* (*appA*), contiene 1.298 nucleótidos (número de acceso a GenBank: M58708). Se encontró primero que el gen codificaba una proteína fosfatasa acida de pH óptimo de 2,5 (EcAP) en *E. coli*. La fosfatasa acida es un monómero con una masa molecular de 44.644 Da. La EcAP madura contiene 410 aminoácidos (Dassa, J. *et al.*, "The Complete Nucleotide Sequence of the *Escherichia coli* Gene *appA* Reveals Significant Homology Between pH 2.5 Acid Phosphatase and Glucose-1 Phosphatase", *J. Bacteriology*, 172: 5497-5500 (1990), que se incorpora por la presente por referencia). Ostanin, K. *et al.*, "Overexpression, Site-Directed Mutagenesis, and Mechanism of *Escherichia coli* Acid Phosphatase", *J. Biol. Chem.*, 267: 22830-22836 (1992), que se incorpora por la presente por referencia), sobreexpresaron *appA* en BL21 de *E. coli* usando un vector pT7, y aumentaron su actividad fosfatasa acida en aproximadamente 400 veces (440 mU/mg de proteína).

Se adquirieron el gen y una cepa de *E. coli* CU 1869 (N° 47092) hospedadora en la ATCC. El gen, un inserto de 1,3 kb, se transformó en la cepa BL21 de *E. coli* (N° 87441) usando un vector de expresión pAPPA1 (Ostanin, K. *et al.*, "Overexpression, Site-Directed Mutagenesis, and Mechanism of *Escherichia coli* Acid Phosphatase", *J. Biol. Chem.*, 267: 22830-22836 (1992), que se incorpora por la presente por referencia).

Hospedador y vector. El vector para sobreexpresar el gen *appA* en *Saccharomyces cerevisiae* fue pYES2 y el hospedador fue INVScI (Invitrogen, San Diego, CA).

Construcción del vector de expresión. Inicialmente, se aisló un fragmento XbaI de 1,3 kb a partir de pAPPA1. Este fragmento contenía el gen *appA* con su propio péptido señal. Después de ligarse al sitio XbaI de pYES2, se transformó la construcción (pYES2-*appA*) en *Saccharomyces cerevisiae*. Pero no se aumentó la actividad fitasa en las partes extra o intracelulares, en comparación con los controles. pAPPA1 y pYPP1 (PhyA y su péptido señal en pYES2) se cotransformaron en la cepa de levadura. De nuevo, no se detectó aumento en la actividad fitasa debido a pAPPA1 en los medios o las células de levadura.

Se sintetizaron dos cebadores para construir el péptido señal del gen PhyA con la región codificante del gen *appA*. Uno era de 80 pb de longitud y contenía el péptido señal de PhyA y un sitio KpnI en el extremo 5': GGG GTA CCA TGG GCG TCT CTG CTG TTC TAC TTC CTT TGT ATC TCC TGT CTG GAG TCA CCT CCG GAC AGA GTG AGC CGG AG (SEC ID N° 9). El otro cebador era de 24 pb de longitud, con un sitio EcoRI en su extremo 3': GGG AAT TCA TTA CAA ACT GCA GGC (SEC ID N° 10). Se realizó la PCR durante 25 ciclos, con 1 min de desnaturalización a 95 °C, 1 min de hibridación a 58 °C y 1 min de extensión de cadena a 72 °C. Se amplificó el fragmento de 1,3 kb, se digirió y se ligó en pYES2. Después de confirmar el inserto mediante mapeado de restricción, se transformó el construcción (pYES2-SphyA-*appA*) en INVScI mediante el método de acetato de litio.

Expresión. Se inocularon los transformantes seleccionados en medio YEPD. Se indujo la expresión añadiendo galactosa al cultivo después de que la DO₆₀₀ alcanzara 2, como se ha descrito previamente. Se recogieron las células 15 ó 20 h después de la inducción.

Ensayo de actividad. Se ensayó la actividad fosfatasa acida a 37 °C en tampón glicina-HCl 25 mM (pH 2,5) usando fosfato de *p*-nitrofenilo como sustrato (solución madre 250 mM). Se añadieron 1,7 ml de tampón de reacción a muestras de 0,1 ml. Después de incubarse durante 5 min en baño de agua a 37 °C, se añadieron 0,2 ml del sustrato precalentado y se mezclaron. Se transfirió la solución de reacción a una cubeta precalentada y se incubó durante 2 min en un compartimento espectrofotométrico a 37 °C. Se leyó continuamente el *p*-nitrofenol liberado durante 5 min a 405 nm para el cálculo de la actividad enzimática.

Estudio in vitro. Se suspendió harina de soja (5,0 g) en 20 ml de tampón citrato 20 mM, pH 5,5, se mezcló con 200 mU de fitasa y se incubó a 37 °C durante 4 h con agitación continua. Después de enfriar en hielo durante 10 min, se transfirió la suspensión a un tubo de centrifuga y se centrifugó durante 15 min a 15.000 x g. Se usó el sobrenadante para determinar el fósforo libre.

Ejemplo 11 - Cuantificación de la actividad fitasa a partir de la sobreexpresión del gen *appA* de *E. coli* en *Saccharomyces cerevisiae*

La actividad fosfatasa ácida intracelular en la *E. coli* que sobreexpresaba *appA* (pAPPA1) fue de 440 mU/mg de proteína. Se encontró una actividad fitasa intracelular sin precedentes mayor de 4.900 mU/mg de proteína en la cepa transformada. Sin embargo, había sólo una actividad fitasa mínima en el control (BL21). Por tanto, este gen de fosfatasa ácida codifica también una fitasa. La secuencia del gen *appA* se alineó con la de PhyA y se encontró que estos dos genes compartían un 23 % de identidad.

La transformación de INVScI con la construcción de pYES2-Sphy-*appA* (conducida por el péptido señal de PhyA) produjo un actividad fitasa extracelular en el sobrenadante que fue 2.000 veces mayor que las no mutantes o del transformante que contiene el gen *appA* más su propio péptido señal (véase la Tabla 7).

Tabla 7. Actividad fitasa extracelular en transformantes del gen *appA* con diferentes péptidos señal

Construcción	Señal	Actividad (U/ml)	Actividad (mU/mg proteína)
pYES- <i>appA</i>	<i>appA</i>	Indetectable	Indetectable
pYES2-SphyA- <i>appA</i>	PhyA	1.158	445

Se presentan en la Tabla 8 los efectos del fósforo inorgánico, fitato, pH y temperatura del medio (YEPD) sobre la expresión de la actividad fitasa por pYES2-SPhy-A-*appA*. La mayor actividad fue de 2.286 mU/ml (633 mU/mg de proteína) en las condiciones óptimas.

Tabla 8. Efecto de las diferentes condiciones en el medio YEPD sobre la expresión de actividad fitasa de pYES2-SphyA-*appA* en levadura

Condiciones del medio	Actividad (mU/ml)
Fósforo, mg/100 ml	
0	1402
1	714
5	722
10	456
Fitato de sodio, g/100 ml	
0	870
0,1	1019
1,0	1748
pH	
5,0	892
7,0	996
8,0	2286
Temperatura, °C	
25	312
30	1036
37	996

La termoestabilidad de la actividad fitasa extracelular sobreexpresada producida por el transformante de levadura fue mayor que la de la fitasa intracelular producida por *E. coli* transformada con pAPPA1 (véase la Tabla 9). El calentamiento de la fitasa extracelular durante 15 min a 80 °C dio como resultado un 30 % de pérdida de su actividad fitasa, mientras que se perdió casi toda la actividad fitasa de *E. coli* en las mismas condiciones.

Tabla 9. Efecto del calentamiento de diferentes fuentes de fitasa a 80 °C durante 15 min sobre sus actividades

Fitasa	Actividad relativa después de calentamiento, %
<i>appA</i> en <i>E. coli</i>	0,1
<i>appA</i> en <i>S. cerevisiae</i>	69
PhyA en <i>S. cerevisiae</i>	66
fitasa de BASF	50

Se presentan en la Tabla 10 las comparaciones del efecto sobre la liberación de fósforo a partir de harina de soja por las fitasas (200 mU) de *E. coli*, AppA sobreexpresado en levadura y BASF. Los resultados indican que las tres fuentes de fitasas liberaron fósforo de fitasa eficazmente a partir de harina de soja.

Tabla 10. Fósforo libre liberado a partir de harina de soja mediante diferentes fuentes de fitasas

Fitasa	Fósforo (mg/g)
<i>appA</i> en <i>E. coli</i>	1,11
<i>appA</i> en <i>S. cerevisiae</i>	0,69
BASF	0,87

El gen *appA* de *E. coli* (fosfatasa acida), cuando se expresa en *Saccharomyces cerevisiae*, produce una actividad fitasa extracelular en los medios que era más de 2.000 veces mayor que el control. La fitasa sobreexpresada libera eficazmente el fósforo de fitato a partir de la harina de soja, y parece ser más termoestable que la fitasa comercial actualmente disponible o la fitasa intracelular producida en *E. coli* por el mismo gen (*appA*).

Ejemplo 12 - Métodos y materiales para sobreexpresar el gen *appA* de *E. coli* que codifica una fosfatasa ácida/fitasa en *Pichia pastoris*

Gen y proteína. Se obtuvieron el gen *appA* y la cepa CU 1867 de *E. coli* (Nº 47092) hospedadora de la ATCC. Se transformó el gen, un inserto de 1,3 kb, en la cepa BL21 de *E. coli* (Nº 87441) utilizando un vector de expresión pAPPA1 (Ostanin, K. *et al.*, "Overexpression, Site-Directed Mutagenesis, and Mechanism of *Escherichia coli* Acid Phosphatase" *J. Biol. Chem.*, 267: 22830-36 (1992), que se incorpora por la presente por referencia).

Hospedador y vector. Se obtuvo un kit de expresión de *Pichia EasySelect™* de Invitrogen (San Diego, CA). El kit proporciona hospedadores y vectores para expresar el gen de forma intracelular o extracelular en una cepa no mutante (X-33). Se usaron dos vectores, pPICZ B (3,3 kb) y pPICZαA (3,6 kb), ambos usan AOX1 como promotor.

Construcción del vector de expresión. Se usaron dos cebadores para amplificar el gen *appA* de pAPPA1 y se produjeron dos sitios de restricción EcoRI y KpnI en los extremos 5' y 3', respectivamente.

Cebador cadena arriba: GGA ATT CCA GAG TGA GCC GGA (SEC ID Nº 11)

Cebador cadena abajo: GGG GTA CCT TAC AAA CTG CAC G (SEC ID Nº 12)

Molde: ADN de pAPPA1 aislado de ATCC 87441

Se ejecutó la PCR durante 30 ciclos, con 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de hibridación a 55 °C, y 1 min de extensión de cadena a 72 °C. Se amplificó un fragmento de 1.245 pares de bases, se digirió con EcoRI y KpnI y se ligó (16 °C durante una noche) en pPICZ B (3,3 kb) y pPICZαA (3,6 kb). Se confirmó el ligamiento mediante mapeado de restricción después de transformar las construcciones en DH5α.

Transformación de la construcción en *Pichia* (X33). Para cada transformación, se prepararon y linealizaron 100 µg de ADN plasmídico mediante digestión con PmeI. Después de la linealización, se purificó el ADN y se resuspendió en 10 µl de agua estéril desionizada. Se usó realmente la mitad del ADN para cada transformación. Se usaron tanto electroporación como el kit químico EasyComp (Invitrogen) para transformar el ADN en X33. En el caso de electroporación, se usaron un Electro Cell Manipulator (ECM 600, Gentromics, BTX Instrument Division, San Diego, CA 92121) y cubetas de 2 mm. La resistencia fue de 186 ohmios, el voltaje de carga de 1,5 kilovoltios y la duración real de carga fue de aproximadamente 7 milisegundos. Se incubaron las células electroporadas en placas de agar YPD que contenían 100 mg de zeocina/ml a 30 °C durante 2-4 días para el crecimiento de colonias. En el caso de transformación química, las células se cultivaron en placas de agar YPDS que contenían 100 mg de zeocina/ml. En comparación con la electroporación, el método químico tenía menor eficacia de transformación.

Expresión. Se inocularon colonias individuales en 10 ml de medio MGY (tubo de 30 ml) y se cultivaron (16-18 h) hasta DO₆₀₀ de 5-6 a 28-30 °C en una incubadora de agitación (200 rpm). Se recogieron las células mediante centrifugación (2.000 rpm) y se resuspendieron en 10 ml de medio BMMY (que contenía metanol al 0,5 %) para inducir la expresión. Se recogieron las muestras (200 µl) cada 12 o 24 horas después de la inducción. Se añadió metanol (100 %) a 100 µl cada 24 horas para mantener una concentración del 0,5-1 % en los medios.

Ensayos. Se separaron las células de los medios (sobrenadante) y se lisaron con perlas de vidrio en tampón de rotura. Se ensayaron la actividad fitasa extracelular en el sobrenadante y la actividad fitasa intracelular en las células lisadas como se ha descrito previamente (tampón citrato 0,2 M, pH 5,5 a 37 °C, usando fitato de sodio 10 mM). Se ensayó la actividad fosfatasa acida a 37 °C en tampón glicina-HCl 25 mM (pH 2,5) usando fosfato de *p*-nitrofenilo como sustrato (solución madre 250 mM). Se añadieron 1,7 ml de tampón de reacción a muestras de 0,1 ml. Se leyó continuamente el *p*-nitrofenol liberado durante 5 min a 405 nm para el cálculo de la actividad enzimática. Se realizó SDS-PAGE (12 %) para determinar el tamaño y la cantidad relativa de la proteína expresada. Se determinaron el pH y la temperatura óptimos de la fitasa expresada como se describe en los resultados.

Estudio in vitro. Se suspendió harina de soja (5,0 g) en 20 ml de tampón citrato 20 mM, pH 5,5, se mezcló con niveles diferentes de fitasa y se incubó a 37 °C durante 4 h con agitación continua. Después de enfriar en hielo

durante 10 min, se transfirió la suspensión a un tubo de centrifuga y se centrifugó durante 15 min a 15.000 x g. Se usó el sobrenadante para determinar el fósforo libre.

Ejemplo 13 - Exploración de la actividad fitasa de colonias para *Pichia pastoris* que sobreexpresa el gen *appA* de *E. coli*

X33 de *Pichia* no mutante produce actividad fitasa intracelular (< 0,03 U/mg de proteína) o extracelular (< 0,05 U/ml) mínima. Las células X33 transformadas con el gen *appA* insertado en pPICZB (sin el factor α y presumiblemente produce fitasa intracelular) no mostraron ningún aumento de la actividad fitasa (extracelular 0,2 U/ml e intracelular 0,05 U/mg de proteína).

Transformar células X33 con la construcción de pPIZ α A-*appA* (conducida por el péptido señal del factor α) produjo actividad fitasa extracelular en los medios. Inicialmente, se exploraron 72 colonias. Sólo dos colonias tenían actividad < 1 U/ml 40 horas después de la inducción. La mayoría de las colonias tenían actividad en el intervalo de 10 a 20 U/ml 40 horas después de la inducción. Todas, las 70 colonias tenían actividad fitasa > 80 U/ml 118 horas después de la inducción. La actividad fitasa más alta detectada hasta ahora fue de 215 U/ml 192 horas después de la inducción (véase la Tabla 11).

Tabla 11. Intervalo de actividad fitasa extracelular en colonias X33 transformadas con pPIZ α A-*appA* 40 y 118 horas después de la inducción

Número de colonias	40 horas después de la inducción	118 horas después de la inducción
2	< 1 U/ml	
6	1 a 10 U/ml	
36	11 a 20 U/ml	
28	> 20 U/ml	
70		> 80 U/ml

Se compararon las actividades fitasa y fosfatasa ácida en el transformante que expresaba 215 U de actividad fitasa/ml con las no mutantes de X33 (192 horas después de la inducción) (véase la Tabla 12). Casi toda la proteína fitasa expresada se secretó de las células, lo que indica que el factor α era un péptido señal muy eficaz para la secreción de fitasa.

Tabla 12. Actividades fitasa y fosfatasa ácida en el transformante pPIZ α A-*appA* y el no mutante de X33 192 horas después de la inducción

	X33 no mutante		Transformante pPIZ α A- <i>appA</i>	
	Extracelular U/ml	Intracelular U/mg de proteína	Extracelular U/ml	Intracelular U/mg de proteína
Litasa		0,05	215	0,5
Fosfatasa ácida		0,01	5,88	0,9

Los transformantes de *E. coli* con el mismo gen *appA* de fosfatasa acida tenían actividad fitasa intracelular de 5 U/mg de proteína (Ostaniin, K. *et al.*, "Overexpression, Site-Directed Mutagenesis, and Mechanism of *Escherichia coli* Acid Phosphatase", *J. Biol. Chem.*, 267: 22830-22836 (1992), que se incorpora por la presente por referencia). La transformación del gen *PhyA* en *A. niger* produjo una actividad extracelular de 7,6 U/ml (Hartingsveldt *et al.*, "Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*", *Gene* 127: 87-94 (1993), que se incorpora por la presente por referencia). En comparación con estos resultados, el sistema de expresión de fitasa en *Pichia* es un sistema de expresión muy eficaz.

Ejemplo 14 - Curso cronológico de la expresión de fitasa

Hubo un aumento lineal de la actividad fitasa extracelular en los medios en casi todas las colonias seleccionadas hasta 192 horas después de la inducción. La Figura 18 resume los cambios de actividad de cinco colonias seleccionadas de 24 a 163 horas después de la inducción.

Ejemplo 15 - Efectos del pH del medio sobre la expresión de fitasa (colonia Nº 23, actividad 136 U/ml a las 186 h)

Usando medios tamponados con fosfato 0,1 M, se estudiaron los efectos de diferentes pH sobre la producción de fitasa extracelular en los transformantes frente a un medio de control sin tampón (pH 7,0). El medio tamponado a pH 6 produjo la actividad fitasa más alta (véase la Figura 19).

Ejemplo 16 - Tamaño de la fitasa extracelular expresada

Usando análisis de SDS-PAGE (gel al 12 %), se observó una banda clara en el sobrenadante del medio de cultivo inoculado con tres colonias diferentes (véase la Figura 20). El tamaño era de aproximadamente 55 kDa, probablemente parcialmente glucosilado. Debido a que la proteína expresada representaba casi la única banda visible en el sobrenadante, sería conveniente recoger el producto enzimático sin necesidad de una purificación tediosa.

Ejemplo 17 - pH y temperatura óptimos de la fitasa extracelular expresada (colonia N° 23)

El pH óptimo de la fitasa expresada fue de 2,5 a 3,5 (véase la Figura 21). Éste es significativamente diferente del de la fitasa *phyA* de *A. niger* (BASF) o de nuestros otros sistemas de expresión. Es ideal para la función de la fitasa al pH del estómago.

La temperatura óptima de la enzima expresada fue de 60 °C (véase la Figura 22).

Ejemplo 18 - Efecto de la fitasa expresada sobre la hidrólisis de fósforo de fitato a partir de harina de soja

Esta fitasa de *E. coli* sobreexpresada (colonia N° 23) hidrolizó eficazmente el fósforo de fitato a partir de harina de soja (véase la Figura 23). La liberación de fósforo libre en la mezcla fue lineal de 0 a 800 mU de fitasa/g de pienso.

Ejemplo 19 - Efectos de la fitasa AppA de *E. coli* expresada por *Pichia pastoris* sobre la biodisponibilidad de fósforo de fitato en cerdos destetados

Para determinar los valores nutricionales de la fitasa de *E. coli* expresada por *Pichia* en las dietas de cerdos, se comparó la eficacia de esta nueva fitasa con las del fósforo inorgánico o la fitasa microbiana disponible en el mercado (Natuphos™, BASF Corp., Mt. Olive, NJ). Se seleccionaron cuarenta y ocho cerdos destetados de cerdas múltiparas en la Cornell Swine Research Farm. Se destetaron los cerdos a los 21 días de edad y se alimentaron con un pienso fluido comercial hasta el día 28. Se dispusieron después dos por pocilga, con seis pocilgas asignadas aleatoriamente por tratamiento. Se les dio dos semanas a los cerdos para ajustarse a la dieta basal de harina de maíz-soja (Tabla 13).

Tabla 13. Fomulación de dietas experimentales para cerdos

Ingrediente	+C % dieta	-C % dieta	FL % dieta	FM % dieta
Maíz	60,50	61,57	61,07	61,07
Concentrado de proteína de suero	3	3	3	3
SBM al 44 %	30	30	30	30
Aceite de maíz	3	3	3	3
Cal	0,8	0,93	0,93	0,93
Fosfato de dicalcio	1,2	0	0	0
Vitamina y premezcla mineral	0,5	0,5	0,5	0,5
Premezcla ECAP	0	0	0,5	0
Premezcla FM	0	0	0	0,5
Sal	0,5	0,5	0,5	0,5
CSP 250	0,5	0,5	0,5	0,5
Total	100	100	100	100
CP	20,6	20,6	20,6	20,6
Ca	0,73	0,47	0,47	0,47
P _{total}	0,6	0,39	0,39	0,39

Nota: Todas las premezclas utilizan maíz como vehículo

Vitamina y premezcla mineral suministra: 2.540 UI de vit A, 660 UI de vit. D, 15 UI de vit. E, 2,2 mg de vit K, 3,3 mg de riboflavina, 13,2 mg de ácido pantoténico, 17,6 mg de niacina, 110,1 mg de colina, 1,98 ug de B-12, 37,4 mg de Mn, 0,6 mg de I, 10 mg de Cu, 0,3 mg de Se, 100 mg de Zn y 100 mg de Fe por kg de dieta

Después, cada pocilga recibió una de las cuatro dietas de tratamiento. El grupo de control positivo (+C) recibió la dieta basal suplementada con fosfato de dicalcio. El grupo de control negativo (-C) recibió sólo la dieta basal. El grupo de fitasa de levadura (FL) recibió la dieta basal suplementada con la fitasa de *E. coli* expresada a 1.200 U/kg

de pienso. El grupo de fitasa microbiana (FM) recibió la dieta basal suplementada con la fitasa de BASF a 1.200 U/kg de pienso. Se les dio libre acceso a pienso y agua a los cerdos. Se registró semanalmente la ganancia de peso corporal de los cerdos individuales. Se registró diariamente la ingesta de pienso diaria de las pocilgas individuales. Se tomaron semanalmente muestras de sangre de cada uno de los cerdos individuales para ensayar las concentraciones de fósforo inorgánico en plasma. Se presentan en la Tabla 14 los resultados de peso corporal (PC), ganancia diaria media (GDM), ingesta de pienso media (IPM), relación pienso/ganancia (P:G) y fósforo inorgánico plasmático (PP).

Tabla 14. Resumen de PP, PC, GDM, IPM y P:G logrados por fitasa dietética, de cerdos¹

	+C	-C	FL	FM
Inicial				
PP	12,99	13,02	13,07	13,54
PC	11,54	11,63	12	11,5
Semana 1				
PP	10,83 ^A	6,48 ^C	8,59 ^B	8,35 ^B
PC	14	13,83	14,29	13,92
GDM	0,351	0,316	0,327	0,345
IPM	0,700	0,684	0,697	0,697
P:G	2,04	2,20	2,18	2,13
Semana 2				
PP	9,76 ^A	5,64 ^D	8,72 ^B	7,84 ^C
PC	18,04	17,42	17,83	17,71
GDM	0,578	0,512	0,506	0,542
IPM	0,833	0,855	0,784	0,837
P:G	1,46 ^B	1,67 ^A	1,56 ^{AB}	1,55 ^{AB}
Semana 3				
PP	11 ^A	6,26 ^C	8,64 ^B	8,13 ^B
PC	22,58	21,17	22	22,21
GDM	0,649 ^A	0,536 ^B	0,595 ^{AB}	0,643 ^{AB}
IPM	1,166	1,02	1,001	1,003
P:G	1,8	1,92	1,71	1,36
Semana 4				
PP	10,94 ^A	6,31 ^C	9,65 ^B	9,2 ^B
PC	27,54	25,29	27,79	27,38
GDM	0,708 ^{AB}	0,589 ^B	0,827 ^A	0,738 ^{AB}
IPM	1,395 ^A	1,049 ^B	1,309 ^A	1,273 ^{AB}
P:G	1,98	1,87	1,59	1,73

¹ Los números en la misma fila sin compartir una letra común son significativamente diferentes

El análisis de la diferencia se realizó con los ensayos t de Bonferroni (Dunn) con alfa = 0,05 y df = 20

Además, hubo deficiencias graves de fósforo en el grupo de control negativo al final del experimento de cuatro semanas. Sin embargo, no hubo signos de deficiencia de fósforo en los otros tres grupos. Claramente, la fitasa de *E. coli* expresada por *Pichia* era al menos igual de eficaz, si no más, que la fitasa microbiana comercial en la mejora de la biodisponibilidad del fósforo de fitato a partir de dietas de harina de maíz-soja para cerdos destetados. Puede usarse para reemplazar el suplemento de fósforo inorgánico para cerdos destetados.

Ejemplo 20 - Efectos de la fitasa AppA de *E. coli* expresada por *Pichia pastoris* sobre la biodisponibilidad de hierro (Fe) y fósforo de fitato en cerdos destetados

Para determinar el efecto de la fitasa de *E. coli* sobreexpresada por *Pichia* sobre la biodisponibilidad de Fe unido a fitato dietético para cerdos destetados, se seleccionaron 20 cerdos anémicos (de 21 días de edad y 7,3 g de hemoglobina (Hb)/dl de sangre). Se alimentaron los cerdos con un pienso fluido deficiente en Fe durante 7 días y se albergaron en jaulas metabólicas a la edad de 28 días. Después los cerdos se alimentaron con las dietas experimentales a la edad de 35 días durante 5 semanas. Las dietas de tratamiento fueron las siguientes: dieta basal deficiente en Fe (-C, con fósforo inorgánico añadido), dieta suplementada con Fe (+C), dieta deficiente en Fe y fósforo suplementada con la fitasa de *E. coli* expresada (FL) o la fitasa microbiana comercial (BASF, FM) a 1.200 U/kg de pienso. Se determinaron semanalmente el peso corporal (PC), el volumen de células empaquetadas (VCE), Hb y fósforo inorgánico en plasma (PP). Los resultados se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15. Resumen de VCE, Hb, PC y PP logrados por fitasa dietética de cerdos¹

	+C	-C	FL	FM
Inicial				
VCE	25	25	26	24
Hb	7,73	7,22	7,85	7,08
PC	8,14	8,27	8,17	7,45
PP	7,92	7,76	7,21	7,36
Semana 1				
VCE	25	26	29	27
Hb	7,62	8,3	8,77	7,88
PC	9,44	8,84	9,63	8,57
PP	8,41	8,45	8,48	8,22
Semana 2				
VCE	29	26	30	28
Hb	8,6	7,34	8,93	8,27
PC	12,32	10,13	11,91	10,84
PP	10,28 ^a	9,05 ^{ab}	8,89 ^{ab}	8,22 ^a
Semana 3				
VCE	36 ^a	29 ^b	34 ^a	33 ^a
Hb	11,55 ^a	8,2 ^b	10,84 ^a	9,96 ^{ab}
PC	16,77 ^a	13 ^b	15,62 ^{ab}	14,62 ^{ab}
PP	12,14 ^a	11,37 ^{ab}	10,25 ^{bc}	9,71 ^c
Semana 4				
VCE	39	34	38	36
Hb	12,99 ^a	10,11 ^b	12,27 ^a	11,35 ^{ab}
PC	21,36 ^a	17,37 ^b	19,44 ^{ab}	18,56 ^{ab}
PP	10,19 ^a	9,34 ^{ab}	9,49 ^{ab}	8,8 ^b
Semana 5				
VCE	40	38	40	39
Hb	13,52 ^a	12,24 ^b	13,64 ^a	13,13 ^{ab}
PC	26,53	22,59	24,27	23,43
PP	9,27 ^a	8,95 ^{ab}	8,79 ^{ab}	8,02 ⁿ

¹ Los valores son medias (n= 5). Las medias en la misma fila sin compartir una letra de superíndice común son significativamente diferentes (P < 0,10)

En conclusión, la fitasa de *E. coli* sobreexpresada por *Pichia* era al menos tan eficaz como la fitasa de BASF en la mejora de la utilización de fósforo de fitato y Fe en dietas de maíz-soja para cerdos destetados.

10 **Lista de secuencias**

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

15 (i) SOLICITANTE: Lei, Xingen

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: SOBREEXPRESIÓN DE GENES DE FITASA EN SISTEMAS DE LEVADURA

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 12

20 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

- (A) DESTINATARIO: Michael L. Goldman
- (B) CALLE: Clinton Square, P. O. Box 1051
- (C) CIUDAD: Rochester
- (D) ESTADO: Nueva York
- 25 (E) PAÍS: Estados Unidos
- (F) ZIP: 14603

(v) FORMA LEGIBLE EN ORDENADOR:

- 30 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
- (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Edición nº 1.0, Versión nº 1.30

- (vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD:
 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
 (C) CLASIFICACIÓN:
- 5
- (viii) INFORMACIÓN DEL MANDATARIO/AGENTE:
 (A) NOMBRE: Goldman, Michael L.
 (B) NÚMERO DE REGISTRO: 30.727
 (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 19603/1340
- 10
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
 (A) TELÉFONO: (716) 263-1304
 (B) TELEFAX: (716) 263-1600
- 15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 1:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 22 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) HÉLICE: única
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 20
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 25 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 1:
- CGGAATTCGT CACCTCCGGA CT 22
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 2:
- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 24 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) HÉLICE: única
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 35
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 2:
- 40 CCCAAGCTTC TAAGCAAAAC ACTC 24
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 3:
- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 22 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) HÉLICE: única
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 50
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 3:
- 55 CAGCTATGAC CATGATTACG CC 22
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº4:
- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 26 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) HÉLICE: única
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 4:	
5	CCTAGAACGG GAATTCATTG GCCGCC	26
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 5:	
10	(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA: (A) LONGITUD: 24 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) HÉLICE: única (D) TOPOLOGÍA: lineal	
15	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 5:	
20	CCCAAGCTTG ATCACATCCA TTCA	24
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 6:	
25	(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA: (A) LONGITUD: 25 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) HÉLICE: única (D) TOPOLOGÍA: lineal	
30	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 6:	
35	CGGGGACTGC TAGCGCACGT TCGAT	25
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 7:	
40	(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA: (A) LONGITUD: 28 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) HÉLICE: única (D) TOPOLOGÍA: lineal	
45	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 7:	
50	ATCGAACGTG CGCTAGCAGC AGTCCCCG	28
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 8:	
55	(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA: (A) LONGITUD: 24 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) HÉLICE: única (D) TOPOLOGÍA: lineal	
60	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 8:	
60	GCTCTAGACT AAGCAAAACA CTCC	24
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 9:	

5	<p>(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA: (A) LONGITUD: 80 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) HÉLICE: única (D) TOPOLOGÍA: lineal</p>	
	<p>(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)</p>	
10	<p>(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 9</p> <p>GGGGTACCAT GGGCGTCTCT GCTGTTCTAC TTCCTTTGTA TCTCCTGTCT GGAGTCACCT CCGGACAGAG TGAGCCGGAG</p>	60 80
15	<p>(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 10:</p> <p>(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA: (A) LONGITUD: 24 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) HÉLICE: única (D) TOPOLOGÍA: lineal</p>	
20	<p>(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)</p>	
25	<p>(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 10:</p> <p>GGGAATTCAT TACAACTGC AGGC</p>	24
30	<p>(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 11:</p> <p>(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA: (A) LONGITUD: 21 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) HÉLICE: única (D) TOPOLOGÍA: lineal</p>	
35	<p>(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)</p>	
40	<p>(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 11:</p> <p>GGAATTCCAG AGTGAGCCGG A</p>	21
45	<p>(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 12:</p> <p>(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA: (A) LONGITUD: 22 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) HÉLICE: única (D) TOPOLOGÍA: lineal</p>	
50	<p>(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)</p>	
55	<p>(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 12:</p> <p>GGGGTACCTT ACAAAGTCA CG</p>	22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de AppA bacteriana como una fitasa, en el que dicha AppA retiene al menos el 60 % de su actividad después de calentar la AppA durante 15 minutos a 60 °C, en donde la AppA se expresa en una célula hospedadora de levadura.
- 10 2. Uso de AppA bacteriana para catalizar la conversión de fitato a inositol y fosfato en donde dicha AppA retiene al menos el 60 % de su actividad después de calentar la AppA durante 15 minutos a 60 °C, en donde la AppA se expresa en una célula hospedadora de levadura.
- 15 3. El uso de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el hospedador de levadura se selecciona del grupo que consiste en la especie de *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Torulaspota* y *Schizosaccharomyces*.
- 20 4. El uso de la reivindicación 3, en el que el hospedador de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
- 25 5. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho hospedador de levadura es una cepa de levadura metilotrófica.
- 30 6. El uso de la reivindicación 5, en el que dicho hospedador de levadura es *Pichia pastoris*.
- 35 7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha fitasa AppA bacteriana se mezcla o pone en contacto con una composición de pienso animal.
- 40 8. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la AppA bacteriana es un polipéptido de AppA de *E. coli*.
9. Uso de una cepa de levadura que comprende un gen que codifica AppA bacteriana, ligado funcionalmente a un promotor que dirige la expresión del gen *AppA* en la cepa de levadura, para producir una fitasa en donde dicha fitasa retiene al menos el 60 % de su actividad después de calentar la fitasa durante 15 minutos a 60 °C.
10. El uso de la reivindicación 9, en el que el polipéptido de AppA bacteriana es un polipéptido de AppA de *E. coli*.
11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en el que dicha cepa de levadura se selecciona del grupo que consiste en la especie de *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Torulaspota* y *Schizosaccharomyces*.
12. El uso de la reivindicación 11, en el que dicha cepa de levadura es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.
13. El uso de la reivindicación 11, en el que dicha cepa de levadura es una cepa de *Pichia pastoris*.
14. Uso de un vector que comprende un gen que codifica AppA, ligado funcionalmente a un promotor que dirige la expresión del gen *AppA* en una cepa de levadura, para producir una fitasa en donde dicha fitasa retiene al menos el 60 % de su actividad después de calentar la fitasa durante 15 minutos a 60 °C.

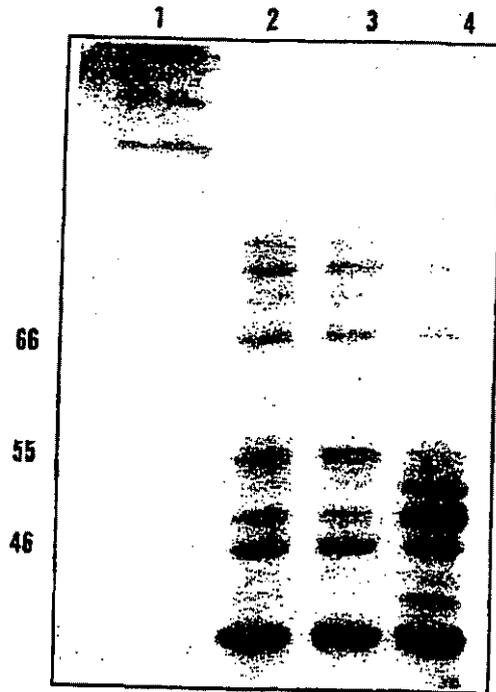


FIG. 1

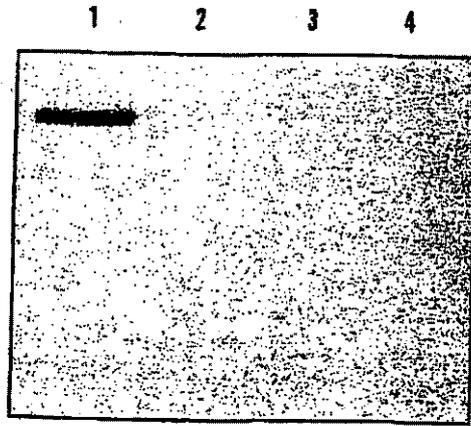


FIG. 2

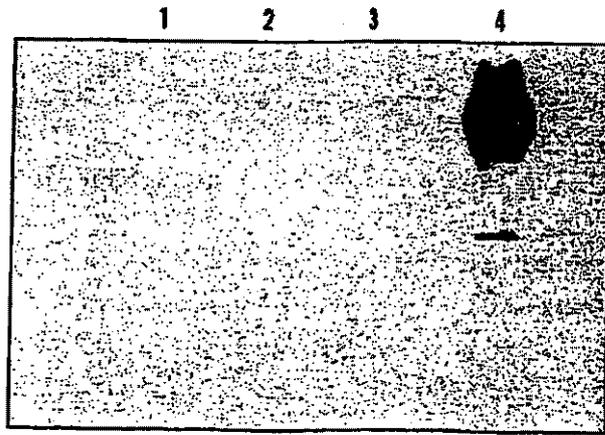


FIG. 3

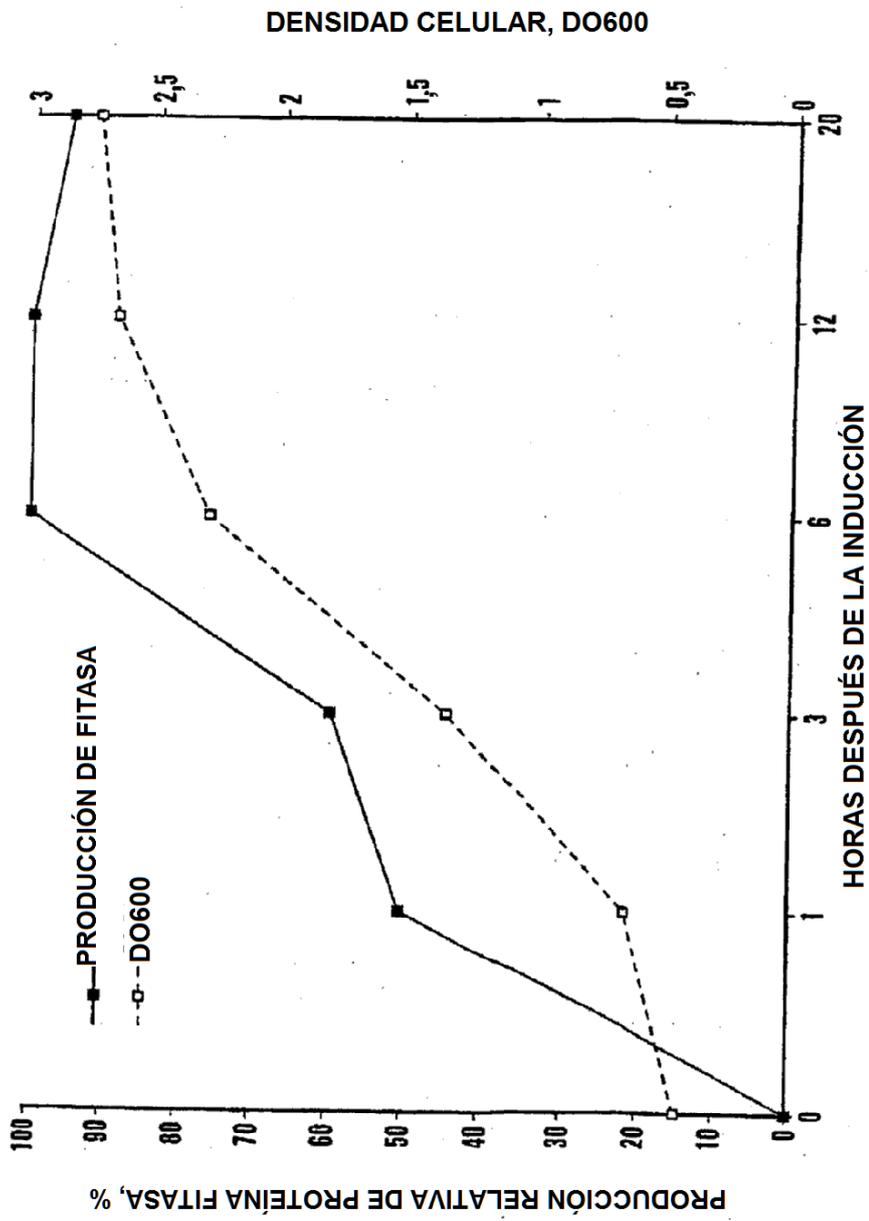


FIG. 4

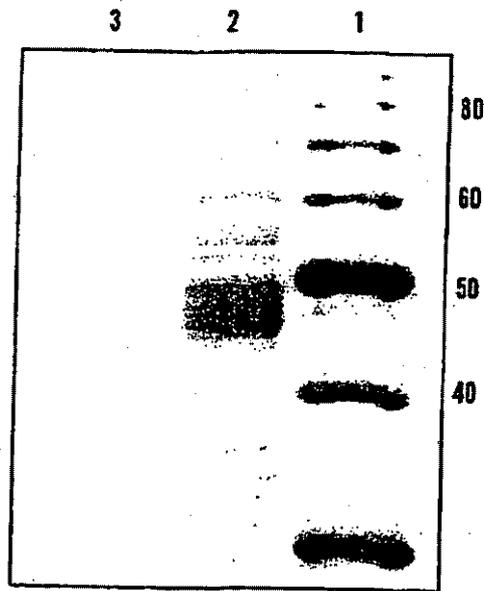


FIG. 5

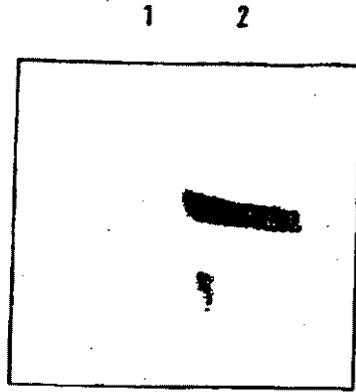


FIG. 6

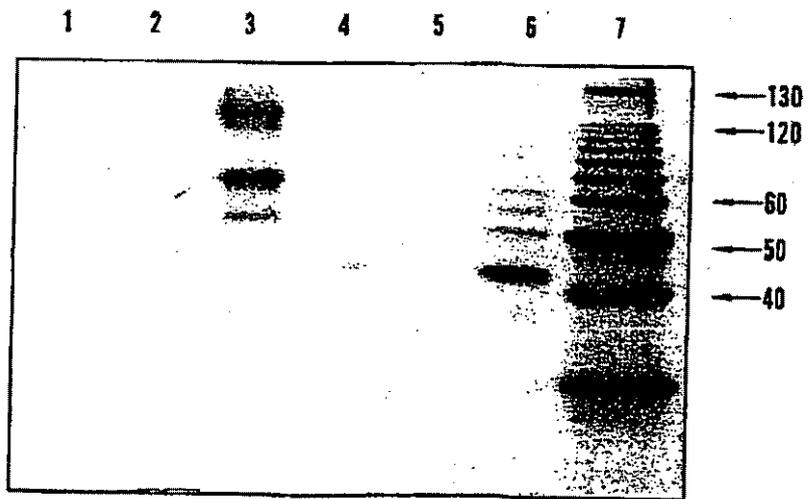


FIG. 7

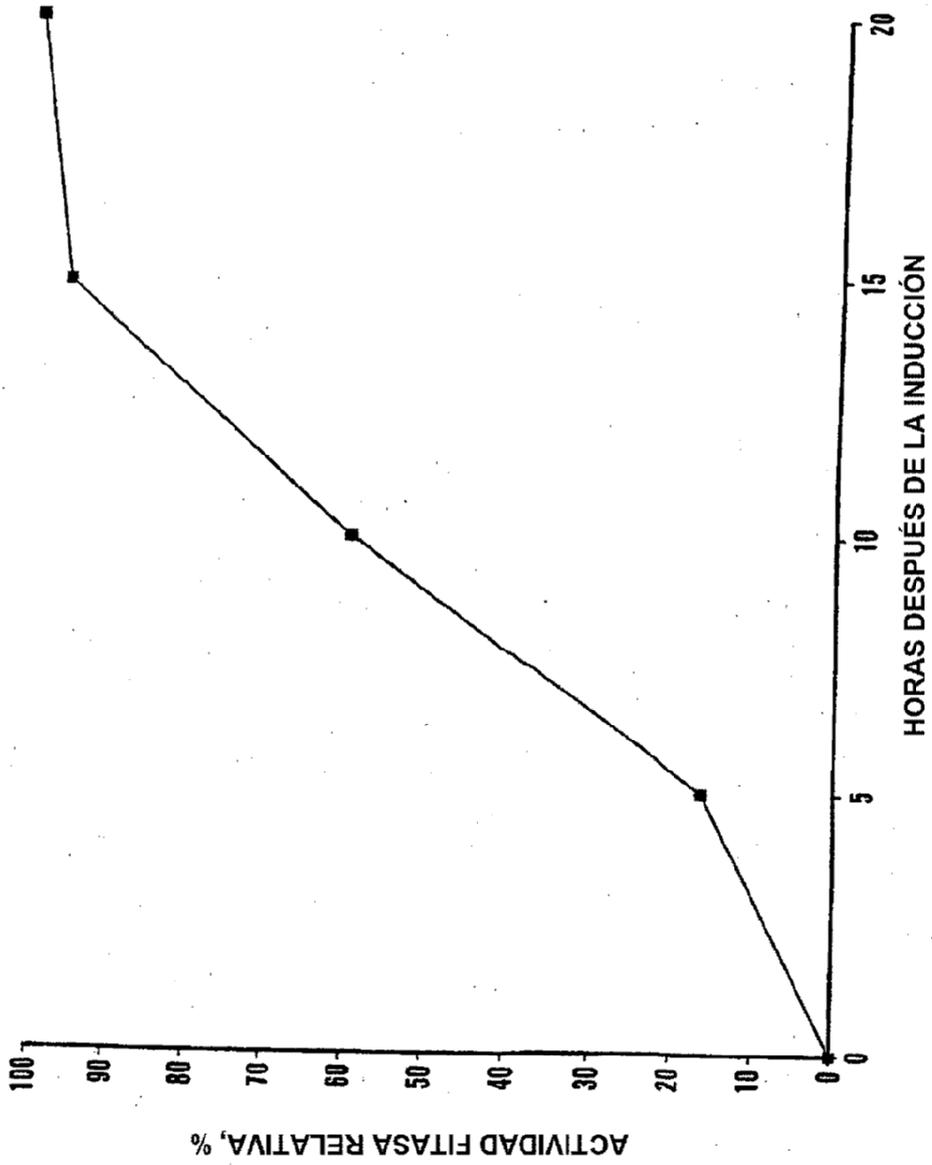


FIG. 8

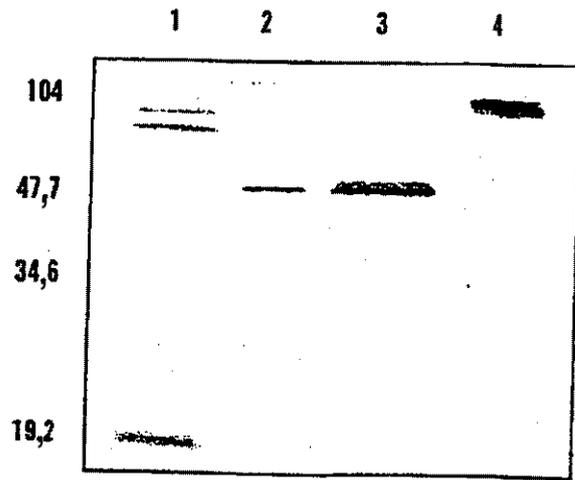


FIG. 9

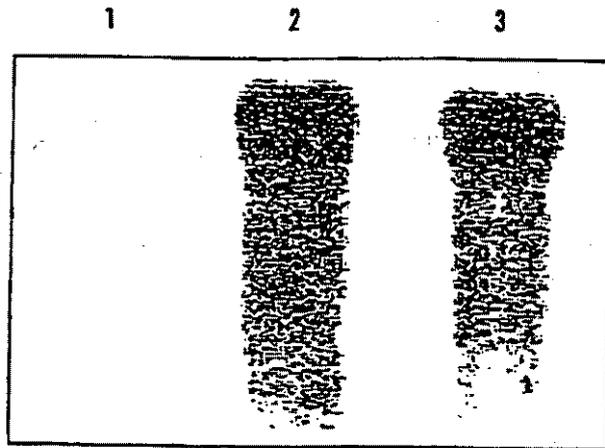


FIG. 10

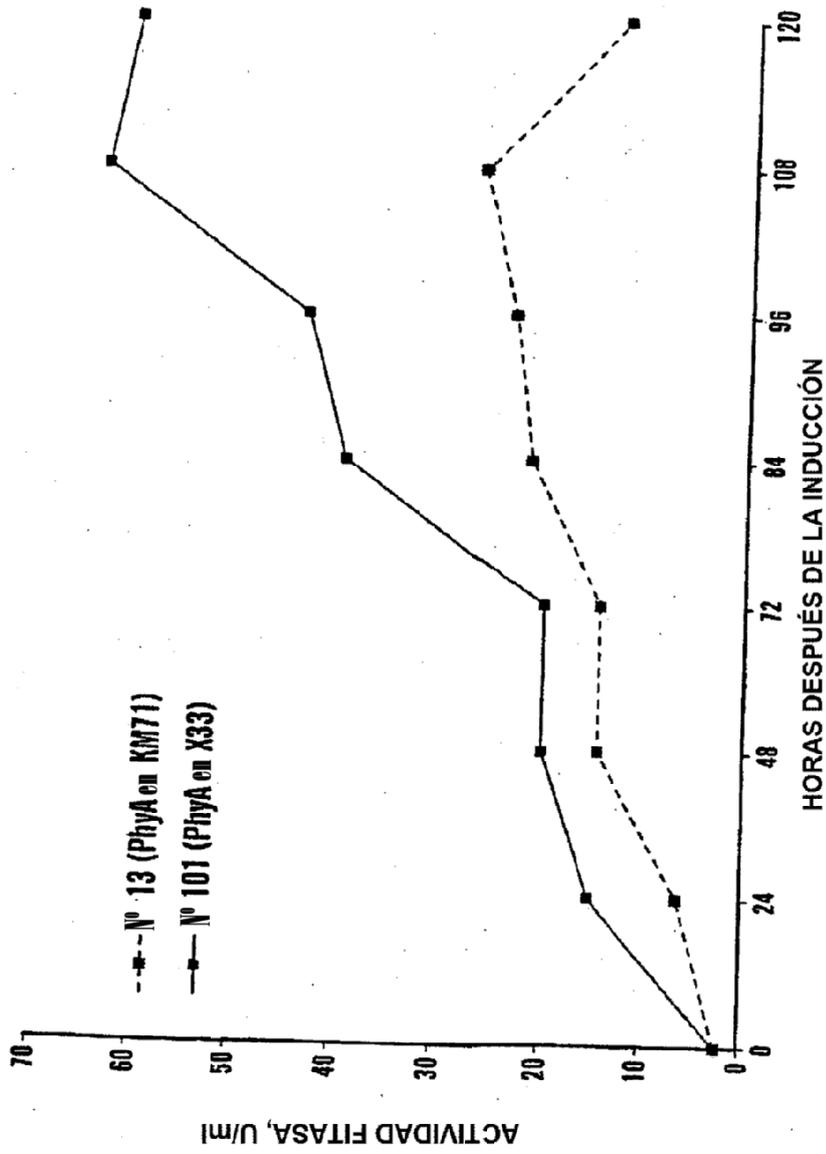


FIG. 11

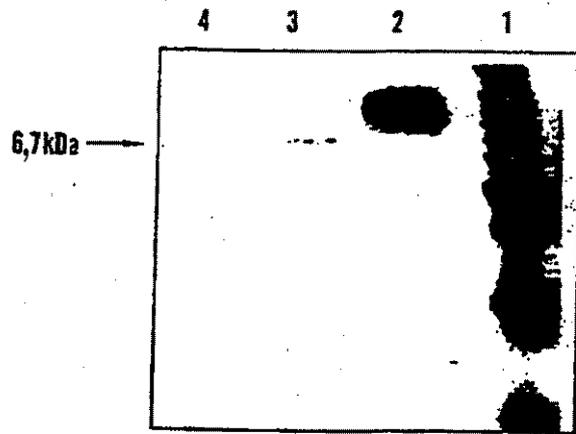


FIG. 12

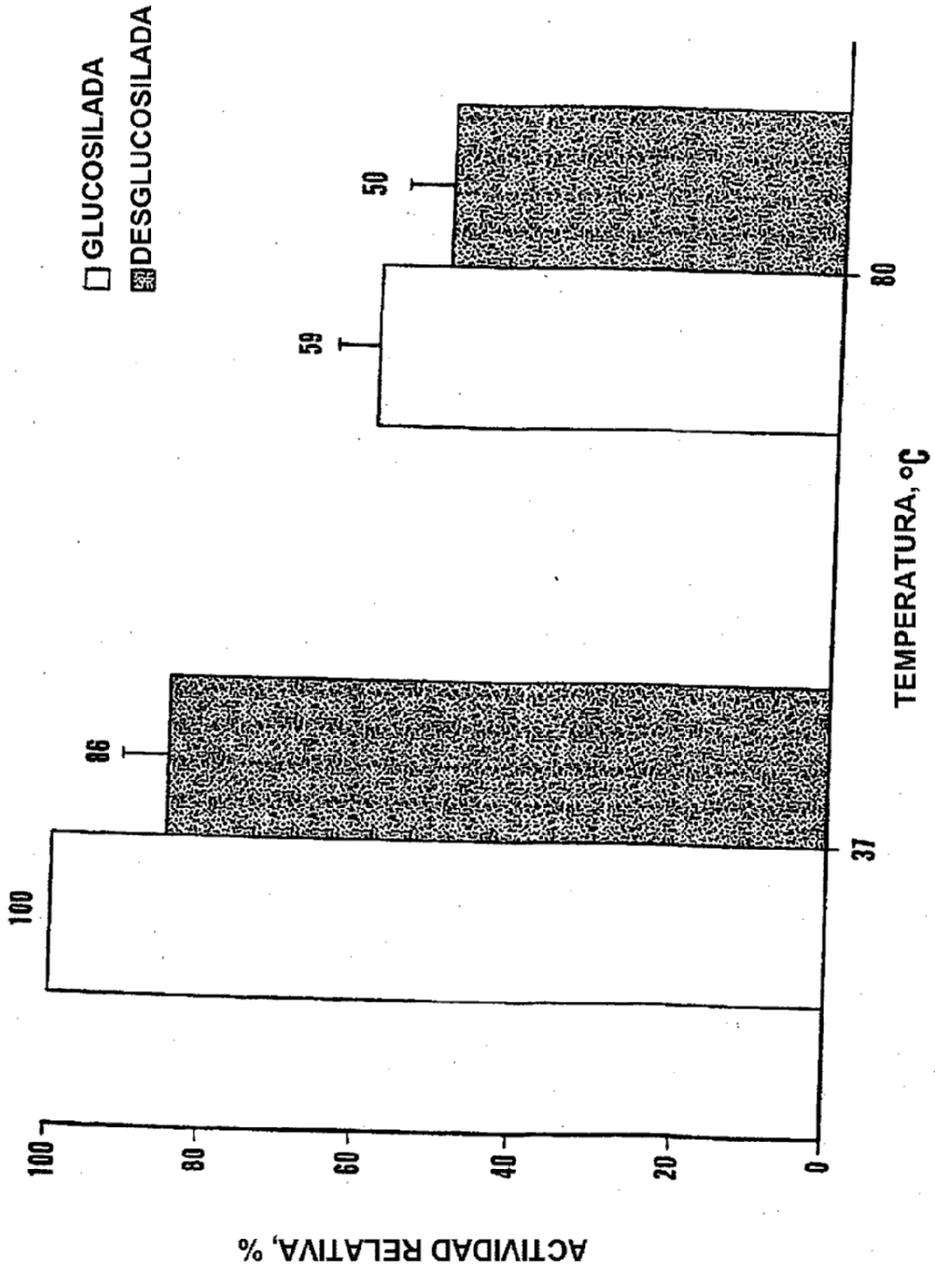


FIG. 13

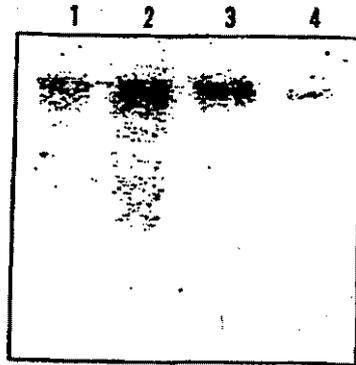


FIG. 14

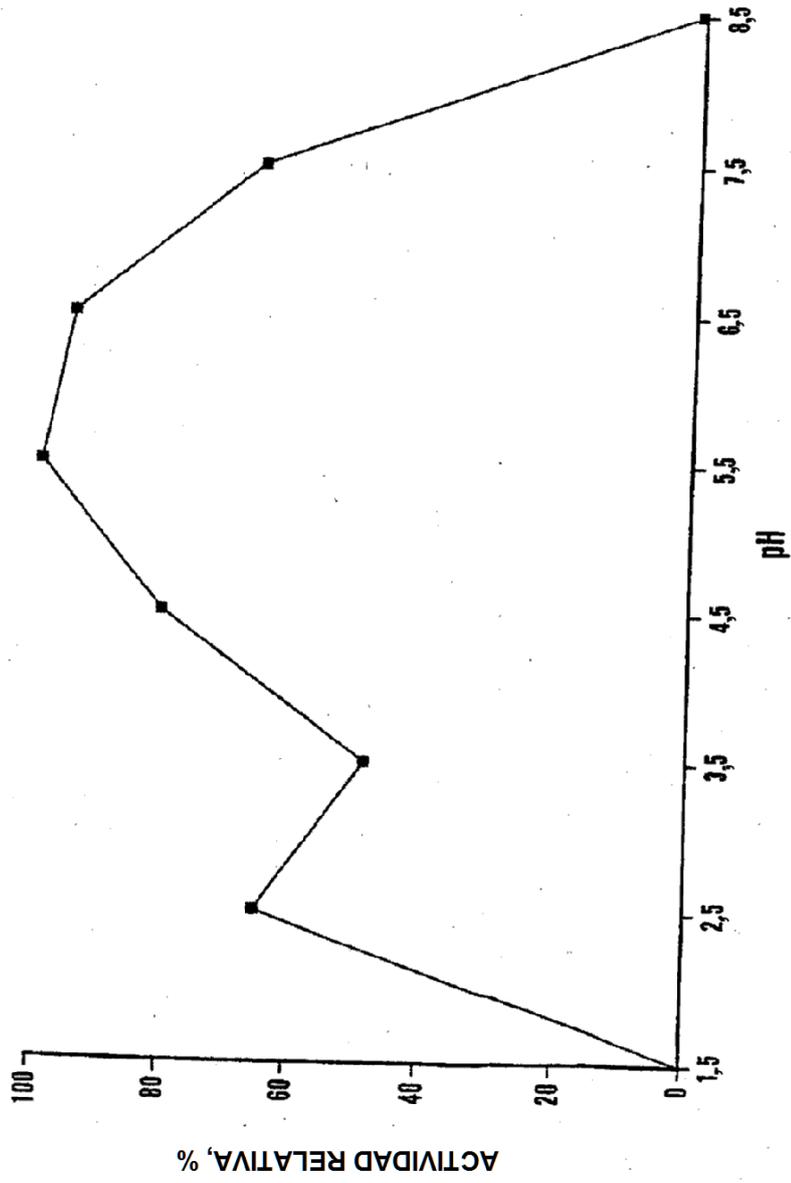


FIG. 15

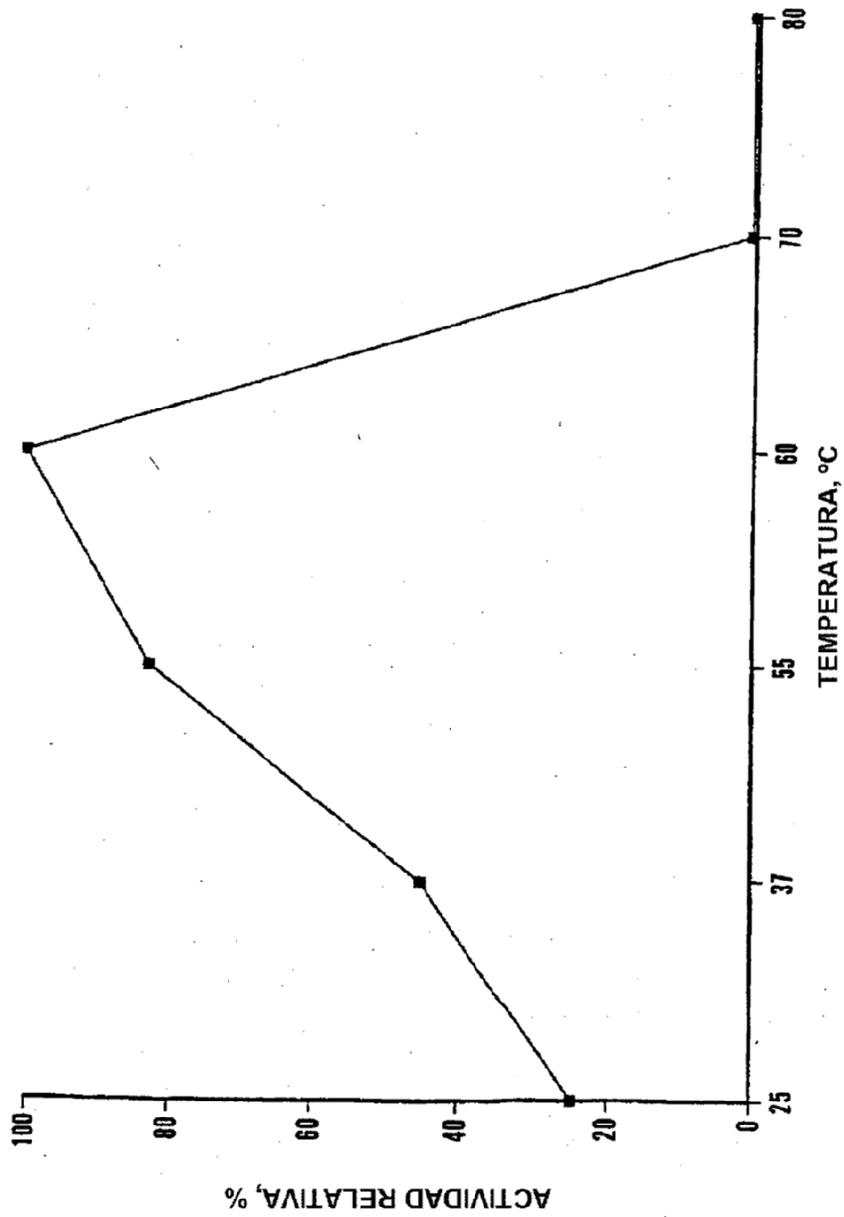


FIG. 16

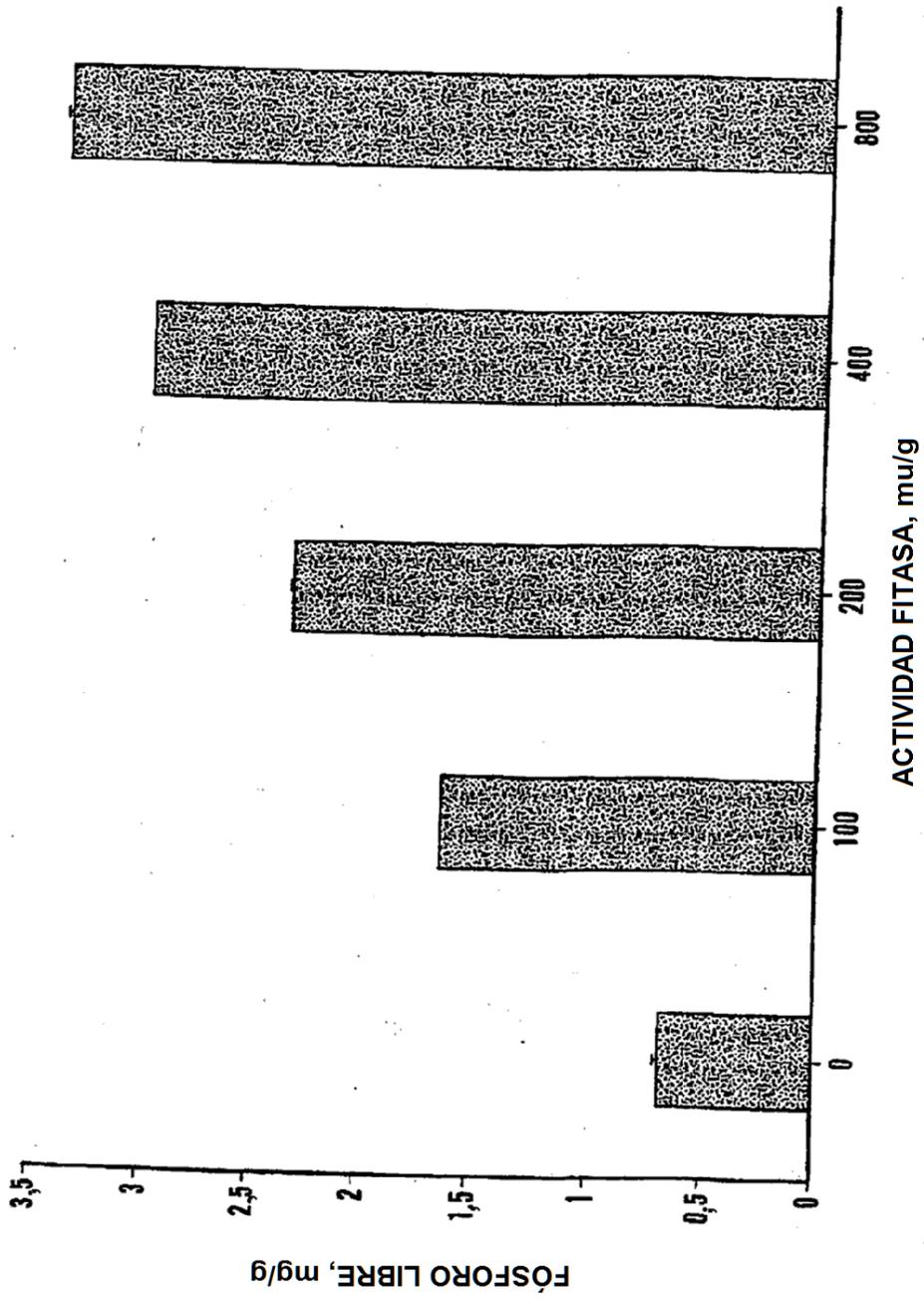


FIG. 17

CURSO CRONOLÓGICO DE CINCO TRANSFORMANTES QUE CONTIENEN FITASA DE E. COLI

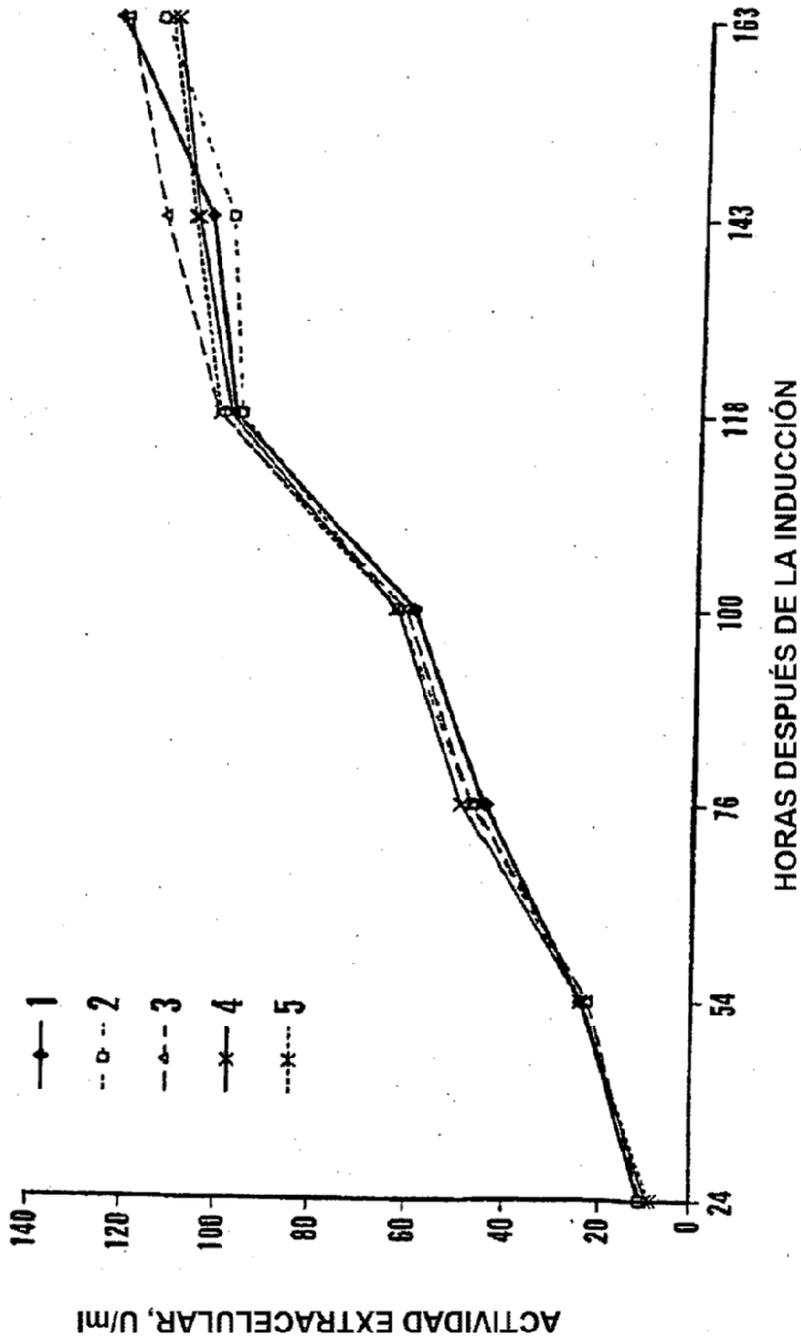


FIG. 18

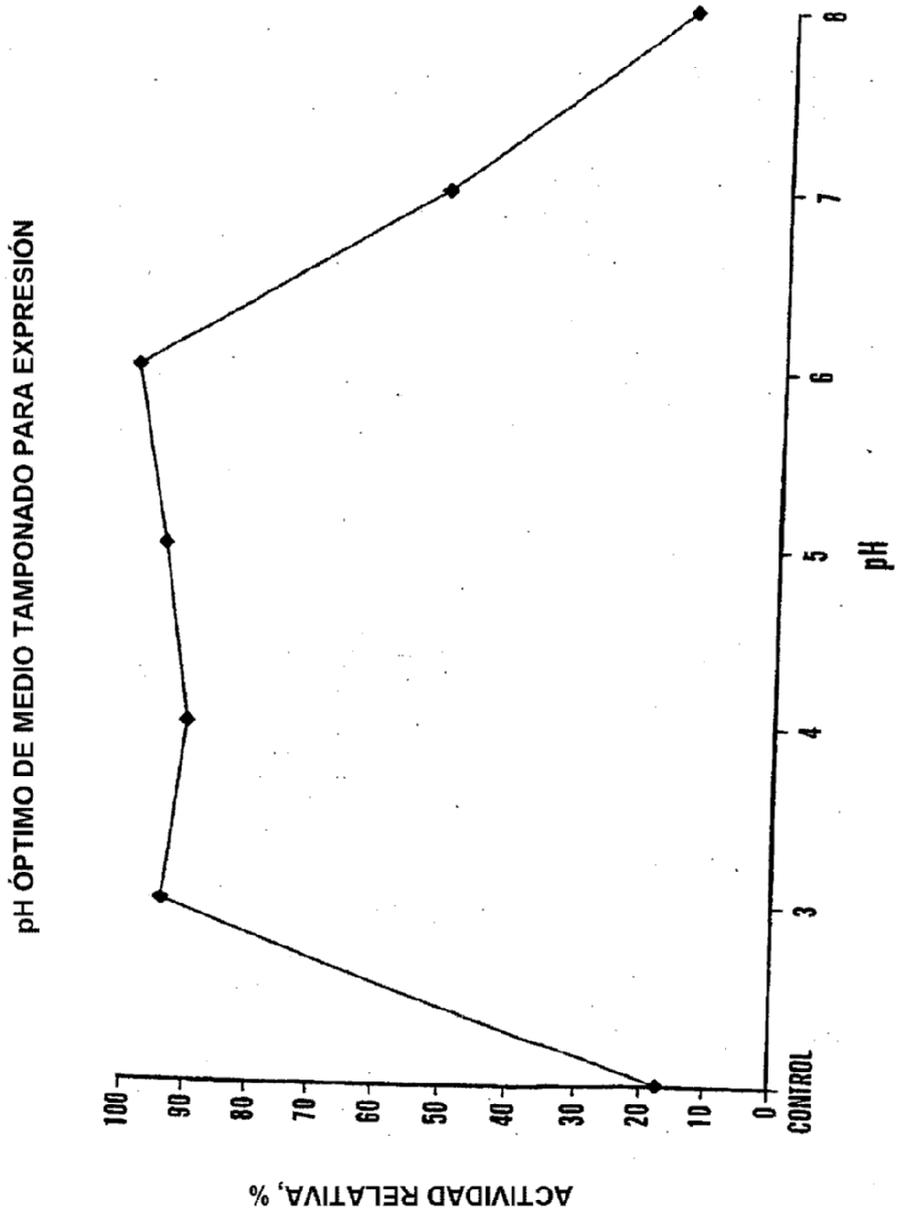


FIG. 19

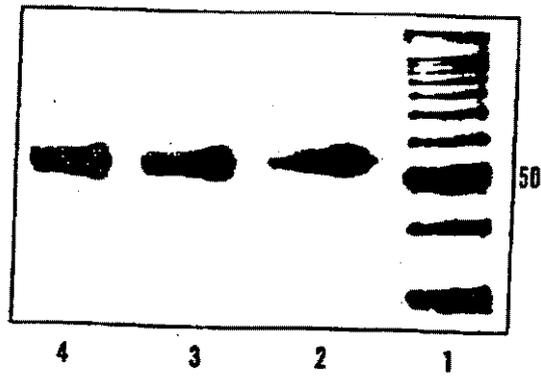


FIG. 20

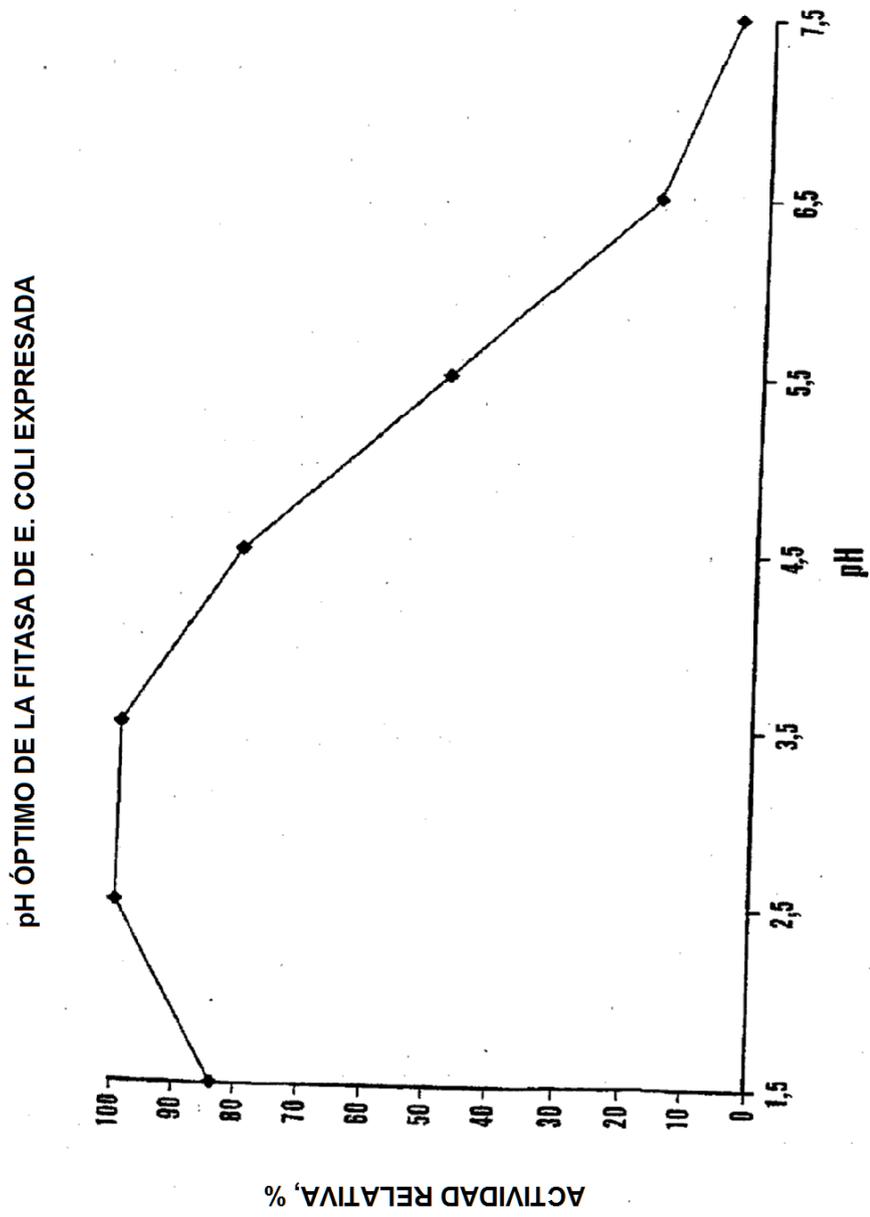


FIG. 21

TEMPERATURA ÓPTIMA DE LA FITASA DE E. COLI EXPRESADA

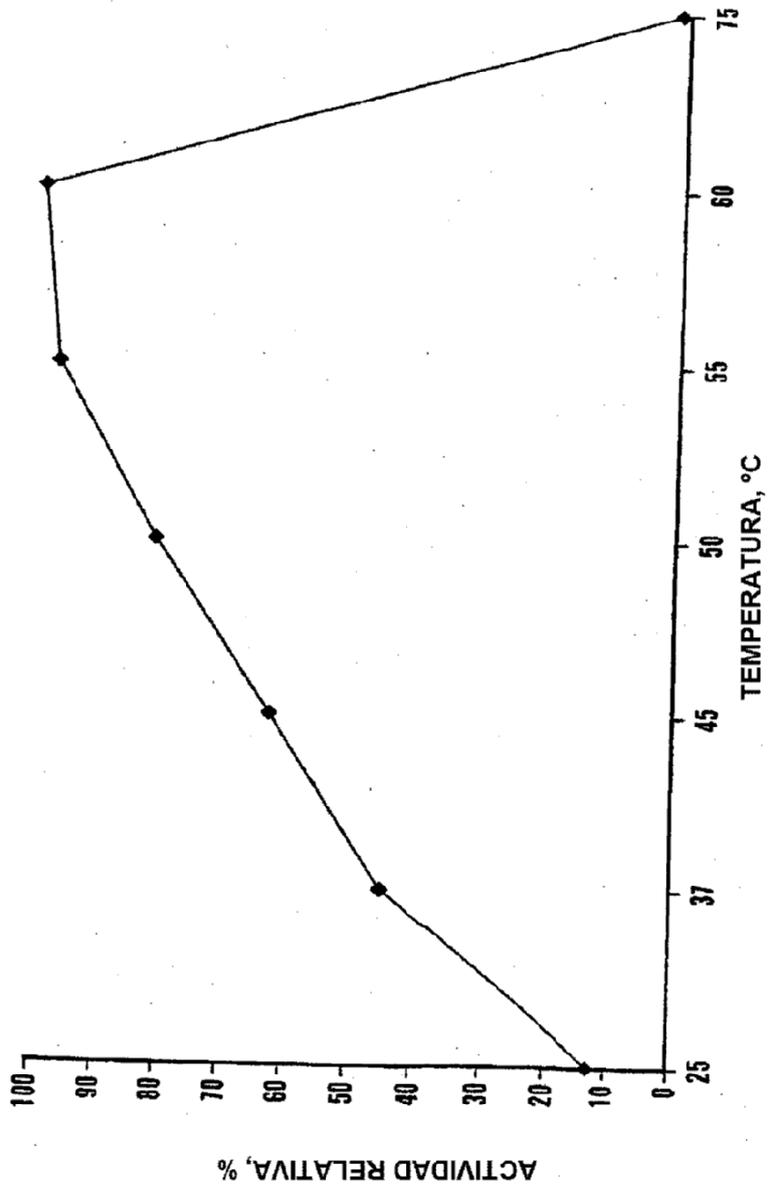


FIG. 22

FÓSFORO LIBRE LIBERADO POR LA FITASA DE E. COLI EXPRESADA

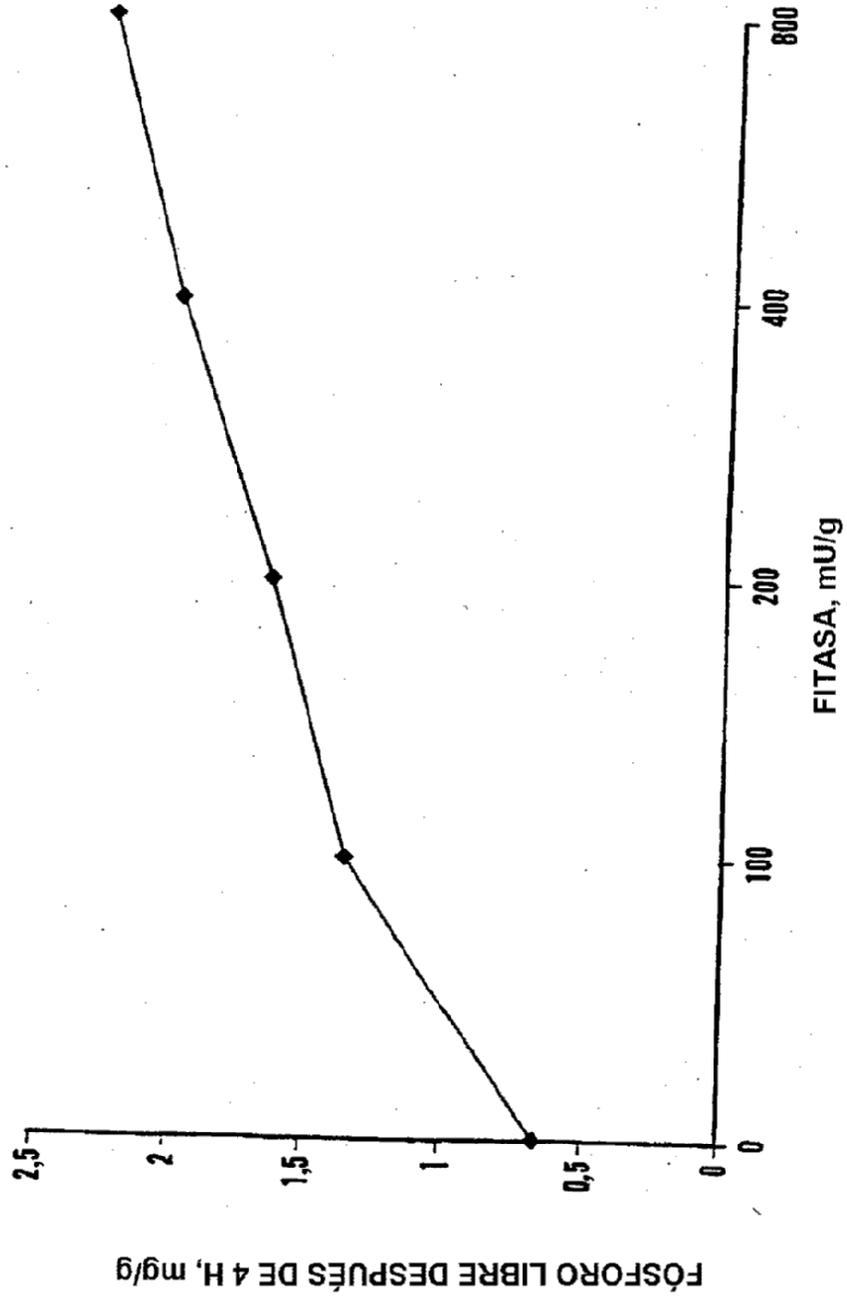


FIG. 23