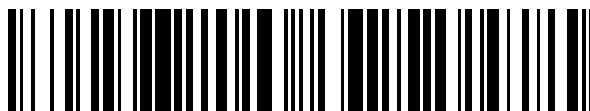


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 654**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

A23K 1/165 (2013.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2012 E 12773585 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2699674**

54 Título: **Variantes sintéticas de fitasa**

30 Prioridad:

21.04.2011 US 201161477645 P

21.04.2011 EP 11163453

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

07.03.2016

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)
67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es:

**HAEFNER, STEFAN;
WELZEL, ANNEGRET y
THUMMER, ROBERT**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 562 654 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Variantes sintéticas de fitasa

La presente invención se refiere a fitasas, a secuencias de aminoácidos que codifican enzimas fitasas y a secuencias de nucleótidos que codifican fitasas y a procedimientos para la preparación y el uso de fitasas, así como a piensos para animales que contienen esas fitasas.

El fósforo es un elemento esencial para el crecimiento de los organismos vivos. En la cría de animales, los alimentos, por regla general, tienen que ser suplementados con fósforo inorgánico a fin de lograr buenas tasas de crecimiento. En los cereales y leguminosas, el fósforo es almacenado principalmente en forma de fitato. Sin embargo, los animales monogástricos tales como los cerdos, las aves de corral y los peces no están capacitados para absorber directamente el fitato o el ácido fítico, lo que tiene por consecuencia que el fitato sea excretado, lo que a su vez se traduce en sobrecargas de fósforo en regiones en las cuales la cría de ganado es intensiva. Asimismo, el ácido fítico, que une metales tales como el calcio, cobre o zinc, actúa como una sustancia cuyo efecto sobre el metabolismo de animales monogástricos es negativo. A fin de compensar el déficit de fosfato de esos animales y asegurar que su crecimiento y su salud sean lo suficientemente buenos, se le añade al pienso animal fosfato inorgánico. Esta adición de fosfato inorgánico es costosa y conduce a otra carga adicional para el medioambiente. Al usarse una fitasa en los piensos para animales, el fitato es hidrolizado y hace que el contenido de fosfato de inositol y de fosfatos inorgánicos en el estiércol sea menor. La adición de fitasas a los piensos para animales mejora la disponibilidad de fósforo orgánico y reduce el efecto adverso sobre el medioambiente que causan los fosfatos excretados, unidos por fitatos. En la literatura especializada se describe una variedad de fitasas naturales, tanto de origen fúngico como de origen bacteriano.

Las fitasas, también llamadas hexaquisfosfato de mio-inositol fosfohidrolasa, son una clase de fosfatasas que son aptas para escindir del fitato por lo menos un residuo de fosfato.

El documento EP 420 358 describe, en términos generales, la clonación y expresión de fitasas microbianas, el documento WO 2006/38062 describe fitasas microbianas derivadas de la *Citrobacter freundii* usadas como aditivos que se incorporan en piensos para animales y el documento WO 2007/112739 describe fitasas basadas en una fitasa natural de *Citrobacter braakii* y procedimientos para su preparación y el uso en piensos para animales.

Haefner y col. (Haefner S., Kniesch A., Scholten E., Braun J., Lohscheidt M. y Zelder O. (2005) Biotechnological production and application of phytases. Appl Microbiol Biotechnol 68:588-597) describen un buen número de usos conocidos de fitasas en el campo de la nutrición humana o animal. Otros usos de fitasas tales como, por ejemplo, el uso para biomasa hidrolizante o almidón en la producción de bioetanol, se describen en el documento WO 2008/097620.

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

Sin embargo, todas esas fitasas actualmente disponibles no muestran esas propiedades que se requieren para la preparación de los aditivos para piensos para animales. Las fitasas actualmente disponibles no son lo suficientemente termoestables como para ser empleadas en la preparación de pellets para piensos para animales sin una pérdida considerable de su actividad. En la preparación de pellets para piensos de animales, la fitasa es comprimida, junto con otros componentes habituales del pienso animal, a temperaturas y a humedad elevadas, a fin de que sean administrados todos juntos como una entidad al ganado. Una destrucción efectiva de especies de salmonella y la gelatinización del almidón se logra solamente cuando, durante la preparación, la temperatura es superior a los 80 °C (Amerah y col. Worlds Poultry Science Journal (2011) 67:29-45). Esa compresión en condiciones de calor y humedad tiene por consecuencia pérdidas considerables en la actividad de la fitasa. Una posibilidad de prevenir esa pérdida de actividad consiste en revestir laboriosamente las partículas de fitasa, de modo que estén protegidas contra el efecto del calor. Ese revestimiento de las adiciones hechas a la fitasa causa considerables costos adicionales debido a las grasas o polímeros que se emplean para ese revestimiento. Las dosis de fitasas comerciales son determinadas normalmente en base a la determinación de la actividad a pH 5,5 (DIN ISO 30024:2009) y no están adaptadas para igualar el pH en el respectivo tracto digestivo. Esto tiene por consecuencia un número considerable de dosificaciones equivocadas por variación de la actividad a valores pH diferentes a 5,5.

Era, pues, un objeto de la presente invención proporcionar una fitasa que tuviese una estabilidad térmica suficiente, de modo que se pudiera emplear en la preparación de pellets para piensos exentos de salmonella sin medidas protectoras adicionales tales como el revestimiento, y que las pérdidas en la actividad fuesen las más bajas posibles. Otro objeto de la invención era proporcionar una fitasa que pudiera emplearse en un intervalo de pH amplio, junto

con la menor reducción posible de la actividad enzimática, de modo que se pudiera emplear en los diversos intervalos de pH de los tractos digestivos de diferentes especies animales y de modo que se asegurase en el tracto digestivo una suficiente actividad enzimática, aun cuando el intervalo de pH fluctuara por haber variado los componentes del pienso.

- 5 Este objeto se logra mediante una fitasa sintética cuya secuencia de aminoácidos es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 24.

La fitasa sintética de acuerdo con la invención tiene preferentemente una secuencia de aminoácidos que es al menos 94 %, de especial preferencia 95 % y de preferencia 96, 97, 98 o 99 %, idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 24.

- 10 Las fitasas de acuerdo con la invención tienen una termoestabilidad de al menos 80 °C y son por lo tanto apropiadas para su uso en la preparación de pellets para piensos sin que sufran una reducción de actividad considerable como consecuencia de las condiciones de calor y humedad durante la peletización.

- 15 Tienen asimismo un amplio intervalo de pH de más de 3 unidades de pH, dentro del cual retienen por lo menos 50 % de la actividad determinada a pH 5,5, de modo tal que, cuando la administración se determina en base a la actividad a 5,5, pueden utilizarse en un sinnúmero de animales con diferentes pH digestivos y junto con diferentes componentes del pienso, sin que una dosificación demasiado baja tenga por resultado reducciones en la actividad y, por lo tanto, una mayor excreción de fosfato por los animales.

- 20 Por otra parte, las fitasas de acuerdo con la invención tienen sorprendentemente una elevada estabilidad proteolítica y, por lo tanto, pueden pasar por el estómago sin perder sustancialmente su actividad, actividad que se mantiene en el sitio real de acción, que es el intestino. Asimismo, las fitasas de acuerdo con la invención tienen una estabilidad a pH 2, una estabilidad de al menos 85 % de modo que se asegura que la actividad se mantendrá en el ámbito fuertemente ácido.

- 25 La identidad entre dos secuencias proteicas o secuencias de ácido nucleico es definida como la identidad calculada por el programa *needle* en la versión disponible en abril de 2011. *Needle* es parte del paquete de software gratuito EMBOSS, que puede ser descargado del sitio web <http://emboss.sourceforge.net/>. Se usan los parámetros estándar: gapopen 10.0 ("gap open penalty, penalidad por apertura de brecha"), gapextend 0.5 ("gap extensión penalty, penalidad por extensión de brecha"), el fichero de datos EBLOSUM62 (matriz) en el caso de la proteína y el fichero de datos EADNFULL (matriz) en el caso del ADN.

- 30 En una realización particular, las fitasas con las siguientes secuencias de aminoácidos quedan exceptuadas de la invención: SEC ID 18 y sus mutantes A-4; A-10; A-66; A-73; C-7; C-40; X-1; X-2; A-164; B-16; B-378; C-79; A-11; X-6; B-320; A-508; A-8; A-20; A-507; A-8; A-20; A-507; X-3; A-505; A-501; A-407; A-502; X-4; A-408; A-415; A-501; A-409; A-503; A-406; A-510; A-515; D-5; D-34; F-161; A-504; D-192; A-511; A-514; A-516; F-41; D-207; D-268; F-150; I-117; A-509; H-107; H-159; H-456; A-512; H-464; A-513; A-518; A-521; A-534 y A-519 (definición como en la Tabla 6).

- 35 En una realización particular, la invención comprende las fitasas descritas de acuerdo con la invención, quedando exceptuadas las fitasas con las secuencias de aminoácidos del grupo que consiste en SEC ID 18 y los mutantes como se describen en la tabla 6.

Tabla 6: Mutantes de la secuencia de aminoácidos SEC ID 18

Número de mutante	Mutación(es) a partir de la secuencia SEC ID 18
A-4	Q349R
A-10	A84V / A304V
A-66	H228Y
A-73	N202S
C-7	T320L / H413L
C-40	K234N
X-1	Q256Y
X-2	K207E / A209S / N270K
A-164	A6V
B-16	K207E
B-378	H143Y
C-79	Q109K / D247K
A-11	Q256H / K402N
X-6	K207E / A209S
B-320	M137L / K207T
A-508	Q349R / H228Y / A304V
A-8	K234I / K251 N / H413Q
A-20	D92E

ES 2 562 654 T3

(continuación)

<u>Número de mutante</u>	<u>Mutación(es) a partir de la secuencia SEC ID 18</u>
A-507	N202S / H228Y
X-3	D92P
A-505	D92E / N202S
A-501	D92E / K234I / K251N / H413Q
A-407	A89T / D92A / N270K
A-502	D92E / Q256H
X-4	A89T / D92A
A-408	A89T / D92A / K207E / A209S
A-415	A89T / D92A / S261E
A-501	D92E / K234I / K251N / H413Q
A-409	A89T / D92A / S248L / Q256Y
A-503	D92E / K234I / K251N / Q256H / H413Q
A-406	A89T / D92A / Q256Y
A-510	D92E / N202S / K234I / K251 N / Q256Y / H413Q / K207E / A209S
A-515	D92E / N202S / A209S / K234I / Q256Y / H413Q
D-5	D92E / A142T/ K234I / K251 N / Q256H / H413Q
D-34	S1 N / S17N/ D92E / K234I / K251 N / Q256H / H413Q
F-161	K12N / D92E / K234I / K251 N / Q256H / H413Q
A-504	D92E / N202S / K234I / K251 N / Q256H / H413Q
D-192	D92E / S140P / K207I / K234I / K251 N / Q256H / H413Q
A-511	D92E / M137L / N202S / K234I / K251 N / Q256H / H413Q
A-514	D92E / N202S / K234I / K251 N / Q256H / K402N H413Q
A-516	D92E / N202S / K234I / E243K / K251 N / Q256H / H413Q
F-41	D92E / D138N / K234I / K251 N / Q256H / H413Q
D-207	D92E / Q149H / K234I / K251 N / Q256H / H413Q
D-268	D92E / T156R / K234I / K251 N / Q256H / H413Q
F-150	D92E / K234I / K251 N / A255V / Q256H / H413Q
I-117	D92E / N202T / K234I / K251 N / Q256H / S373I / E382G / T399I / H413Q
A-509	A89T / D92A / N202S / K234I / K251 N / Q256H / H413Q
H-107	D92E / N202S / K234I / K251N / Q256H / H413Q
H-159	A89T / D92A / N202S / K207E / K234I / K251 N / Q256H
H-456	A89T / D92A / K207E / K234I / K251N / Q256H / H413Q
A-512	D92E / H143Y / K234I / K251N / Q256H / H413Q
H-464	A89T / D92A / G205R / K207E / V208M / K251N / Q256H
A-513	D92E / H/228Y / K234I / K251 N / Q256H / H413Q
A-518	A89T / D92A / H143Y / N202S / K207E / A209S / H228Y / K234I / K251 N / Q256H / H413Q
A-521	A89T / D92N / A142T / H143Y / N202S / K207E / A209S / H228Y / K234I / D247K / K251 N / Q256H / F356L / H413Q
A-534	A89T / D92A / H143Y / T156R / N202S / K207E / A209S / H228Y / K234I / K251 N / Q256H / S314G / H413Q
A-519	A89T / D92A / A142T / H143Y / N202S / K207E / A209S / H228Y / K234I / D247K / K251 N / Q256H / H413Q

5 En una realización particular, la invención comprende una fitasa que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, preferentemente 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %, idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID 24, quedando exceptuadas las fitasas con las secuencias de aminoácidos del grupo que consiste en SEC ID 18 y los mutantes tal como se describen en la tabla 6.

10 De acuerdo con una realización particular, la fitasa sintética presenta una modificación en los aminoácidos en al menos una de las posiciones seleccionadas de entre el grupo que consiste en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 16, 33, 37, 67, 71, 75, 76, 77, 78, 92, 109, 118, 119, 120, 121, 123, 136, 141, 144, 152, 155, 156, 159, 164, 166, 193, 200, 217, 258, 260, 261, 268, 270, 276, 300, 322, 345, 346, 371, 374, 398 y 406, basado en la posición de acuerdo con la SEC ID 24. Para los fines de la presente invención, por modificación se entiende una sustitución por otro aminoácido del aminoácido original tal como se menciona en SEC ID 24 de la lista de secuencias. Aquí, a los aminoácidos se les denomina por el código habitual de una sola letra. Modificando uno o más aminoácidos, es posible además intensificar la termoestabilidad de la fitasa sintética y/o intensificar la estabilidad frente a la pepsina o ampliar el intervalo óptimo de pH.

15 Ventajosamente, la fitasa sintética tiene al menos 5 modificaciones en la secuencia de aminoácidos tomando como referencia la SEC ID 24, en particular tiene al menos 6, 7, 8, 9 o 10 y muy especialmente preferentemente al menos 15 modificaciones.

20 En una realización preferida, la fitasa sintética tiene al menos una de las siguientes modificaciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 24:

ES 2 562 654 T3

S1-; D2-,E; T3Q, A4G,E; P5A; A6S,D; G7K; F8Y,M; Q9K; K12R; L16V; N33D,M; H37Y; R67L; Q71E; P75N; K76N,I; D77T; N78T; D92A,E,N,T,V; Q109N,E; Q118S; N119A,T; I120L; Q121T; A123V; S136K; Q141K; A144E; T152G,A; E155N; T156G; Q159N; S164E; A166E,H; Q193L; A200N; S217G; D258N; M2601; S261H; K268N; N270Q; Q276N; I300L; T322Q; D345G; N346G; L371A; H374N; D398E; Q406K.

- 5 En ese contexto, el aminoácido de SEC ID 24 que se ha mencionado antes, el número de posición respectivo (posición de acuerdo con la SEC ID 24) es reemplazado por uno de los aminoácidos mencionados después del número de posición. A “-” representa una delección del aminoácido en cuestión. En ese contexto, es posible cualquier posible sustitución de aminoácidos mencionada en combinación con cualquiera de los cambios restantes.

- 10 Ventajosamente, la fitasa sintética de la presente invención comprende al menos 5 de las modificaciones anteriormente mencionadas, en particular al menos 6, 7, 8, 9 o 10 y particularmente preferentemente al menos 15 de esas modificaciones.

Realizaciones muy especialmente preferidas de la fitasa sintética tienen una de las siguientes sumas acumulativas de modificaciones relativas a la SEC ID 24, donde “PhV-[número]” no representa mutación alguna, sino el número del mutante para identificarlo.

PhV-001	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T A123V T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N D398E
PhV-002	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92A Q121T A123V T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N D398E
PhV-003	D2E A4E A6S F8Y N33M R67L K76N N78T D92A Q121T A123V T152G S164E A200N D258N M2601 S261 H N270Q H374N D398E
PhV-004	D2E A4E A6S F8Y N33M R67L K76N N78T D92N Q109N Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N D398E
PhV-020	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-031	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-048	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76I N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-053	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T A123V T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q I300L H374N
PhV-055	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q Q276N H374N
PhV-058	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-059	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N D398E
PhV-060	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q109N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q I300L N346G H374N
PhV-064	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N
PhV-065	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92T Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N
PhV-066	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92V Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N
PhV-067	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-068	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92E Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-069	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92T Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-070	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92V Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-072	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92E Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N
PhV-073	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76I N78T D92N Q109N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N
PhV-074	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76I N78T D92N Q109N Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q I300L H374N D398E
PhV-075	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q109N Q121T A144E S164E A200N S217G D258N S261 H N270Q I300L H374N
PhV-076	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N

ES 2 562 654 T3

(continuación)

PhV-077	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92E Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N
PhV-078	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92T Q121T A123V S164E A200N D258N S261 H N270Q I300L H374N
PhV-079	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92V Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N
PhV-081	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T A123V T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N D398E
PhV-083	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q Q276N I300L H374N D398E
PhV-084	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q121T S136K S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-085	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K761 N78T D92A Q109N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N
PhV-088	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G T156G S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N D398E
PhV-089	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N D398E
PhV-094	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q109N Q121T A123V T152G T156G S164E A200N D258N S261H N270Q Q276N I300L N346G H374N
PhV-095	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K761 N78T D92N Q121T A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261 H N270Q H374N D398E
PhV-096	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76I N78T D92A Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-097	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q109N Q121T A123V Q159N S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-098	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q121T S136K S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-099	D2E A4E A6S F8Y N33D K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-101	N33D K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N H374N
PhV-103	N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-104	N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-105	N33D D92N S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-106	N33D K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H H374N
PhV-107	N33D K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N
PhV-108	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261H N270Q H374N
PhV-109	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-110	N33D D92N Q121T T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
PhV-111	N33D D92A Q121T T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
PhV-112	S1- D2- T3Q A4G P5A N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-113	S1- D2- T3Q A4G P5A N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-114	A6D G7K F8M Q9K N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-115	N33D D92A Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
PhV-116	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
PhV-117	S1A D2S T3R A4N N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-118	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
PhV-119	N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-120	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-121	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-122	N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-123	D2E A4E A6S F8Y N33D D92N S164E A200N H374N
PhV-124	D2E A4E A6S F8Y N33D K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H H374N
PhV-125	N33D D92A Q121 T A123V T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-126	N33D D92A Q121T A123V T152G S164E A200N D258N M260I S261H N270Q H374N
PhV-127	N33D D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N

ES 2 562 654 T3

(continuación)

PhV-128	A4E A6S N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N
PhV-129	N33D R67L D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
PhV-130	L16V N33D D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
PhV-131	K12R N33D D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
PhV-132	K12R L16V N33D D92N Q121T T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
PhV-133	N33D R67L D92N Q121T A123V T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
PhV-134	N33D D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A166E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
PhV-135	N33D R67L D92N Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A166E A200N S217G D258N M260I S261 H N270Q H374N
PhV-136	N33D D92A Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A166E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
PhV-137	N33D D92A Q121T T152G Q159N S164E A166E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N D398E
PhV-138	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A166E A200N S217G D258N M260I S261 H N270Q H374N D398E
PhV-139	N33D D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N S261H N270Q H374N
PhV-140	K12R N33D R67L D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261 H N270Q H374N
PhV-141	L16V N33D R67L D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261 H N270Q H374N
PhV-142	N33D R67L D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A166E A200N S217G D258N S261 H N270Q H374N
PhV-143	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A166E A200N S217G D258N S261 H N270Q I300L H374N
PhV-144	N33D D92N I120L Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261 H N270Q I300L H374N
PhV-145	N33D D92N I120L Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261H N270Q L371A H374N
PhV-146	N33D R67L D92N I120L Q121T A123V A144E T152G S164E A166E A200N S217G D258N S261 H N270Q L371A H374N o
PhV-147	N33D D92N I120L Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261H N270Q I300L L371A H374N.

5 Esas mutaciones acumulativas especialmente preferidas de las fitasas sintéticas hacen en cada caso que la termostabilidad aumente hasta al menos 83° C. Por lo tanto, esas realizaciones especialmente preferidas dan por resultado termostabilidades que son superiores al menos 18° C por encima de los 65° C de la fitasa de tipo silvestre de *Hafnia* sp LU11047. El perfil del pH de la termostabilidad de algunas fitasas de acuerdo con la invención, se muestra en cada caso en las figuras 1 y 2A, B.

10 En una realización, la fitasa sintética tiene al menos un intercambio conservador de aminoácidos en las posiciones mencionadas, en comparación con una de las fitasas anteriormente descritas, siendo posible que la fitasa sintética tenga al menos una de las modificaciones individuales anteriormente mencionadas o uno de los grupos de modificaciones anteriormente mencionados. Para los fines de la presente invención, conservador significa un intercambio de los aminoácidos G a A; A a G, S; V a I, L, A, T, S; I a V, L, M; L a I, M, V; M a L, I, V; P a A, S, N; F a Y, W, H; Y a F, W, H; W a Y, F, H; R a K, E, D; K a R, E, D; H a Q, N, S; D a N, E, K, R, Q; E a Q, D, K, R, N; S a T, A; T a S, V, A; C a S, T, A; N a D, Q, H, S; Q a E, N, H, K, R. Aquí, es posible combinar cualquier intercambio conservador de un aminoácido con cualquier intercambio conservador de otro aminoácido.

15 Ventajosamente, la fitasa sintética es una fitasa aislada. También es factible que la fitasa sintética esté presente no como una fitasa aislada purificada, sino como un caldo de fermentación, en donde la biomasa esté separada por completo, parcialmente o no esté separada en absoluto. Aquí, el caldo puede concentrarse o secarse totalmente extrayendo el líquido. Es posible emplear esas soluciones de fitasa no purificadas o parcialmente purificadas o fitasas sólidas, como aditivo en diversos productos.

20 Ventajosamente, la fitasa sintética de acuerdo con la invención tiene un alto grado de termostabilidad, un alto grado de estabilidad frente a la pepsina y/o un alto grado de actividad específica en comparación con las dos fitasas de tipo silvestre obtenidas de los organismos *Yersinia mollaretii* y especies de *Hafnia*, que fueron la base para la

construcción de acuerdo con el constructo de fitasa sintética de SEC ID 24.

En una realización particular, la fitasa de acuerdo con la invención permanece sin modificar en las posiciones R18, H19, G20, R22, P24 y H306, D307 respecto a la SEC ID 24 en cuanto al tipo de aminoácido y a la posición de ese aminoácido.

- 5 La invención comprende también una secuencia aislada de ácido nucleico que codifica una fitasa con una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 90 %, preferentemente 95 % y en particular 96, 97, 98 o 99 %, a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 24.

10 En una realización particular, la invención comprende las secuencias de nucleótidos aisladas de acuerdo con la invención anteriormente descritas, exceptuándose las secuencias de nucleótidos que codifican fitasas con las secuencias de aminoácidos del grupo que consiste en SEC ID 18 y los mutantes tal como se describe en la Tabla 6.

En una realización particular, la invención comprende una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica una fitasa, en la que esta codifica una de las fitasas de acuerdo con la invención con excepción de las fitasas con la secuencia de aminoácidos SEC ID 18 y sus mutantes tal como se describen en la tabla 6.

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

La invención comprende de manera similar una célula hospedadora recombinante que comprende uno de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención o que comprende el vector de expresión recombinante de acuerdo con la invención.

20 El objeto se logra asimismo mediante un organismo de producción recombinante, que es un organismo de producción no humano y que comprende una de las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención o que comprende el vector de expresión recombinante de acuerdo con la invención. El organismo de producción recombinante es, especialmente preferentemente, uno del género *Aspergillus*, *Pichia*, *Trichoderma*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*.

25 El objeto se logra, por otra parte, mediante un aditivo para piensos para animales que comprende por lo menos una de las fitasas de acuerdo con la invención y otros aditivos usuales para piensos para animales, por ejemplo para ganado vacuno, aves de corral o cerdos, tales como, por ejemplo, vitaminas, minerales u otros aditivos.

30 El objeto se logra, asimismo, mediante un alimento para animales que contiene por lo menos una de las descritas fitasas sintéticas de acuerdo con la invención, junto con componentes usuales para alimentación animal. En este contexto, son componentes imaginables para la alimentación todos aquellos que se emplean usualmente en pellets para engordar vacunos, vacas lecheras, aves de corral o cerdos.

35 El objeto se logra, asimismo, mediante el uso de una de las fitasas sintéticas de acuerdo con la invención descritas, o del aditivo para pienso para animales de acuerdo con la invención que comprende al menos una de las fitasas sintéticas de acuerdo con la invención, en un pienso para animales. En este contexto, el uso puede tener lugar en forma de adición de la fitasa de acuerdo con la invención o del aditivo para pienso para animales de acuerdo con la invención antes de convertir en pellets los restantes componentes del pienso. También es factible aplicar la fitasa a esos pellets, en particular en forma líquida, después de haberse preparado los pellets de pienso.

40 La invención se consigue además por el uso de una de las fitasas sintéticas de acuerdo con la invención anteriormente descritas, del aditivo para piensos para animales de acuerdo con la invención, el cual comprende al menos una de las fitasas sintéticas de acuerdo con la invención, o del pienso para animales que comprende al menos una de las fitasas sintéticas descritas, para reducir el contenido de fosfato en el estiércol del ganado.

Además, la invención se resuelve por el uso de una de las fitasas sintéticas de acuerdo con la invención descritas anteriormente, del aditivo para piensos para animales de acuerdo con la invención que comprende al menos una de las fitasas sintéticas de acuerdo con la invención, o el pienso para animales que comprende al menos una de las fitasas sintéticas descritas, para reducir el contenido de fosfato en el estiércol del ganado.

45 La renuncia (página 3, líneas 28-30) referente a fitasas con las secuencias de aminoácidos del grupo que consiste en SEC ID 18 y los mutantes como se describen en la tabla 6, pasa a ser por la presente, por referencia, objeto de todas las realizaciones especiales de la invención.

50 Las realizaciones descritas tienen por finalidad ilustrar y dar a entender mejor la invención y no deben de manera alguna interpretarse como limitativas. Otros caracteres distintivos de la invención resultan de la descripción que se hace a continuación de realizaciones preferidas juntamente con las reivindicaciones dependientes. En ese contexto, los caracteres distintivos individuales de la invención pueden estar concretados en cada caso, en una realización, individualmente o varios a la vez, y no constituyen de modo alguno una limitación de la invención a la realización descrita. El texto de las reivindicaciones de la patente se hace por la presente expresamente objeto de la descripción.

55

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la termoestabilidad de las fitasas PhV-020, PhV-010, PhV- 045, PhV-067, PhV-098 de acuerdo con la invención. Las fitasas son calentadas durante 20 min a pH 5,5 a la temperatura indicada. Después de enfriar, se determina la actividad residual a pH 5,5 y 37 °C. Para determinar la actividad residual relativa, se fija en un valor de 100 % la actividad de una muestra de referencia incubada durante 20 min a temperatura ambiente.

Las Figuras 2 A y B muestran los perfiles de pH de las fitasas PhV-107, PhV-108, 5 PhV-111 y PhV-007, PhV-058, PhV-081 de acuerdo con la invención. La actividad de la fitasa es determinada al pH respectivo especificado. Para determinar los datos de la actividad relativa, se mide la actividad determinada a pH 5,5 en 100 %. A) Las fitasas son expresadas en *A. niger* y medidas a partir del sobrenadante del cultivo. B) Las fitasas son expresadas en *E. coli*, concentradas mediante el uso de una columna Ni-NtA, y luego medidas.

La Figura 3 muestra el mapa de plásmidos del plásmido de expresión pFus5#2.

La Figura 4 muestra el mapa de plásmidos del plásmido de expresión pH6- Fus5#2.

La Figura 5 muestra el mapa de plásmidos del plásmido de expresión pGLA53-Fus5#2.

Ejemplos**Clonación de la fitasa de *Hafnia* sp. LU11047**

Las fitasas se buscan en una serie de enterobacterias de manera análoga a lo descrito en las publicaciones Huang y col. (2006) A novel fitasa with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. *Biochem Biophys Res Commun* 350: 884-889 Shi y col. (2008) A novel phytase gene *appA* from *Buttiauxella* sp. GC21 isolated from grass carp intestine. *Aquaculture* 275:70-75 y el documento W02008116878 (Ejemplo 1) con la ayuda de los oligos degenerados Haf1090 5'-GAYCCNYTNTTYCAYCC-3' (SEC ID: 1) y Haf1092 5'-GGNGTRTTRTCNGGYTG-3' (SEC ID: 2) a temperaturas de hibridación de entre 40 °C y 50 °C, usando PCR. Los productos de PCR que se forman son empleados como molde para una PCR semianidada usando los oligos Haf1090 5'-GAYCCNYTNTTYCAYCC-3' (SEC ID 1) y Haf1091 5'-GCDATRTTNGTRTCRTG-3' (SEC ID 3) en idénticas condiciones de hibridación. Un fragmento puede ser aislado a partir de una cepa bacteriana del género *Hafnia* (*Hafnia* sp. LU11047). El fragmento aislado es subclonado con el auxilio del "TOPO TA Cloning® Kit" (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente secuenciado. Partiendo de esta secuencia parcial, la secuencia de longitud completa de la fitasa es amplificada mediante el denominado método TAIL-PCR (Yao-Guang Liu y Robert F. Whittier (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 y YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25, 674-681). Los oligonucleótidos usados para ese fin son los siguientes:

Amplificación del extremo 3':

1. Haf1165 (5'-WCAGNTGWTNGTNCTG-3', SEC ID 4) y Haf1167 (5'-CTTCGAGAGCCACTTTATTACCGTCG-3', SEC ID 5)
2. Haf1165 (5'-WCAGNTGWTNGTNCTG-3', SEC ID 4) y Haf1168 (5'-CCAATGTTGTGCTGCTGACAATAGG-3', SEC ID 6)
3. Haf1165 (5'-WCAGNTGWTNGTNCTG-3', SEC ID 4) y Haf1169 (5'-CCGAACTCATCAGCGCTAAAGATGC-3', SEC ID 7)

Amplificación del extremo 5':

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

Los fragmentos de ADN obtenidos son clonados mediante el "TOPO TA Cloning® Kit" (Invitrogen) y secuenciados. La secuencia de nucleótidos da el gen de la SEC ID 12, que codifica la fitasa LU11047 de *Hafnia* sp. La secuencia de aminoácidos SEC ID 13, que es derivada de la misma, es en un 98 % idéntica a la secuencia de la fitasa de una fitasa de *Hafnia alvei* del documento W0200811678. Usando el software SignalP 2.0, se predice que los aminoácidos 1-33 son un péptido de señal. La enzima madura, por consiguiente, comienza con la serina de la posición 34.

1. Fitasa sintética Fus5#2

Clonación de la fitasa Fus5#2

Tomando como punto de partida el ADN cromosómico de LU11047 de *Hafnia sp.*, se amplifica un fragmento de la base 1-1074 de la fitasa (SEC ID 14) por medio de PCR. De la secuencia de ADN de una supuesta fitasa (o fosfatasa ácida) de *Yersinia mollaretii* ATCC43969, NCBI Sequenz ID ZP_00824387, se obtienen nucleótidos con el fin de amplificar los nucleótidos 1057-1323. Esto se usa para amplificar un segundo fragmento de fitasa del ADN cromosómico de *Yersinia mollaretii* ATCC 43969 (SEC ID 15). Cuando se amplifican los dos fragmentos de fitasa, se genera una superposición de 20 pb respecto al otro fragmento de fitasa, mediante de los oligos usados, ambos en el extremo 3' del fragmento de *Hafnia* y en el extremo 5' del fragmento de *Yersinia*. De tal manera, los dos fragmentos pueden ser combinados mediante fusión por PCR para dar la secuencia de fitasa SEC ID 16, que codifica la fitasa sintética Fus5#2. En cuanto a la secuencia de aminoácidos SEC ID 17, derivada de la misma, el software SignalP 2,0 predice que los aminoácidos 1-33 son un péptido de señal. La fitasa Fus5#2 madura (SEC ID 18) es codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID 19.

Para clonar un plásmido de expresión para *E. coli*, se genera un sitio de escisión restrictivo *NdeI* en el extremo 5' del fragmento de ADN de la fitasa de SEC ID 16 y un sitio de escisión restrictivo *HindIII* y un codón de parada en el extremo 3'. Las secuencias adicionalmente requeridas para tal fin son introducidas por medio de una reacción PCR mediante los cebadores usados con la ayuda de la fitasa de SEC ID 16 como molde. Utilizando esos sitios de escisión, el gen que codifica la fitasa se clona dentro del vector de expresión de *E. coli* pET22b (Novagen). Utilizando el sitio de escisión restrictivo *NdeI* e introduciendo el codón de parada, se elimina del vector la secuencia de señal *pelB* y así se evita que se lea a través de la cola 6xHis que hay en el plásmido. El plásmido pFus5#2 (SEC ID 20) que así se genera es transformado en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen).

Para mejorar la purificación de la proteína fitasa, se clona una variante de la fitasa con una cola 6xHis en el extremo N-terminal. Usando el oligocebador sentido: 5'-ctatggatccgcatcatcatcatcacagtgataccgccctgc-3' (SEC ID 21), que introduce no sólo la cola de 6xHis, sino también un sitio de escisión *BamHI*, y que actúa como molde para la secuencia SEC ID 19, que codifica la proteína fitasa madura, se amplifica un producto PCR. En el extremo 3' del producto de PCR, se introducen nuevamente un codón de parada y un sitio de escisión restrictivo *NdeI* usando el mismo oligo antisentido. El fragmento así generado se clona en el vector pET22b mediante *BamHI/NdeI*, originando el plásmido pH6-Fus5#2 (SEC ID 22), que es transformado de manera similar en *E. coli* BL21(DE3). En el caso de ese constructo, la secuencia de señal *pelB*, que está contenida en el pET22b, es usada para el transporte al periplasma.

Ensayo de fitasa

La actividad de la fitasa es determinada en placas de microtitulación. La muestra de enzima es diluida en un tampón de reacción (acetato de Na 250 mM, CaCl₂ 1 mM, Tween 20 0,01 %, pH 5,5). Se incuban 10 µl de la solución de enzima con 140 µl de solución de sustrato (fitato Na 6 mM (Sigma P3168) en tampón de reacción) durante 1 h a 37 °C. La reacción es inactivada añadiendo 150 µl de solución de ácido tricloroacético (15 % p/p). Para detectar el fosfato que se ha liberado, se tratan 20 µl de la solución de reacción inactivada con 280 µl de reactivos de color recién preparados (ácido L-ascórbico 60 mM (Sigma A7506), tetrahidrato de molibdato de amonio 2,2 mM, H₂SO₄ 325 mM) y se incuban durante 25 min a 50 °C y posteriormente se determina la absorción a 820 nm. En cuanto al valor en blanco, el tampón de sustrato es incubado solo, a 37 °C y los 10 µl de muestra de enzima son añadidos sólo después de haberse efectuado la inactivación con ácido tricloroacético. La reacción de color es llevada a cabo de manera análoga a la aplicada en las mediciones restantes. La cantidad de fosfato liberado es determinada por medio de una curva de calibración de la reacción de color con una solución de fosfato cuya concentración es conocida.

Expresión en *Escherichia coli*

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

Purificación mediante cromatografía de afinidad con níquel

Para purificar las variantes de fitasa marcadas con 6xHis, se trata un caldo de cultivo de *E. coli* inducido que exprese fitasa con NaCl 300 mM, Complete™ Protease Inhibitor sin EDTA (siguiendo las instrucciones del fabricante Roche Applied Science) y con una solución 10x BugBuster (Novogen) 10 % (v/v) y la mezcla es incubada durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez efectuada la centrifugación, el sobrenadante se une a las columnas de Ni-NTA/KIT (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución que sigue a los pasos de lavado se efectúa usando un tampón de elución frío (tampón de acetato Na 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM, CaCl₂ 1 mM). Antes de determinarse el contenido de proteína, se cambia el tampón de la muestra por uno de citrato sódico 2 mM de pH 5,5.

Expresión en *Aspergillus niger*

Para expresar la fitasa Fus5#2 en *Aspergillus niger*, se prepara primeramente un constructo de expresión que comprende el gen de la fitasa bajo el control del promotor de la glucoamilasa (glaA) de *A. niger*, flanqueado por la región 3'-glaA no codificadora. De esta manera, el constructo tiene por finalidad la integración en la región 3'-glaA en *A. niger*. La secuencia de señal usada para la secreción extracelular de la proteína es la secuencia de señal de la fitasa de *A. ficuum*. La base usada para el constructo de expresión es el plásmido pGBGLA-53 (también llamado pGBTOPFYT-1 en el documento W09846772), que se describe en detalle en el documento EP0635574B1. Mediante técnicas de clonación basadas en PCR, que son conocidas para un experto en la materia, el segmento de gen de la fitasa de *A. ficuum*, que codifica la proteína fitasa madura que comienza con la secuencia de aminoácidos ASRNQSS, es reemplazado en pGBGLA-53 por el segmento del gen de SEC ID 19, que codifica la fitasa Fus5#2 madura. Esto da lugar al plásmido pGLA53-Fus5#2 (SEC ID 23) resultante. La cotransformación del casete de expresión lineal, aislado del plásmido resultante mediante el uso de *Hind*III, junto con un casete marcador amdS, aislado del plásmido pGBLA50 (EP0635574B1) / pGBAAS-1 (nombre del mismo plásmido en el documento W09846772), en una cepa de expresión de *A. niger* con delección de glaA, y la subsiguiente expresión de la fitasa en matraces agitados, se lleva a cabo tal como se describe en las dos memorias descriptivas de la citada patente. La actividad de la fitasa en el sobrenadante del cultivo es determinada a diario una vez centrifugadas las células. La actividad máxima se logra entre el día 3 y el día 6.

2. Variantes de la fitasa Fus5#2

Las variantes de la fitasa son generadas mediante mutación de la secuencia de genes de la SEC ID 19 por medio de PCR. Se usa el "Quickchange Site-directed Mutagenesis Kit" (Stratagene) para llevar a cabo una mutagénesis dirigida. Se lleva a cabo una mutagénesis aleatoria de la SEC ID 19 a lo largo de toda la secuencia codificadora, o en sólo una parte de ella, mediante el "GeneMorph II Random Mutagenesis Kit" (Stratagene). La tasa de mutagénesis se fija en la cantidad deseada de 1-5 mutaciones mediante la cantidad de los ADN molde utilizados. Se generan mutaciones múltiples por medio de una combinación de mutaciones dirigidas o mediante la realización secuencial de varios ciclos de mutagénesis.

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

El término SEC ID 24 se refiere a la variante de fitasa que difiere de la SEC ID 18 por las siguientes mutaciones: A89T D138N A142T H143Y N202S K207E A209Q H228Y K234V T242N Q244S D247K K251N Q256H T277A A279S H280N G283N S284P I286A A287T S288E R289S P290K S314G T320N F356I H413Q. Todos los demás mutantes (véase tabla 1) se consideran basados en la SEC ID 24 y están caracterizados con referencia a las modificaciones basadas en las posiciones de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 24. Estas variantes de fitasa son clonadas en un vector de expresión de *E. coli* pET22b (Novagen) de modo análogo a los procedimientos descritos en la sección anterior y posteriormente expresadas mediante la cepa de *E. coli* BL21(DE3). Además, se clonan constructos de expresión apropiados para *Aspergillus niger*, de modo que la fitasa pueda ser expresada después de la transformación en *A. niger*.

Determinación de la termoestabilidad (T₅₀)

Para registrar la curva de inactivación térmica, la muestra de enzima que se diluye en tampón de reacción (acetato Na 250 mM, CaCl₂ 1mM, Tween 20 0,01 %, pH 5,5) es calentada durante 20 min a las temperaturas correspondientes y a continuación enfriada hasta 4 °C. Una muestra de referencia no sometida a tratamiento térmico se deja a temperatura ambiente durante 20 min y después es enfriada de manera similar hasta 4 °C. Después del pretratamiento térmico, la actividad enzimática de las muestras es determinada por medio del ensayo de fitasa. La actividad de la muestra de referencia es normalizada hasta el 100 %. La termoestabilidad de las diversas variantes de fitasa es caracterizada por lo que se conoce como valor T₅₀. La T₅₀ indica la temperatura a la cual persiste un 50 % de actividad residual tras la inactivación térmica, en comparación con una muestra de referencia no sometida a tratamiento térmico. Los cambios que pudiera haber en la termoestabilidad de las dos variantes de fitasa, expresados en °C, resultan de la diferencia entre los respectivos valores T₅₀.

Tabla 1: Termoestabilidad (T₅₀) de las variantes de fitasa en °C (véase también la Figura 1). Los cambios con respecto a la SEC ID 24 son especificados en intercambios individuales de aminoácidos en la forma [α- aminoácido original][posición][aminoácido nuevo]. En este caso el símbolo "-" indica una delección del aminoácido en cuestión. La numeración de la posición del aminoácido se refiere siempre a la SEC ID 24.

ES 2 562 654 T3

Mutante	Mutación	T₅₀ [°C]
PhV-001	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T A123V T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N D398E	84
PhV-002	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92A Q121T A123V T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N D398E	85
PhV-003	D2E A4E A6S F8Y N33M R67L K76N N78T D92A Q121T A123V T152G S164E A200N D258N M260I S261H N270Q H374N D398E	85
PhV-004	D2E A4E A6S F8Y N33M R67L K76N N78T D92N Q109N Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N D398E	85
PhV-005	P75N D77T D92N Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N	81
PhV-006	Q71E D92N S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	81
PhV-007	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N	81
PhV-008	D92N S136K S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N Q406K	81
PhV-009	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M H37Y K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N	81
PhV-010	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N	82
PhV-011	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M H37Y P75N D77T D92N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	81
PhV-012	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N D398E	82
PhV-013	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N D398K	81
PhV-014	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N D398G	81
PhV-015	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q109E Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	81
PhV-016	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q109N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	81
PhV-017	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q121T Q159N S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	82
PhV-018	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q T322Q H374N	81
PhV-019	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T T152A S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	82
PhV-020	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	83
PhV-021	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M D92N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	82
PhV-022	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	82
PhV-023	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q 1300L H374N	82
PhV-024	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T S136K Q141K S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	82
PhV-025	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T S136K S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	81
PhV-026	S1- D2- T3Q A4G P5AA6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N 77SQD79 D92N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	82
PhV-027	S1- D2- T3Q A4G P5AA6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N 77SQG79 D92N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	81
PhV-028	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T S136K S164E A166E A200N D258N S261 H N270Q H374N	81
PhV-029	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T S136K S164E A166H A200N D258N S261 H N270Q H374N	81
PhV-030	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T S136K S164E A200N S217G D258N S261 H N270Q H374N	82
PhV-031	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N	83
PhV-032	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T N159K S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	81
PhV-033	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N Q406K	81

ES 2 562 654 T3

(continuación)

<u>Mutante</u>	<u>Mutación</u>	<u>T₅₀ [°C]</u>
PhV-034	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	81
PhV-035	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q121T A123V S164E A200N D258N S261 H N270Q I300L H374N	81
PhV-036	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T A144E S164E A166E A200N D258N S261 H N270Q H374N	82
PhV-037	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T A144E S164E A166H A200N D258N S261 H N270Q H374N	82
PhV-038	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T A144E S164E A200N S217G D258N S261 H N270Q H374N	82
PhV-039	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T S164E A166H A200N D258N S261H N270Q H374N D398E	82
PhV-040	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T S164E A200N S217G D258N S261H N270Q H374N D398E	82
PhV-041	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T S136K S164E A200N D258N S261H N270Q H374N D398E	82
PhV-042	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T S136K S164E Q193L A200N D258N S261H N270Q H374N	82
PhV-043	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N N119A Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	81
PhV-044	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N N119T Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	81
PhV-045	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q109N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N	83
PhV-046	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q109N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H K268N N270Q I300L H374N	81
PhV-047	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q109N Q121T S164E A200N D258N S261 H K268N N270Q I300L H374N	81
PhV-048	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76I N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	83
PhV-049	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76R N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	82
PhV-050	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76D N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	82
PhV-051	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q118S Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	82
PhV-052	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q118S N119A Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N	81
PhV-053	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T A123V T152G S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N	83
PhV-054	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q118S N119A Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	82
PhV-055	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q Q276N H374N	83
PhV-056	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q Q276N N346G H374N	82
PhV-057	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q109N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q Q276N I300L N346G H374N	82
PhV-058	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N	83
PhV-059	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N D398E	83
PhV-060	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q109N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q I300L N346G H374N	83
PhV-061	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T E155N S164E A200N D258N S261H N270Q D345G H374N	81
PhV-062	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T A123V S136K T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	82
PhV-063	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q121T E155N S164E A200N D258N S261H N270Q Q276N H374N	82

ES 2 562 654 T3

(continuación)

<u>Mutante</u>	<u>Mutación</u>	<u>T₅₀ [°C]</u>
PhV-064	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-065	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92T Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	83
PhV-066	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92V Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	83
PhV-067	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	85
PhV-068	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92E Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-069	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92T Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-070	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92V Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	85
PhV-072	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92E Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-073	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76I N78T D92N Q109N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N	83
PhV-074	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76I N78T D92N Q109N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N D398E	83
PhV-075	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q109N Q121T A144E S164E A200N S217G D258N S261H N270Q I300L H374N	83
PhV-076	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N	84
PhV-077	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92E Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N	83
PhV-078	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92T Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N	84
PhV-079	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92V Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N	83
PhV-080	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q121T S136K Q141K S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N	81
PhV-081	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T A123V T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N D398E	84
PhV-082	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G T156G S164E A200N D258N S261 H N270Q Q276N H374N D398E	82
PhV-083	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q Q276N I300L H374N D398E	83
PhV-084	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q121T S136K S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	83
PhV-085	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76I N78T D92A Q109N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N	84
PhV-086	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q109N Q121T A123V S164E A200N D258N S261H K268A N270Q Q276N I300L N346G H374N	82
PhV-087	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q121T E155N S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	82
PhV-088	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G T156G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N D398E	83
PhV-089	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N D398E	83
PhV-090	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q121T E155H S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	82
PhV-091	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q121T E155G S164E A200N D258N S261H N270Q D345G H374N	82
PhV-092	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q121T E155N S164E A200N D258N S261H N270Q D345G H374N	82
PhV-093	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q121T E155H S164E A200N D258N S261H N270Q D345M H374N	82
PhV-094	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q109N Q121T A123V T152G T156G S164E A200N D258N S261 H N270Q Q276N I300L N346G H374N	83

ES 2 562 654 T3

(continuación)

<u>Mutante</u>	<u>Mutación</u>	<u>T₅₀ [°C]</u>
PhV-095	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76I N78T D92N Q121T A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261H N270Q H374N D398E	83
PhV-096	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76I N78T D92A Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-097	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q109N Q121T A123V Q159N S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	85
PhV-098	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q121T S136K S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-099	D2E A4E A6S F8Y N33D K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-100	N33D K76N N78T D92N Q121T S164E A200N H374N	82
PhV-101	N33D K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N H374N	83
PhV-102	N33M K76N N78T D92N Q121T S164E A200N H374N	82
PhV-103	N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-104	N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N	84
PhV-105	N33D D92N S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	83
PhV-106	N33D K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H H374N	83
PhV-107	N33D K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	83
PhV-108	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-109	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	83
PhV-110	N33D D92N Q121T T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N	84
PhV-111	N33D D92A Q121T T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N	85
PhV-112	S1-D2-T3Q A4G P5A N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-113	S1- D2- T3Q A4G P5A N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-114	A6D G7K F8M Q9K N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-115	N33D D92A Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N	85
PhV-116	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N	84
PhV-117	S1A D2S T3R A4N N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-118	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N	84
PhV-119	N33D D92N Q121TT152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-120	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-121	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-122	N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-123	D2E A4E A6S F8Y N33D D92N S164E A200N H374N	82
PhV-124	D2E A4E A6S F8Y N33D K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H H374N	85
PhV-125	N33D D92A Q121T A123V T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N	84
PhV-126	N33D D92A Q121T A123V T152G S164E A200N D258N M260I S261H N270Q H374N	84
PhV-127	N33D D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N	84
PhV-128	A4E A6S N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N	84
PhV-129	N33D R67L D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N	84

ES 2 562 654 T3

(continuación)

Mutante	Mutación	T₅₀ [°C]
PhV-130	L16V N33D D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N	83
PhV-131	K12R N33D D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N	84
PhV-132	K12R L16V N33D D92N Q121T T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N	83
PhV-133	S217G D258N M260I S261H N270Q H374N	85
PhV-134	N33D D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A166E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N	85
PhV-135	N33D R67L D92N Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A166E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N	84
PhV-136	N33D D92A Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A166E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N	84
PhV-137	N33D D92A Q121T T152G Q159N S164E A166E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N D398E	83
PhV-138	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A166E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N D398E	84
PhV-139	N33D D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-140	K12R N33D R67L D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-141	L16V N33D R67L D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-142	N33D R67L D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A166E A200N S217G D258N S261H N270Q H374N	84
PhV-143	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A166E A200N S217G D258N S261H N270Q I300L H374N	84
PhV-144	N33D D92N I120L Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261H N270Q I300L H374N	84
PhV-145	N33D D92N I120L Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261H N270Q L371A H374N	84
PhV-146	N33D R67L D92N I120L Q121T A123V A144E T152G S164E A166E A200N S217G D258N S261H N270Q L371A H374N	84
PhV-147	N33D D92N I120L Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261H N270Q I300L L371A H374N	84

Determinación del perfil de pH

- 5 Con el fin de determinar el perfil del pH, se usa para el ensayo de fitasa un tampón de reacción modificado (acetato Na 100 mM, glicina 100 mM, imidazol 100 mM, CaCl₂ 1 mM, Tween 20 0,01 %), que es llevado a valores de pH que están dentro del intervalo de pH 1,5-7 usando ácido clorhídrico diluido. Para determinar la actividad relativa, se establece la actividad medida a pH 5,5 en 100 %. Los resultados se muestran en las Tablas 2 y 3.

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

pH	1,5	2	3	4	5,0	5,5	6	7,0
PhV-107	8	24	51	78	117	100	60	3
PhV-108	8	30	57	81	123	100	68	4
PhV-109	6	24	49	76	127	100	59	3
PhV-110	6	27	48	85	134	100	70	4
PhV-111	7	38	76	105	134	100	57	3
PhV-124	7	41	61	76	125	100	67	4

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

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

5 Determinación de la estabilidad a pH 2

Para determinar la estabilidad a pH 2, la muestra de fitasa es diluida en tampón (glicina 250 mM, BSA 3 mg/ml, pH 2) hasta 30 U/ml. La muestra es incubada durante 30 min a 37 °C. Seguidamente, la muestra es diluida directamente con tampón de reacción (acetato Na 250 mM, CaCl₂ 1 mM, Tween 20 0,01 %, pH 5,5) hasta alcanzar el intervalo de medición óptimo para determinar la actividad de la fitasa (aprox. 0,6 U/ml) y se mide la actividad de la fitasa. A modo de referencia, la muestra es incubada en paralelo durante 30 min a 37 °C en tampón de reacción con una concentración de 30 U/ml y se analiza, de manera similar, la actividad de la fitasa. Las actividades de las muestras sometidas a estrés por pH son normalizadas para ajustarlas al valor de referencia, que se establece en un 100 % de estabilidad. Como comparación con una fitasa comercial, se emplea igualmente en el ensayo Natuphos® (BASF).

15 Tabla 4: Determinación de la estabilidad a pH 2 de algunas variantes de fitasa y de la fitasa Fus5#2 y la fitasa comercial Natuphos®. Las muestras con una estabilidad > 90 % se designan como “estables”. A fin de establecer una mejor diferenciación gradual entre las muestras inestables, las estabilidades medidas se indican en %.

<u>Fitasa</u>	<u>Estabilidad a pH 2</u>
Natuphos®	65%
Fus5#2	estable
Mutante	Mutación con respecto a la SEC ID 24
PhV-056	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q Q276N N346G H374N
PhV-057	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q109N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q Q276N I300L N346G H374N
PhV-058	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-059	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N D398E
PhV-067	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q121T A123V S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N
PhV-081	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T A123V T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N D398E
PhV-107	N33D K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-108	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261H N270Q H374N
PhV-109	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
PhV-110	N33D D92N Q121T T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
PhV-111	N33D D92A Q121T T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N

Determinación de la estabilidad frente a la pepsina

20 Para determinar la estabilidad frente a la pepsina, la muestra de fitasa es diluida hasta 30 U/ml en tampón que comprende pepsina (glicina 250 mM, BSA 3 mg/ml, pH 2, pepsina 10 mg/ml (Sigma P-7000, 445 U/mg). La muestra es incubada durante 30 min a 37 °C. A continuación, la muestra es diluida directamente con tampón de reacción (acetato Na 250 mM, CaCl₂ 1 mM, Tween 20 0,01 %, pH 5,5) hasta alcanzar el intervalo de medición óptimo para determinar la actividad de la fitasa (aprox. 0,6 U/ml), y se determina la actividad de la fitasa. A modo de referencia, la

muestra es incubada en paralelo durante 30 min a 37 °C en tampón de reacción pH 5,5 con una concentración de 30 U/ml y se analiza de manera similar la actividad de la fitasa. Las actividades de las muestras tratadas con pepsina son normalizadas para ajustarlas al valor de referencia, que se establece en el 100 % de estabilidad. Como comparación con una fitasa comercial, se emplea igualmente en el ensayo Natuphos® (Natuphos® 10000L, BASF).

- 5 Tabla 5: Determinación de la estabilidad frente a la pepsina de algunas variantes de fitasa y de la fitasa Fus5#2 y la fitasa comercial Natuphos®. Las muestras con una estabilidad > 80 % son designadas como "estables". A fin de establecer una mejor diferenciación gradual entre las muestras inestables, las estabilidades medidas se indican en %.

<u>Fitasa</u>	<u>Estabilidad frente a la pepsina</u>
Natuphos®	20 %
Fus5#2 SEC ID 18	1 %
<u>Mutante</u>	<u>Mutación con respecto a la SEC ID 24</u>
PhV-056	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q Q276N N346G H374N estable
PhV-057	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q109N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q Q276N I300L N346G H374N estable
PhV-058	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N estable
PhV-059	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N D398E estable
PhV-067	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q H374N estable
PhV-081	Q121T A123V T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N D398E estable
PhV-107	N33D K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N estable
PhV-108	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261H N270Q H374N estable
PhV-109	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A200N D258N S261H N270Q H374N estable
PhV-110	N33D D92N Q121T T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N estable
PhV-111	N33D D92A Q121T T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N estable

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BASF SE

<120> Variantes sintéticas de fitasa

<130> PF 72233

<140> PCT/US

<141>

<150> 61/477645 (Solicitud Provisional de Estados Unidos) 11163453.1 (Solicitud de Prioridad EP)

<151> 21 de abril, 2011 21 de abril, 2011

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n es a, c, g o t

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n es a, c, g o t

15
 <400> 1
 gayccnytnt tycaycc 17

20
 <210> 2
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Cebador

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n es a, c, g o t

35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es a, c, g o t

40
 <400> 2
 ggngtrtrt cnggytg 17

45
 <210> 3
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Cebador

55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n es a, c, g o t

60
 <400> 3
 gcdatrtng trtcrtg 17

65
 <210> 4
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

70
 <220>
 <223> Cebador

75
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n es a, c, g o t

80
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)

ES 2 562 654 T3

<223> n es a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n es a, c, g o t
 5
 <400> 4
 wcagntgwtn gtntctg 16
 10
 <210> 5
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 5
 cttcgagagc cacttatta ccgtcg 26
 20
 <210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 6
 ccaatgttgt gctgctgaca atagg 25
 30
 <210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 7
 ccgaactcat cagcgctaaa gatgc 25
 40
 <210> 8
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n es a, c, g o t
 50
 <400> 8
 cawcgcwnga sasgaa 16
 55
 <210> 9
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Cebador
 65

ES 2 562 654 T3

	<400> 9	
	cgcagttga ctgatgtcg cgcacg	26
5	<210> 10 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador	
	<400> 10	
	gtcgcgcacg ccctatatcg ccaagc	26
15	<210> 11 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador	
	<400> 11	
25	ctgcaaacca tcgcacacgc actgg	25
	<210> 12 <211> 1341 <212> ADN <213> <i>Hafnia</i> sp.	
30	<220> <221> péptido señal <222> (1)..(99)	
35	<400> 12	

ES 2 562 654 T3

atgacaatct ctctgtttaa ccgtaataaa cccgctattg cacagcgtat tttatgtcct 60
 ctgatcgtgg ctttattctc aggtttacog gcatacogca gtgataccgc ccctgctggg 120
 ttccagttgg aaaaggttgt tatcctaagc agacatggcg tacgogcgcc aaccaaaatg 180
 acacaaacga tgcgcaacgt cacacctcac cagtggcctg aatggccggg aaaactcggc 240
 tatatcacgc cccgoggtga acatctgatt agcctgatgg gcggttttta tcgagagcgc 300
 tttcagcaac aaggcttatt acctaaggat aactgtccta caccagatgc cgtgtatggt 360
 tgggcagacg tcgatcaacg cacacgtaaa accggcgagg ccttcttagc gggctctgct 420
 cccagtggtg atttagcgat ccaccatcag caaaacatto agcaggccga tccgctgttc 480
 catcctgtga aagccggtat ctgttcgatg gataaatcac aggcacacgc cgcggttgaa 540
 aagcaggcag gcacaccgat tgagacgctc aatcaacgct atcaagcatc tttagcgctg 600
 atgagttcgg tactcgattt tccaaaatcc ccctattgtc agcagcacia cattggcaaa 660
 ctctgcgatt tttcacaggc gatgcctagc aggctggcga taaatgacga cgtaataaa 720
 gtggctctcg aagggtccgt gggactttca tcgacggttg ctgaaatttt cctgctggaa 780
 cacgctcagg gaatgcctaa agtggcttgg gggaaatctc aactgagca gcaatgggac 840
 tctctgttaa aattgcataa tgogcagttt gacttgatgt cggcagcgc ctatatcgcc 900
 aagcataacg gtactocact gctgcaaacc atcgcacacg cactgggttc caatatcgcg 960
 agtcgcccac tgccggatat ttcgccagac aataagatcc tgtttattgc cggcagcgc 1020
 accaatattg ccaatatttc tggcatgcta gggatgacat ggacacttcc gggacagcca 1080
 gataacacgc ctccgggccc ggcttttagtg tttgaacggt gggtagataa cgcggggaaa 1140
 ccgtatgta gogtgaatat ggtgtatcaa aactggcac agttgcacga ccagacgccc 1200
 ctaacggtgc agcatcctgc gggcagcgtc cgactaaaca taccgggttg cagcgatcaa 1260
 acgcccgatg gctattgccc gctctccacc ttcagccggt tagtcaacca cagcgttgag 1320
 cctgcgtgcc agcttcctta a 1341

5 <210> 13
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> *Hafnia* sp.

10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(33)

<400> 13

ES 2 562 654 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Val Glu Lys Gln Ala Gly Thr Pro Ile Glu Thr Leu Asn Gln

ES 2 562 654 T3

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

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

<400> 14

atgacaatct ctctgtttaa cggtaataaa cccgctattg cacagcgtat tttatgtcct 60
 ctgatcgtgg ctttattotc aggtttaccg gcatacggca gtgataccgc cctgctggg 120
 ttccagttgg aaaaggttgt taccctaagc agacatggcg taogogogcc aacccaaatg 180
 acacaaacga tgcgcaacgt cacacctcac cagtggcctg aatggccggt aaaactcggc 240
 tatatcacgc cccgoggtga acatctgatt agcctgatgg gcggttttta tcgagagcgc 300
 tttcagcaac aaggcttatt acctaaggat aactgtccta caccagatgc cgtgtatggt 360
 tgggcagacg tcgatcaacg cacacgtaaa accggcgagg ccttcttagc gggctcttgc 420
 cccagtggtg atttagcgat ccaccatcag caaaacattc agcaggccga tccgctgttc 480
 catcctgtga aagccggtat ctgttcgatg gataaatcac aggcacacgc cgcggttgaa 540
 aagcaggcag gcacaccgat tgagacgctc aatcaacgct atcaagcatc tttagcgtg 600
 atgagttcgg tactcgattt tccaaaatcc ccctattgtc agcagcacia cattggcaaa 660
 ctctgcgatt tttcacaggc gatgcctagc aggctggcga taaatgacga cggtaataaa 720
 gtggctctcg aaggtgccgt gggactttca tcgacgttgg ctgaaatctt cctgctggaa 780
 cacgctcagg gaatgoccaa agtggcttgg gggaaatctc aactgagca gcaatgggac 840
 tctctgttaa aattgcataa tgcgcagttt gacttgatgt ogogcaogcc ctatatcgcc 900
 aagcataacg gtactocact gctgcaaac accgcacacg cactgggttc caatatcgcg 960
 agtcgcccac tgccggatat ttcgccagac aataagatcc tgtttattgc cggtcacgac 1020
 accaatattg ccaatatttc tggcatgcta gggatgacat ggacacttcc gggg 1074

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

<400> 15

ES 2 562 654 T3

cagcccgata acaccccgcc ggggtggggg ctggtgtttg aactatggca gaatccagat 60
aaccatcagc aatatgtcgc agttaagatg ttctatcaaa caatggatca gttacgaaat 120
agtgaaaagt tagacctgaa aagtcatcca gccggtattg ttccattga gatcgaaggt 180
tgtgagaaca tcggtacaga caaactttgc cagcttgata ccttcaaaa gagagtggct 240
caggtgattg aacctgcatg ccatatttaa 270

5 <210> 16
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> construcción sintética

 <220>
 <221> péptido señal
 <222> (1)..(99)

 15 <400> 16

ES 2 562 654 T3

atgacaatct ctctgtttaa cegtaataaa cccgctattg cacagcgtat tttatgtcct 60
ctgategtgg ctttattctc aggtttaccg gcatacgcca gtgataccgc ccctgctggg 120
ttccagttgg aaaaggttgt tatcctaagc agacatggcg tacgcgcgcc aaccaaaatg 180
acacaaaacga tgcgcaacgt cacacctcac cagtggcctg aatggccggt aaaactcggc 240
tatatcacgc cccgcggtga acatctgatt agcctgatgg gcggttttta tcgagagcgc 300
tttcagcaac aaggcttatt acctaaggat aactgtccta caccagatgc cgtgtatggt 360
tgggcagacg tcgatcaacg cacacgtaaa accggcgagg ccttcttagc gggctcttget 420
ccccagtggt atttagcgat ccaccatcag caaaacattc agcaggccga tccgctgttc 480
catcctgtga aagccggtat ctgttcgatg gataaatcac aggcacacgc cgccggtgaa 540
aagcaggcag gcacaccgat tgagacgctc aatcaacgct atcaagcadc tttagcgtg 600
atgagttcgg tactcgattt tccaaaatcc cctattgtc agcagcacia cattggcaaa 660
ctctgcgatt tttcacaggc gatgcctagc aggctggcga taaatgacga cggtaataaa 720
gtggctctcg aaggtgcccgt gggactttca tcgacgttgg ctgaaatttt cctgctggaa 780
cacgctcagg gaatgcctaa agtggcttgg gggaatattc aactgagca gcaatgggac 840
tctctgttaa aattgcataa tgocgagttt gacttgatgt cgcgcacgcc ctatatcgcc 900
aagcataacg gtactocact gctgcaaacc atcgcacacg cactgggttc caatatcgcg 960
agtcgcccac tgcoggatat ttogccagac aataagatcc tgtttattgc cggtcacgac 1020
accaatattg ccaatatttc tggcatgcta gggatgacat ggacacttcc gggacagccc 1080
gataacaccc cgccgggtgg ggggctggtg tttgaactat ggcagaatcc agataacat 1140
cagcaatatg tcgcagttaa gatgttctat caaacaatgg atcagttacg aaatagtga 1200
aagttagacc tgaaaagtca tccagccggt attgttccca ttgagatcga aggttgtgag 1260
aacatcggta cagacaaact ttgccagctt gataccttcc aaaagagagt ggctcaggtg 1320
attgaacctg catgcoatat ttaa 1344

- 5 <210> 17
- <211> 447
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> construcción sintética
- <220>
- <221> SEÑAL
- <222> (1)..(33)
- 15 <400> 17

ES 2 562 654 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Tyr Gln Ala Ser Leu Ala Leu Met Ser Ser Val Leu Asp Phe Pro

ES 2 562 654 T3

	195							200							205
Lys	Ser	Pro	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Asn	Ile	Gly	Lys	Leu	Cys	Asp	Phe
	210							215				220			
Ser	Gln	Ala	Met	Pro	Ser	Arg	Leu	Ala	Ile	Asn	Asp	Asp	Gly	Asn	Lys
	225					230				235					240
Val	Ala	Leu	Glu	Gly	Ala	Val	Gly	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Ala	Glu	Ile
				245					250					255	
Phe	Leu	Leu	Glu	His	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Lys	Val	Ala	Trp	Gly	Asn
			260					265					270		
Ile	His	Thr	Glu	Gln	Gln	Trp	Asp	Ser	Leu	Leu	Lys	Leu	His	Asn	Ala
		275					280						285		
Gln	Phe	Asp	Leu	Met	Ser	Arg	Thr	Pro	Tyr	Ile	Ala	Lys	His	Asn	Gly
	290						295					300			
Thr	Pro	Leu	Leu	Gln	Thr	Ile	Ala	His	Ala	Leu	Gly	Ser	Asn	Ile	Ala
	305				310						315				320
Ser	Arg	Pro	Leu	Pro	Asp	Ile	Ser	Pro	Asp	Asn	Lys	Ile	Leu	Phe	Ile
				325					330					335	
Ala	Gly	His	Asp	Thr	Asn	Ile	Ala	Asn	Ile	Ser	Gly	Met	Leu	Gly	Met
			340					345					350		
Thr	Trp	Thr	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly
		355					360					365			
Leu	Val	Phe	Glu	Leu	Trp	Gln	Asn	Pro	Asp	Asn	His	Gln	Gln	Tyr	Val
	370					375					380				
Ala	Val	Lys	Met	Phe	Tyr	Gln	Thr	Met	Asp	Gln	Leu	Arg	Asn	Ser	Glu
	385				390					395					400
Lys	Leu	Asp	Leu	Lys	Ser	His	Pro	Ala	Gly	Ile	Val	Pro	Ile	Glu	Ile
				405					410					415	
Glu	Gly	Cys	Glu	Asn	Ile	Gly	Thr	Asp	Lys	Leu	Cys	Gln	Leu	Asp	Thr
			420					425					430		
Phe	Gln	Lys	Arg	Val	Ala	Gln	Val	Ile	Glu	Pro	Ala	Cys	His	Ile	
		435					440					445			

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

5

<220>
<223> proteína quimérica

10

<400> 18

ES 2 562 654 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Leu Glu Gly Ala Val Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile Phe

ES 2 562 654 T3

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

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

5

<220>
 <223> construcción sintética

10

<400> 19

ES 2 562 654 T3

agtgataccg ccctgctgg gttccagttg gaaaaggttg ttatcctaag cagacatggc 60
 gtacggcggc caacccaaaat gacacaaaacg atgcgcaacg tcacacctca ccagtggcct 120
 gaatggccgg taaaactcgg ctatatcacg ccccgcggtg aacatctgat tagcctgatg 180
 ggcggttttt atcgagagcg ctttcagcaa caaggcttat tacctaagga taactgtcct 240
 acaccagatg ccgtgtatgt ttgggcagac gtogatcaac gcacacgtaa aaccggcgag 300
 gccttcttag cgggtcttgc tccccagtgt gatttagcga tccaccatca gcaaaacatt 360
 cagcaggccg atccgctgtt ccatcctgtg aaagccggta tctgttcgat ggataaatca 420
 caggcacacg ccgccgttga aaagcaggca ggcacaccga ttgagacgct caatcaacgc 480
 tatcaagcat ctttagcgct gatgagttcg gtactcgatt ttccaaaatc ccctattgt 540
 cagcagcaca acattggcaa actotcgat ttttcacagg cgatgcctag caggctggcg 600
 ataaatgacg acggtaataa agtggctctc gaaggtgccg tgggactttc atcgacgttg 660
 gctgaaattt tcttctgga acacgctcag ggaatgccta aagtggcttg ggggaatatt 720
 cacactgagc agcaatggga ctctctgtta aaattgcata atgcgcagtt tgacttgatg 780
 tcgcgcacgc cctatatcgc caagcataac ggtactccac tgctgcaaac catcgcacac 840
 gcactggggt ccaatatcgc gagtcgccca ctgcgggata tttcgccaga caataagatc 900
 ctgtttattg ccggtcacga caccaatatt gccaatattt ctggcatgct agggatgaca 960
 tggacacttc cgggacagcc cgataacacc ccgcccgggtg gggggctggt gtttgaacta 1020
 tggcagaatc cagataacca tcagcaatat gtgcgagtta agatgttcta tcaaacaatg 1080
 gatcagttac gaaatagtga aaagttagac ctgaaaagtc atccagccgg tattgttccc 1140
 attgagatcg aaggttgtga gaacatcggg acagacaaac tttgccagct tgataccttc 1200
 caaaagagag tggctcaggt gattgaaact gcatgccata tttaa 1245

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

5

<220>
 <223> construcción sintética

10

<400> 20

ES 2 562 654 T3

agcttgccgc	cgcaactcgag	caccaccacc	accaccactg	agatccggct	gctaacaaag	60
cccgaaagga	agctgagttg	gctgctgcca	ccgctgagca	ataactagca	taacccttg	120
gggcctctaa	acgggtcttg	aggggttttt	tgctgaaagg	aggaactata	tccggattgg	180
cgaatgggac	gcgccctgta	gcggcgcatt	aagcgcggcg	ggtgtggtgg	ttacgcgcag	240
cgtgaccgct	acacttgcca	gcgccttagc	gcccgcctct	ttcgctttct	tcccttcctt	300
tctcgccaag	ttcgccggct	ttcccgcaca	agctctaaat	cgggggctcc	ctttagggtt	360
ccgatttagt	gctttacggc	acctcgacct	caaaaaactt	gattagggtg	atggttcacg	420

ES 2 562 654 T3

tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg acgttggagt ccacgttctt 480
taatagtga ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt 540
tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattggta aaaaatgagc tgatttaaca 600
aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgtttaca atttcaggtg gcacttttcg 660
gggaaatgtg cgcggaacc cttttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc 720
gotcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag 780
tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt 840
tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt 900
gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga 960
acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat 1020
tgacgccggg caagagcaac tcggtgcgcg catacactat tctcagaatg acttggttga 1080
gtactacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag 1140
tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg 1200
accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg 1260
ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgc 1320
agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg 1380
gcaacaatta atagactgga tggaggcggg taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc 1440
ccttcggctt ggtggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggcg 1500
tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac 1560
ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact 1620
gattaagcat tggtaaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa 1680
acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa 1740
aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agegtcagac cccgtagaaa agatcaaagg 1800
atottcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc 1860
gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac 1920
tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagcogt agttaggcca 1980
ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgtc ctgctaatac tgttaccagt 2040
ggotgctgcc agtggcgata agtctgtctt taccgggttg gactcaagac gatagttacc 2100
ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg 2160
aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc 2220
ogaagggaga aaggcggaca ggtatccggg aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac 2280
gagggagctt ccaggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttgccacct 2340

ES 2 562 654 T3

ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc 2400
 cagcaacgcg gcctttttac ggttcoctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt 2460
 tcctgcgta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac 2520
 cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggagagcgc 2580
 cctgatgcgg tattttctcc ttaocgatct gtgoggtatt tcacaccgca tatatggtgc 2640
 actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacaact ccgctatcgc 2700
 tacgtgactg ggtcatggct ggcgcccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac 2760
 gggcttgtct gctcccgca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca 2820
 tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat 2880
 cagcgtggtc gtgaagcgat tcacagatgt ctgocgttc atccgcgtcc agctcgttga 2940
 gtttctccag aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgta agggcggttt 3000
 tttcctgttt ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga 3060
 taccgatgaa acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt 3120
 tactggaacg ttgtgagggg aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa 3180
 tcaactcagg tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttoca cagggtagcc 3240
 agcagcatcc tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt 3300
 ccagacttta cgaaacacgg aaacogaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg 3360
 ttttgacgca gcagtogett cacgtteget cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag 3420
 taaggcaacc ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc 3480
 gtggggccgc catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac 3540
 cagtgaacga ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga 3600
 tcatcgtcgc gctccagcga aagcggctct cgcgaaaaat gaccagagc gctgccggca 3660
 cctgtcctac gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc 3720
 cccgcgcccc ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatc 3780
 ccggtgccta atgagtgagc taacttacat taattgogtt gogotcactg cccgctttcc 3840
 agtcgggaaa cctgtogtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg 3900
 gtttgcgat tgggcgccag ggtggttttt cttttcacca gtgagacggg caacagctga 3960
 ttgccottca ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc 4020
 agcagggcga aatcctgttt gatgggtggt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg 4080
 gtatcgtcgt atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg 4140
 gcgcgcattg cgcocagcgc catctgatcg ttggcaacca gcacgcagc gggaacgatg 4200

ES 2 562 654 T3

ccctcattca gcatttgcac ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtgccttcc 4260
 cgttccgcta tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc 4320
 agacgcgccg agacagaact taatgggccg gctaacagcg cgatttgcctg gtgacccaat 4380
 gcgaccagat gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg 4440
 atgggtgtct ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtgcg ggcagcttcc 4500
 acagcaatgg catcctggtc atccagcggg tagttaatga tcagcccaact gacgcgttgc 4560
 gcgagaagat tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgctc taccatogac 4620
 accaccacgc tggcaccagc ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac 4680
 ggcgcgtgca gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc 4740
 agttgtgtg ccacgcgggtt gggaaatgta ttcagctccg ccacgcggc ttccactttt 4800
 tcccgcgttt tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa 4860
 gagacaccgc catactctgc gacatcgtat aacgctaact gtttcacatt caccaccctg 4920
 aattgactct cttccggggc ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcogatg 4980
 gtgtccggga tctogaagct ctcccttatg cgaactctgc attaggaagc agcccagtag 5040
 taggttgagg ccggttgagca ccgccgcgcg aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc 5100
 caacagtccc ccggccacgc ggcctgccac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag 5160
 cccgaagtgg cgagcccgat cttcccacac ggtgatgtcg gcgatatagg cgcagcaaac 5220
 cgcacctgtg gcgcccgtga tgcggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc 5280
 gatcccgcga aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct 5340
 ctagaaataa ttttgtttaa ctttaagaag gagatataca tatgatgaca atctctctgt 5400
 ttaaccgtaa taaaccgct attgcacagc gtattttatg tcctctgatc gtggctttat 5460
 tctcaggttt accggcatac gccagtgata ccgcccctgc tgggttccag ttggaaaagg 5520
 ttgttatcct aagcagacat ggcgtacgcg ccgcaaccaa aatgacacaa acgatgcgca 5580
 acgtcacacc tcaccagtgg cctgaatggc ccgtaaaact cggctatata acgccccgcg 5640
 gtgaacatct gattagcctg atgggcgggt tttatogaga gcgctttcag caacaaggct 5700
 tattacctaa ggataactgt cctacaccag atgcctgtga tgtttgggca gacgtcagtc 5760
 aacgcacacg taaaaccggc gaggccttct tagcgggtct tgctcccag tgtgatttag 5820
 cgatccacca tcagcaaaac attcagcagc ccgatccgct gttccatcct gtgaaagccg 5880
 gtatctgttc gatggataaa tcacaggcac acgcccgcgt tgaaaagcag gcaggcacac 5940
 cgattgagac gctcaatcaa cgctatcaag catcttttagc gctgatgagt tcggtaactc 6000
 attttccaaa atcccctat tgtcagcagc acaacattgg caaactctgc gatttttccac 6060
 aggcgatgcc tagcaggctg gcgataaatg acgacggtaa taaagtggct ctogaaggct 6120

ES 2 562 654 T3

ccgtgggact ttcacgcagc ttggctgaaa ttttctgct ggaacacgct cagggaatgc 6180
 ctaaagtggc ttgggggaat attcacactg agcagcaatg ggactctctg ttaaaattgc 6240
 ataatgcgca gtttgacttg atgtcgcgca cggcctatat cgccaagcat aacgggtactc 6300
 cactgctgca aaccatcgca cacgcactgg gttccaatat cgcgagtcgc ccaactgccgg 6360
 atatttcgcc agacaataag atcctgttta ttgccgggtca cgacaccaat attgccaata 6420
 tttctggcat gctagggatg acatggacac ttccgggaca gcccgataac accccgccgg 6480
 gtggggggct ggtgtttgaa ctatggcaga atccagataa ccatcagcaa tatgtcgcag 6540
 ttaagatggt ctatcaaaca atggatcagt tacgaaatag tgaaaagtta gacctgaaaa 6600
 gtcacccagc cggattgtt cccattgaga tcgaagggtg tgagaacatc ggtacagaca 6660
 aactttgcca gcttgatacc ttccaaaaga gagtgggtca ggtgattgaa cctgcatgcc 6720
 atatttaaa 6729

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

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 21
 ctatggatcc gcatcatcat catcatcaca gtgataccgc ccctgc 46

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

20 <220>
 <223> construcción sintética

<400> 22

gagatataca tatgaaatac ctgctgccga ccgctgctgc tggctctgctg ctctctgctg 60
 cccagccggc gatggccatg gatatcggaa ttaattcgga tccgcatcat catcatcacc 120
 acagtgatac cgcccctgct gggttccagt tggaaaagggt tgttatocta agcagacatg 180
 gcgtacgcgc gccaaacaaa atgacacaaa cgatgcgcaa cgtcacacct caccagtggc 240
 ctgaatggcc ggtaaaactc ggctatatca cgcccgcggg tgaacatctg attagcctga 300
 tgggcgggtt ttatcgagag cgctttcagc aacaaggctt attacctaag gataactgtc 360
 ctacaccaga tgccgtgtat gtttgggcag acgtcgatca acgcacacgt aaaaccggcg 420
 aggccttctt agcgggtctt gctcccagc gtgatttagc gatccaccat cagcaaaaaca 480
 ttcagcaggc cgatccgctg ttocatcctg tgaaagccgg tatctgttgc atggataaat 540

ES 2 562 654 T3

cacaggcaca cgccgccggt gaaaagcagg caggcacacc gattgagacg ctcaatcaac 600
gctatcaage atctttagcg ctgatgagtt cggtaactcga ttttccaaaa tccccctatt 660
gtcagcagca caacattggc aaactctgcg atttttcaca ggcgatgcct agcaggctgg 720
cgataaatga cgacggtaat aaagtggctc tcgaagggtgc cgtgggactt tcatcgacgt 780
tggtgaaat tttcctgctg gaacacgctc agggaatgcc taaagtggct tgggggaata 840
ttcacactga gcagcaatgg gactctctgt taaaattgca taatgocgag tttgacttga 900
tgtcgcgcac gccctatata gccaaacata acggtaactcc actgctgcaa accatcgcac 960
acgcactggg ttccaatata gcgagtcgcc caactgccga tatttcgcca gacaataaga 1020
tcoctgtttat tgccggtcac gacaccaata ttgccaatat ttctggcatg ctagggatga 1080
catggacact tccgggacag cccgataaca ccccgccggg tggggggctg gtgtttgaac 1140
tatggcagaa tccagataac catcagcaat atgtcgcagt taagatgttc tatcaaacia 1200
tggatcagtt acgaaatagt gaaaagttag acctgaaaag tcatccagcc ggtattgttc 1260
ccattgagat cgaaggttgt gagaacatcg gtacagacia actttgccag cttgatacct 1320
tccaaaagag agtggctcag gtgattgaac ctgcatgcca tatttaaaag cttgcccgcg 1380
cactcgagca ccaccaccac caccactgag atccggctgc taacaaagcc cgaaggaag 1440
ctgagttggc tgctgccacc gctgagcaat aactagcata accccttggg gcctctaaac 1500
gggtcttgag gggttttttg ctgaaaggag gaactatata cggattggcg aatgggacgc 1560
gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtgggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac 1620
acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttcctttc tcgccacggt 1680
cgccggcttt ccccgctcaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc 1740
tttacggcac ctcgacccca aaaaacttga ttagggatgat ggttcacgta gtgggcccac 1800
gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact 1860
cttgttccaa actggaacia cactcaaccct tatctcggtc tattcttttg atttataagg 1920
gattttgcgc atttcggcct attggttaa aaatgagctg atttaacia aatttaacgc 1980
gaattttaac aaaatattaa cgtttacaat ttcaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg 2040
cggaacccct atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca 2100
ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt 2160
ccgtgtcgc cttattccct tttttgoggc attttgctt cctgtttttg ctcaaccaga 2220
aacgctggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga 2280
actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagAAC gttttccaat 2340
gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg cgcgggatta tcccgattg acgcogggca 2400
agagcaactc ggtcgcgcga tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt 2460

ES 2 562 654 T3

cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac 2520
catgagtgat aacactgCGG ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct 2580
aacCGctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaCCGga 2640
gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgcag caatggcaac 2700
aacgTtgCGc aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttCCcggc aacaattaat 2760
agactggatg gaggcggata aagTtgCagg accacttctg cGctcggccc tccCGctgG 2820
ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcGcggtA tcattgcagc 2880
actggggcca gatggtaagc cctcccgat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc 2940
aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcaactga ttaagcattg 3000
gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt gatttaaaac ttcattttta 3060
atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa tcccttaacg 3120
tgagttttcg ttcactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga 3180
tccttttttt ctgCGcgtaa tctgctgctt gcaaacaAAA aaaccacCGc taccagcgtt 3240
ggtttgTttg cCGgatcaag agctaccaac tctttttcCG aaggtaaCTg gottcagcag 3300
agcGcagata ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag ttaggcacc acttcaagaa 3360
ctctgtagca cGcctacat acctcGctct gctaactctg ttaccagtgG ctgctgccag 3420
tgGcgataag tcgtgtctta cGgggttGga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcGca 3480
gCGgtcgggc tgaacggggg gTtcgtGcac acagcccagc ttggagcGaa cGacctacac 3540
cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcGcc acGcttcccG aaggGagaaa 3600
ggcGgacagG tatccGgtaa gCGgCagggt cGgaacagga gagcGcacga gggagcttcc 3660
agggggaaac gectggtatc tttatagTcc tGtcgggTtt cGccacctct gacttgagcG 3720
tcgatttttg tgatgctcgt caggggggCG gagcctatgg aaaaacGcca gcaacGcggc 3780
ctttttacgg ttcctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc ctgCGttatc 3840
ccctgattct gtggataacc gtattaccGc ctttgagtga gctgataacc ctGccCGcag 3900
ccgaacgacc gagcGcagcG agtcagtgag cGaggaagcG gaagagcGcc tgatGcGgtA 3960
ttttctcctt acGcatctgt gCGgtatttc acaccGcata tatggtGcac tctcagTaca 4020
atctgctctg atGccGcata gTtaagccag tatacactcc gctatcGcta cgtgactggg 4080
tcatggctGc gccccGacac cGcCaacac cGctgacGc gcctgacgg gcttGtctGc 4140
tccCGGcatc cGcttacaga caagctgtga cGgtctccGg gagctGcatg tGtcagaggt 4200
tttcaCCgtc atcaCCgaaa cGcGcGaggc agctGcggtA aagctcatca gCGtggtcgt 4260
gaagcGattc acagatgtct gCctgttcat cGcGtccag ctCGttgagt ttctccagaa 4320

ES 2 562 654 T3

gcgttaatgt ctggcttctg ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tcctgtttgg 4380
 tcaactgatgc ctccgtgtaa gggggatttc tgttcatggg ggtaatgata ccgatgaaac 4440
 gagagaggat gctcacgata cgggttactg atgatgaaca tgcccgggta ctggaacgtt 4500
 gtgagggtaa acaactggcg gtatggatgc ggcgggacca gagaaaaatc actcagggtc 4560
 aatgccagcg cttcgttaat acagatgtag gtgttccaca gggtagccag cagcatcctg 4620
 cgatgcagat ccggaacata atgggtgcagg gcgctgactt ccgcgtttcc agactttacg 4680
 aaacacggaa accgaagacc attcattgtt ttgctcaggc ccgagacggt ttgcagcagc 4740
 agtcgcttca cgttcgctcg cgtatcgggt attcattctg ctaaccagta aggcaacccc 4800
 gccagcctag ccgggtcctc aacgacagga gcacgatcat gcgcacccgt ggggcccca 4860
 tgccggcgat aatggcctgc ttctcgccga aacgtttggg ggcgggacca gtgacgaag 4920
 cttgagcgag ggcgtgcaag attccgaata ccgcaagcga caggccgatc atcgtcgcgc 4980
 tccagcgaaa gcggtcctcg ccgaaaatga cccagagcgc tgccggcacc tgtcctacga 5040
 gttgcatgat aaagaagaca gtcataagtg cggcgacgat agtcatgcc ccgcgccacc 5100
 ggaaggagct gactgggttg aaggctctca agggcatcgg tcgagatccc ggtgcctaata 5160
 gagtgagcta acttacatta attgcgttgc gctcaactgcc cgctttccag tcgggaaacc 5220
 tgcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg 5280
 ggcgccaggg tggttttct tttcaccagt gagacgggca acagctgatt gcccttcacc 5340
 gcctggccct gagagagttg cagcaagcgg tccacgctgg tttgccccag caggcgaaaa 5400
 tcctgtttga tgggtggttaa cggcgggata taacatgagc tgtcttcggg atcgtcgtat 5460
 cccactaccg agatatccgc accaacgcgc agcccggact ccgtaatggc gcgcattgcg 5520
 cccagcgcga tctgatcgtt ggcaaccagc atcgcagtgga gaacgatgcc ctcatcagc 5580
 atttgcattg tttgttgaaa accggacatg gcaactccagt cgccttcccg ttccgctatc 5640
 ggctgaattt gattgogagt gagatattta tgccagccag ccagacgcag acgcgccgag 5700
 acagaactta atgggcccgc taacagcgcg atttgcctgg gacccaatgc gaccagatgc 5760
 tccacgocca gtcgcgtacc gtcttcatgg gagaaaataa tactgttgat ggggtgtctgg 5820
 tcagagacat caagaaataa cgcgggaaca ttagtgcagg cagcttccac agcaatggca 5880
 tcctggtcat ccagcggata gttaatgatc agcccactga cgcggtgocg gagaagattg 5940
 tgcaccgccg ctttacaggc ttcgacgccg cttcgttcta ccatcgacac caccacgctg 6000
 gcaccagtt gatcggcgcg agatttaatc gccgcgacaa tttgcgacgg cgcgtgcagg 6060
 gccagactgg aggtggcaac gccaatcagc aacgactggt tgcccggccag ttgttgtgcc 6120
 acgcggttgg gaatgtaatt cagctccgcc atcgcgcgctt ccacttttcc cgcggttttc 6180
 gcagaaacgt ggctggcctg gttcaccag cgggaaacgg tctgataaga gacaccggca 6240

ES 2 562 654 T3

tactctgca catcgtataa cgttactggt ttcacattca ccaccctgaa ttgactctct 6300
 tccggggcgt atcatgccat accgcgaaag gttttgogcc attogatggt gtccgggatc 6360
 tcgacgctct ccottatgcy actoctgcat taggaagcag cccagtagta ggttgaggcc 6420
 gttgagcacc gccgcccga ggaatggtgc atgcaaggag atggcgccca acagtccccc 6480
 ggccacgggg cctgccacca taccoacgcc gaaacaagcg ctcatgagcc cgaagtggcg 6540
 agccccgatct tccccatcgg tgatgtcggc gatataggcg ccagcaaccg cacctgtggc 6600
 gccggtgatg ccggccacga tgcgtccggc gtagaggatc gagatctoga tcccgcgaaa 6660
 ttaatacgac tcaactatagg ggaattgtga gcggataaca attcccctct agaaataatt 6720
 ttgtttaact ttaagaag 6738

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

5

<220>
 <223> construcción sintética

10

<400> 23

aagccttgc atgacatgtca cagtcgaatt ctggggcac gcggtgcttg agggcgaata 60
 cggctccatc ggtgagtaac ctctctctta ctaccacgga aacatcactg acgtaaccag 120
 gaccocggcg cttatccatc atgggaaaca acacctaca atccgccaga attctctcgg 180
 aagaatataa cctctactac tccgtctggt gcgacggtga ccacgagctg tacgatctct 240
 cagtaagtgc caacocggtc ccgccactat cgtaaaaaca aaaaatctaa caacaccaga 300
 cggaccocct ccaaatgaac aacatctaca cccaacaaga caacatccac ctocctaagca 360
 gacctctatc cagcgtgatt gatcgtatcg acgctctcct tctggttctg aaatcctgca 420
 agggtaacac atgcatccag ccgtggcggg tctccaccc cgacgggtcc gtagagagcc 480
 tcaaagatgc actgcaggtg aaatacgatt ccttttacac caaccagccc aaggtgtcgt 540
 attcagtatg tgaaccocggg tacatcattg aggctgaggg gccccaggtc ggattgcagt 600
 atagagatgg gctgagttgg gaggcgtgga cttgacgatt ccgtcaagta tgagtatggg 660
 tacgaataat gagcgttatt gctatgtatt tttatagata gtttatttat atatcatgac 720
 taaacttgag agccatggaa tcaatgaaat gacatggcga gtgtagatca cgatagtcac 780
 agtagccgaa gtgggcggat agccaagaat aacaccagaa tcagataaca ggaacatcac 840
 aaccgatcac accatagata atatccaaag aagtttaaat agccgagaca aagagaatag 900
 agacaagata catggaacaa gaaaggtaca cccggtagat aaaccctggg accggcccca 960
 gtccttacc atagatcaat ccacgggaa caaaccaaa gtcaacaacc accaccacca 1020

ES 2 562 654 T3

ttaccacaac cgcacata gaaccggtga aaaatgacac catcgaatcc ttcaccctaa 1080
 gtaaagccct gtacgttgca tatcgcttaa gcacaaaagt agtagaatag atatgagccc 1140
 gcacgcgagg ccaacgatcc aaactagccc tgacatcaaa gccagcggcg attgogccat 1200
 caagccccog tctcacttca tagtgggaatt gcgggtcacc tcaactgattg actgtctgtc 1260
 tagacacact caccacgca tgctgtctgt gccagaacg tggactttgg ctctgccgag 1320
 ctgaggatc aatatagaat agattggatg taggcccgtta tttttttat ttcgtgtgac 1380
 tcggagattt tatgcgttgt gttgttgggc ggaaaaagaa atatacttcc tttttgttct 1440
 tttcttttcc tctctattgc ttgccttga tatcccttgc atacggtcgg ttgctgattg 1500
 actaagggtg ctgtcttgtg tcaactgaact gctgctcaac ctctgtctgg tattcctggt 1560
 gtcgtgatgg tggggaaaca gttcgagttc gaggaccaga gggatggcat cgtgcctccc 1620
 ttggaggaaa agaaggtcgt cgatgaggtc tataccgata atgatgttgc gtcggaggag 1680
 attgtcaagg actgggatga taaggaggag ggcaagctgc ggaggaagtg agtcgtcact 1740
 gtttccattc actgccatat aggttcaagc atatactgac tggatatag gatcgatcc 1800
 atcctcatcc ccattctcgc tctcgttcc ttcggcctcc agattgatcg cggcaatcc 1860
 agcgcagctc ttacctccac tatcaccgaa gacctaggtg tcaccacgaa ccaaatcaat 1920
 attggaaccc agttgcttcc ggtcgttatt gtcacaccg agatccctc aatatattata 1980
 cttcagcga tccgtcccca ggtctggtg tcggcacagc tgatcgctt gggctctggt 2040
 ggcacattcc aggttttgt acagtcgtac ccggcgtatc tggccacgag gttgttctg 2100
 gggctgttgg agggagggtt tattcctggt ttgtctggtc gtgcgcctt gtctatggtg 2160
 gtagcgctaa caatggggtt ggtacaggtg cctgtacta tctctcgaca tggataaac 2220
 gtctgagac gagtttccgg accactctgt tcttctatgg gcagatggt gccgggtcga 2280
 cctcgagcgg ccgcttcgag gattgctga acattgacat tcggcgtcc gccgggacca 2340
 ccgcggactc gaagctgcct gtgctggtc ggatctttg cggaggctt gaacttgggt 2400
 caaagcgat gtatgatgtt acaacgatg tatcatcgtc gatagacaag aacatgccta 2460
 tcgtgtttgt agcaatgaat tatcgcgtg gaggttccg gttcttccc ggaaaggaga 2520
 tcctggagga cgggtccgag aacctagggc tcctggacca acgccttgc ctgcagtgg 2580
 ttgccgaaa catcgaggcc tttggtggag acccggaaa ggtgacgatt tggggagaat 2640
 cagcaggagc catttccgtt ttgatcaga tgatcttga cgacggaaac atcaattaca 2700
 aggataagcc cttgttccgg gggccatca tggactccgg tagtggtgtt cccgcagacc 2760
 ccgtcgatgg ggtcaaggga cagcaagtat atgatcgggt agtggaaatc gcaggtggt 2820
 cctcttctaa cgacacccta gcttgtctgc gtgaactaga ctacaccgac ttcctcaatg 2880
 cggcaaacctc cgtgccaggc attttaagct accattctgt ggcgttatca tatgtgcctc 2940

ES 2 562 654 T3

gaccggacgg gacggcggtg tcggcatcac cggacgtttt gggcaaagca gggaaatatg 3000
ctcgggtccc gttcatcgtg ggggaccaag aggatgaggg gaccttatto gccttgtttc 3060
agtccaacat tacgacgatc gacgaggtgg tcgactacct ggcctcatak ttcttctatg 3120
acgctagccg agagcagctt gaagaactag tggccctgta cccagacacc accacgtacg 3180
ggtctccggt caggacaggc ggggccaaca actggtatcc gcaatttaag cgattggccg 3240
ccattctcgg cgacttggtc ttcaccatta cccggcgggc attcctctcg tatgcagagg 3300
aaatctcccc tgatcttccg aactggtcgt acctggcgac ctatgactat ggcaccccg 3360
ttctggggac cttccacgga agtgacctgc tgcaggtgtt ctatgggatc aagccaaact 3420
atgcagctag ttctagccac acgtactatc tgagctttgt gtatacgctg gatccgaact 3480
ccaaccgggg ggagtacatt gagtggccgc agtggagga atcgcggcag ttgatgaatt 3540
tcggagcgaa cgacgccagt ctcttacgg atgatttccg caacgggaca tatgagttca 3600
tcctgcagaa taccggggcg ttccacatct gatgccattg gcggaggggt ccggacggtc 3660
aggaacttag ccttatgaga tgaatgatgg acgtgtctgg cctcggaaaa ggatatatgg 3720
ggatcatgat agtactagcc atattaatga agggcatata ccacgcggtg gacctgcggt 3780
atagcttccc gttagttata gtaccatcgt tataccagcc aatcaagtca ccacgcacga 3840
ccggggacgg cgaatccccg ggaattgaaa gaaattgcat cccaggccag tgaggccagc 3900
gattggccac ctctccaagg cacagggcca ttctgcagcg ctggtggatt catcgcaatt 3960
tccccggcc cggcccgaca ccgctatagg ctggttctcc cacaccatcg gagattcgtc 4020
gcctaattgtc tcgtccggtc acaagctgaa gagcttgaag tggcgagatg tctctgcagg 4080
aattcaagct agatgctaag cgatattgca tggcaatatg tgttgatgca tgtgcttctt 4140
ccttcagctt cccctcgtgc agatgaggtt tggctataaa ttgaagtggg tggtcgggggt 4200
tcctgaggg gctgaagtgc ttctccctt ttagacgcaa ctgagagcct gagcttcac 4260
cccagcatca ttacacctca gcaatgggcg tctctgctgt tctacttctt ttgtatctcc 4320
tgtctgggta tgctaagcac cacaatcaaa gtctaataag gaccctccct tccgagggcc 4380
cctgaagctc ggactgtgtg ggactactga tcgctgacta tctgtgcaga gtcacctccg 4440
gactggcagt cccagtgat accgcccctg ctgggttcca gttggaaaag gttggtatcc 4500
taagcagaca tggcgtacgc gggccaacca aatgacaca aacgatgccc aacgtcacac 4560
ctcaccagtg gcctgaatgg ccggtaaaac tcggctatat cacgccccgc ggtgaacatc 4620
tgattagcct gatgggocgt ttttatcgag agcgctttca gcaacaaggc ttattaccta 4680
aggataactg tcctacacca gatgocgtgt atgtttgggc agacgtcgat caacgcacac 4740
gtaaaaccgg cgaggccttc ttagcgggtc ttgctccca gtgtgattta gcgatccacc 4800

ES 2 562 654 T3

atcagcaaaa cattcagcag gccgatccgc tgttccatcc tgtgaaagcc ggtatctggt 4860
 cgatggataa atcacaggca cacgccgcgc ttgaaaagca ggcaggcaca ccgattgaga 4920
 cgctcaatca acgctatcaa gcctctttag cgctgatgag ttcggtaactc gattttccaa 4980
 aatcccccta ttgtcagcag cacaacattg gcaaaactctg cgatttttca caggcgatgc 5040
 cttagcaggct ggcgataaat gacgacggta ataaagtggc tctcgaaggt gccgtgggac 5100
 tttcatcgac gttggetgaa atttcctgc tggaacacgc tcagggaatg cctaaagtgg 5160
 cttgggggaa tattcacact gagcagcaat gggactctct gttaaaattg cataatgcgc 5220
 agtttgactt gatgtcgcgc acgccctata tcgccaagca taacggtact ccaactgctgc 5280
 aaaccatcgc acacgcactg ggtccaata tcgcgagtgc cccactgccg gatatttcgc 5340
 cagacaataa gatcctggtt attgccggtc acgacaccaa tattgccaat atttctggca 5400
 tgctagggat gacatggaca cttccgggac agcccgataa caccocgccg ggtggggggc 5460
 tgggtgttga actatggcag aatccagata accatcagca atatgtcgca gttaagatgt 5520
 tctatcaaac aatggatcag ttacgaaata gtgaaaagtt agacctgaaa agtcatccag 5580
 ccggtattgt toccattgag atcgaaggtt gtgagaacat cggtaacagc aaactttgcc 5640
 agcttgatag cttccaaaag agagtggctc aggtgattga acctgcatgc catatttaga 5700
 caatcaatcc atttcgctat agttaaagga tggggatgag ggcaattggt tatatgatca 5760
 tgatgtagt ggggtgtgat aatagtagtg aaatggaagc caagtcatgt gattgtaatc 5820
 gaccgacgga attgaggata tccggaata cagacaccgt gaaagccatg gtctttcctt 5880
 cgtgtagaag accagacaga cagtccctga tttaccctgc acaaagcact agaaaattag 5940
 cattccatcc ttctctgctt gctctgctga tatcaactgc attcaatgca tagccatgag 6000
 ctcatcttag atccaagcac gtaattccat agccgaggtc cacagtggag cagcaacatt 6060
 ccccatcatt gotttcccca ggggcctccc aaogactaaa tcaagagtat atctctaccg 6120
 tccaatagat cgtcttcgct tcaaaatott tgacaattcc aagagggtcc ccatccatca 6180
 aaccagttc aataatagcc gagatgcatg gtggagtcaa ttaggcagta ttgctggaat 6240
 gtcggggcca gttccgggtg gtcattggcc gcctgtgatg ccatctgcca ctaaatecca 6300
 tcattgatcc accgcccacg agggcgtctt tgctttttgc gcggcgtcca ggttcaactc 6360
 tctctgcagc tccagtccaa cgctgactga ctagtttacc tactggtctg atcggctcca 6420
 tcagagctat ggcgttatcc cgtgccgttg ctgcgcaatc gctatcttga tcgcaacctt 6480
 gaactcactc ttgttttaat agtgatcttg gtgacggagt gtcggtgagt gacaaccaac 6540
 atcgtgcaag ggagattgat acggaattgt cgtcccatc atgatgttct tgccggcttt 6600
 gttggcccta ttcgtgggat cgatgccctc ctgtgcagca gcaggtaactg ctggatgagg 6660
 agccatcggg ctctgcacgc aaaccctaact toctottcat tctcacggat gatcaggatc 6720

ES 2 562 654 T3

tccggatgaa ttctccggcg tatatgcogt atacgcaggc gagaatcaag gaaaagggta 6780
 ccgagttctt gaaccatttc gtcactaccg cgctttgctg tccgtcgcgc gtgagtcttt 6840
 ggacgggaag acaggctcat aataactaatg tgacggatgt gaaccgcct tatggtatgg 6900
 aactgcttc gatcggctt gattcttcag cgtggttaca attgctaag cggcataggc 6960
 ggatacccca aattcgtcgc tcaaggcttc aacgaaaact tctctcccgt ttggctgcag 7020
 tccgccgggtt acaataccta ctacacgggg aagctgttca actcgcacag tgtcgcctacc 7080
 tataacgcgc cctttgtgaa cggtttcaat ggctccgact tctctctoga cccccacaca 7140
 tattcctact ggaatgcgac ataccagcga aaccatgagc ctccgcggag ttacgagggga 7200
 caatatacta cggatgtgat gaaggagaag gcatcgggat tgttggcaga tgcgctggac 7260
 agtgacgcgc cattcttctt gacggtcgcg ccgatcgcac cgcacacgaa catcgatgtg 7320
 gaggggctga gcgggtgcggg tggaccgaag atgacagagc cgctgcctgc accgagacat 7380
 gcgcatttgt ttgctgatgc aaaggtgccg cggacgccta atttcaatcc ggacaagggtg 7440
 tgtgatatcc tgacacagtg gtggggacgg gcaactgaca gagtaggatt ctgggtgcggg 7500
 gtggatccaa accatggaac tacagaacca gaccgtcatc gactacgaag accatcttta 7560
 tcgccagcgt ctgcgcactt tgcaagccgt cgatgagatg gtggatgcgc tgatcacgca 7620
 gctggaagaa agtgggcaga tcgacaatac ctacatcatt tacagtgctg ataacggcta 7680
 ccacattggc catcaccgtc taccoccccg caagacaact ggctatgaag aggacattcg 7740
 cgtaccatto tacattcgcg gacctggcat tctgagggga aagagcgttg accgtgtaac 7800
 cacgcacatt gacattgcac ctacactggt cgagttggct ggggttccct tgcgagagga 7860
 ctttgacggg actccgatgc ccgtgtcgc tagcaagaag acccagtaa gcttgcatgc 7920
 ctgcaggtcg actctagagg atctgccggt ctccctatag tgagtcgat taatttcgat 7980
 aagccaggtt aacctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgat 8040
 tgggcgctct tccgcttctt cgtcactga ctgcgtgcgc tgggtcgttc ggctgcggcg 8100
 agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 8160
 aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt 8220
 gctggcgttt ttocataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 8280
 tcagagggtg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 8340
 cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttacogga tacctgtcog cctttctccc 8400
 ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt 8460
 cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccggt cagcccagcc gctgcgcctt 8520
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 8580

ES 2 562 654 T3

agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 8640
 gtggtggcct aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa 8700
 gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 8760
 tagcggtggt ttttttgttt gcaagcagca gattacgogc agaaaaaaag gatctcaaga 8820
 agatcctttg atcttttcta cggggtotga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg 8880
 gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg 8940
 aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt 9000
 aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgctgact 9060
 ccccgctcgt tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat 9120
 gataccgca gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaac agccagccgg 9180
 aagggccgag cgcagaagtg gtocctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 9240
 ttgcccggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcccgaac ttggttccat 9300
 tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc 9360
 ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catggtgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt 9420
 cggctcctcc atcgttgtca gaagtaagtt ggcgcagtg ttatcactca tggttatggc 9480
 agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga 9540
 gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcccgga ccgagttgct cttgcccggc 9600
 gtcaatacgg gataataccg cgcacatag cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa 9660
 acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcagatga 9720
 acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 9780
 agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggata agggcgacac ggaaatggtg 9840
 aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 9900
 gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt 9960
 tccccgaaa gtgccacctg acgtotaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 10020
 aatagcgt atcacgaggc cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct 10080
 ctgacacatg cagctcccg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg cccgggagcag 10140
 acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cgggctggc ttaactatgc 10200
 ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca ccatatggac atattgtcgt tagaacgogc 10260
 ctacaattaa tacataaact tatgtatcat acacatacga tttaggtgac actatagaac 10320
 tcgagcagct g 10331

<210> 24
<211> 414
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> construcción sintética

10

<400> 24

ES 2 562 654 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 562 654 T3

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

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

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

Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr Glu
 275 280 285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 25

5

10

ES 2 562 654 T3

agcgataccg cccccgcggg cttccagctg gagaagggtg tcattctctc gcgtcacggt 60
 gtccgagccc ccaccaagat gacacagacg atgcgcgatg tcactccaca tcagtggcct 120
 gagtggcccg tgaagctcgg ctacatcact cctcgtggag aacacctcat cagcctgatg 180
 ggcggtttct atagggaacg gttccagcag cagggattgc ttccaagga caactgtccg 240
 acccccgacg ccgtctacgt gtggaccgac gttaaccage gtaccoccaa gactggagag 300
 gctttcctcg ccggtcttgc goctcagtgt gatctggcca tocaccacca gcagaacatc 360
 acgcaggtcg acccgtgtt tcaccocggtc aaggccggta tctgttcgat gaacaagtct 420
 cagacctatg aggctgtoga gaagcaggct ggcggcccta ttgagacgct aaaccagcgc 480
 taccaggccg aactggcatt gatgtcctct gtgttggatt tccccaagtc cccatattgc 540
 cagcagcata acatoggcaa actgtgcgac ttttcacagg ctatgcctag ccgcctcaac 600
 atctccgatg acgggaatga ggtgcaactc gaaggcgcgc toggtcttgg ttccacgctc 660
 gccgagatct tcctactgga atacgctcag ggtatgcctg tggtcgcctg gggcaacatt 720
 cacaacgaga gccagtggaa gagcctcctt aacttgcaca acgccattt caacctgatg 780
 cacagaacgc cctacattgc caagcaccag ggaaccocctt tacttcaggc tatcagcaac 840
 gctctcaacc caaatgcaac tgagtccaag ctccccgata tctctcccga caacaagatc 900
 cttttcattg ccggccacga caccaacatc gcaaacatcg gaggcattgt gggatgaac 960
 tggactctcc cgggocagcc agacaatact ccgcccgccg gtggactggt tttcgaactc 1020
 tggcagaacc cggataacca tcagcagtac gttgcggtga agatgatcta ccagaccatg 1080
 gaccagctgc gcaattccga gaagctggac ttgaagagca accctgctgg gatcgteccc 1140
 attgagatcg aaggttgoga gaacatcggg accgacaagc tgtgccagct ggatactttt 1200
 cagaagcgtg ttgcccaggt cattgagccc gcgtgccaaa tctaa 1245

5 <210> 26
 <211> 10331
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> construcción sintética
 10 <400> 26

ES 2 562 654 T3

aagcttgc	atgcatccag	ccgtggcggg	tcctccacc	cgacgggtcc	gtagagagcc	60
aggtaaac	atgcatccag	ccgtggcggg	tcctccacc	cgacgggtcc	gtagagagcc	120
aggtaaac	atgcatccag	ccgtggcggg	tcctccacc	cgacgggtcc	gtagagagcc	180
aggtaaac	atgcatccag	ccgtggcggg	tcctccacc	cgacgggtcc	gtagagagcc	240
aggtaaac	atgcatccag	ccgtggcggg	tcctccacc	cgacgggtcc	gtagagagcc	300
aggtaaac	atgcatccag	ccgtggcggg	tcctccacc	cgacgggtcc	gtagagagcc	360
aggtaaac	atgcatccag	ccgtggcggg	tcctccacc	cgacgggtcc	gtagagagcc	420
aggtaaac	atgcatccag	ccgtggcggg	tcctccacc	cgacgggtcc	gtagagagcc	480

ES 2 562 654 T3

tcaaagatgc actgcaggtg aaatacgatt ccttttacac caaccagccc aaggtgtcgt 540
attcagtatg tgaaccocggg tacatcattg aggctgaggg gccccaggtc ggattgcagt 600
atagagatgg gctgagttgg gaggcgtgga cttgacgatt ccgtcaagta tgagtatggg 660
tacgaataat gagcgttatt gctatgtatt tttatagata gtttatttat atatcatgac 720
taaacttgag agccatggaa tcaatgaaat gacatggcga gtgtagatca cgatagtcac 780
agtagccgaa gtgggocggat agccaagaat aacaccagaa tcagataaca ggaacatcac 840
aaccgatcac accatagata atatcceaag aagtttaaat agccgagaca aagagaatag 900
agacaagata catggaacaa gaaaggtaca ccoggtagat aaaccctggg acgggcccga 960
gtccttacc c atagatcaat cccacgggaa caaaaccaa gtcaacaacc accaccacca 1020
ttaccacaac cgcacaaata gaaccoggtga aaaatgacac catcgaatcc ttcaacctaa 1080
gtaaagccct gtacgttgca tatcgcttaa gcacaaaagt agtagaatag atatgagccc 1140
gcacgcgcgg ccaacgatcc aaactagccc tgacatcaaa gccagcggcg attgcgccat 1200
caagcccccg tctcacttca tagtggaatt gcgggtcacc tcaactgattg actgtctgtc 1260
tagacacact caccocagca tgctgtctgt gcccagaacg tggactttgg ctctgcogag 1320
ctagaggatc aatatataagt agattggatg taggcccgtg ttttttttat ttogtgtgac 1380
tcggagattt tatgcgttgt gttgttgggc ggaaaaagaa atatactttc tttttgttct 1440
ttcttttttc tctctattgc ttgccttggg tatcccttgc atacggtcgg ttgctgattg 1500
actaagggtg ctgtottgtg tcaactgaact gctgctcaac ctctgtctgg tattcctgtt 1560
gtcgtgatgg tggggaacaa gttcaggttc gaggaccaga gggatggcat cgtgcctccc 1620
ttggaggaaa agaaggtcgt cgatgaggtc tataccgata atgatgttgc gtcggaggag 1680
attgtcaagg actgggatga taaggaggag ggcaagctgc ggaggaagtg agtcgtcact 1740
gttttcattc actgccatat aggttcaagc atatactgac tggatatatag gatcgatatac 1800
atcctcatcc ccattctcgc tctcgcttc ttoggcctcc agattgatcg cggcaatatac 1860
agcgcagctc ttacctccac tatcaccgaa gacctagggtg tcaccacgaa ccaaatcaat 1920
attggaacc agttgctttc ggctggtatt gtcacaccg agatcccgtc aaatattata 1980
cttcagcgca tcggtcccca ggtctggtg tcggcacagc tgatcgctt gggctctggtt 2040
ggcacattcc aggcctttgt acagtcgtac ccggcgtatc tggccacgag gttgttgctg 2100
gggctgttgg agggagggtt tattcctggt ttgtctggtc gtgcgcctt gtcctatggtg 2160
gtagocgtaa caatgggttt ggtacaggtg ccctgtacta tctctcgaca tggataaac 2220
gtcctgagac gagtttccgg accactctgt tottctatgg gcagatgtt gccggtgoga 2280
cctcgagcgg ccgcttcgag gattgctga acattgacat tcggcgtccg gccgggacca 2340
ccgcggactc gaagctgcct gtgctggtct ggatctttgg cggaggcttt gaacttggtt 2400

ES 2 562 654 T3

caaaggcgat gtatgatggg acaacgatgg tatcatcgtc gatagacaag aacatgccta 2460
 tcgtgtttgt agcaatgaat tatcgcggtg gaggtttcgg gttcttgccc ggaaaggaga 2520
 tcctggagga cgggtocgog aacotagggc tcctggacca acgccttgcc ctgcagtggg 2580
 ttgccgacaa catcgaggcc tttggtggag acccggacaa ggtgacgatt tggggagaat 2640
 cagcaggagc catttcogtt tttgatcaga tgatcttgta cgacggaaac atcacttaca 2700
 aggataagcc ottgttcogg ggggccatca tggactccgg tagtgttggt cccgcagacc 2760
 ccgtogatgg ggtcaagga cagcaagtat atgatgcggg agtggaatct gcaggctggt 2820
 cctcttctaa cgacacccta gcttgtctgc gtgaactaga ctacaccgac ttctcaatg 2880
 cggcaaactc cgtgocaggc attttaagct accattctgt ggcgttatca tatgtgcctc 2940
 gaccggacgg gacggcggtg tcggcatcac cggacgtttt gggcaaagca gggaaatag 3000
 ctogggccc gttcatcgtg ggcgaccaag aggatgaggg gaccttattc gccttgtttc 3060
 agtccaacat taogacgatc gacgaggtgg tcgactacct ggcctcatac ttcttctatg 3120
 acgctagccg agagcagctt gaagaactag tggcctgta ccagacacc accacgtacg 3180
 ggtctcogtt caggacaggc gcgccaaca actggtatcc gcaatttaag cgattggccg 3240
 ccattctcgg cgacttggtc ttcaccatta cccggcgggc attcctctcg tatgcagagg 3300
 aatctcccc tgatottcog aactggtcgt acctggcgac ctatgactat ggcaccccag 3360
 ttctggggac ttccaogga agtgacctgc tgcaggtggt ctatgggatc aagccaaact 3420
 atgcagctag ttctagccac acgtactatc tgagctttgt gtatacgctg gatccgaact 3480
 ccaaccgggg ggagtacatt gagtggccgc agtggaagga atcgcggcag ttgatgaatt 3540
 tcggagcgaa cgacgccagt ctcottacgg atgatttccg caacgggaca tatgagttca 3600
 tcctgcagaa tacgcggcg ttccacatct gatgccattg gcgagggggt cgggacggtc 3660
 aggaacttag cttatgaga tgaatgatgg acgtgtctgg cctcggaana ggatatatgg 3720
 ggatcatgat agtactagcc atattaatga agggcatata ccacgcgttg gacctgcgtt 3780
 atagcttccc gttagttata gtaccatcgt tataccagcc aatcaagtca ccacgcacga 3840
 ccggggacgg ogaatccccg ggaattgaaa gaaattgcat cccaggccag tgaggccagc 3900
 gattggccac ctctccaagg cacagggcca ttctgcagcg ctggtggatt catcgcaatt 3960
 tccccggcc cggccogaca ccgctatagg ctggttctcc cacaccatcg gagattcgtc 4020
 gcctaatgtc tcgtccgttc acaagctgaa gagcttgaag tggcgagatg tctctgcagg 4080
 aattcaagct agatgctaag cgatattgca tggcaatatg tgttgatgca tgtgcttctt 4140
 ccttcagctt ccoctcgtgc agatgaggtt tggctataaa ttgaagtggg tggtcggggg 4200
 tcogtgaggg gotgaagtgc ttctccctt ttagacgcaa ctgagagcct gagcttcatc 4260

ES 2 562 654 T3

cccagcatca ttacacctca gcaatggggc tctctgtgt tctacttcc ttttatctcc 4320
 tgtctgggta tgctaagcac cacaatcaaa gtctaataag gaccctccct tccgagggcc 4380
 cctgaagctc ggactgtgtg ggactactga tcgctgacta tctgtgcaga gtcacctccg 4440
 gactggcagt cccagcggat accgcccccg cgggcttcca gctggagaag gtggtcattc 4500
 tctcgcgtca cgggtgccga gccccacca agatgacaca gacgatggc gatgtcactc 4560
 cacatcagtg gcctgagtgg cccgtgaage tggctacat cactcctcgt ggagaacacc 4620
 tcatcagcct gatgggcggg ttctataggg aacgggtcca gcagcagga ttgcttcca 4680
 aggacaactg tccgaccccc gacgccgtct acgtgtggac cgacgttaac cagcgtacct 4740
 gcaagactgg agaggctttc ctgcgccgtc ttgcgcctca gtgtgatctg gccatccacc 4800
 accagcagaa catcacgcag gtcgaccgcg tgtttcaccg ggtcaaggcc ggtatctggt 4860
 cgatgaacaa gtctcagacc tatgaggctg tcgagaagca ggctggcggc cctattgaga 4920
 cgctaaacca gcgtaccag gccgaactgg cattgatgtc ctctgtgttg gatttcccca 4980
 agtccccata ttgccagcag cataacatcg gcaaactgtg cgacttttca caggctatgc 5040
 ctagccgcct caacatctcc gatgacggga atgaggtgca actogaaggc gccgtcggtc 5100
 ttggttccac gctcgcggag atcttctac tggaaatcgc tcagggatg cctgtggtcg 5160
 cctggggcaa cattcacaac gagagccagt ggaagagcct ccttaacttg cacaacgccc 5220
 atttcaacct gatgcacaga acgcccata ttgccaagca ccaggaacc ccttacttc 5280
 aggctatcag caacgctctc aaccctaatg caactgagtc gaagctcccc gatctctctc 5340
 ccgacaacaa gatccttttc attgcccggc acgacaccaa catcgcaaac atcggaggca 5400
 tgttgggtat gaactggact ctcccgggcc agccagacaa tactcggccc ggcgggtggac 5460
 tggttttcga actctggcag aaccgggata accatcagca gtacgttgcg gtgaagatga 5520
 tctaccagac catggaccag ctggcgaatt ccgagaagct ggacttgaag agcaaccctg 5580
 ctgggatcgt cccattgag atcgaaggtt gcgagaacat cggtagccgac aagctgtgcc 5640
 agctggatac ttttcagaag cgtgttgccc aggtcattga gcccgggtgc caaatctaaa 5700
 caatcaatcc atttcgctat agttaaagga tggggatgag ggcaattggt tatatgatca 5760
 tgtatgtagt ggggtgcat aatagtagtg aatggaagc caagtcatgt gattgtaatc 5820
 gaccgacgga attgaggata tccggaata cagacaccgt gaaagccatg gtctttcctt 5880
 cgtgtagaag accagacaga cagtccctga tttaccctgc acaaagcact agaaaattag 5940
 cattccatcc ttctctgctt gctctgctga tatcactgtc attcaatgca tagccatgag 6000
 ctcatcttag atccaagcac gtaattccat agccgaggtc cacagtggag cagcaacatt 6060
 ccccatcatt gctttcccca gggcctccc aacgactaaa tcaagagtat atctctaccg 6120
 tccaatagat cgtcttcgct tcaaaatctt tgacaattcc aagaggggtc ccatccatca 6180

ES 2 562 654 T3

aaccagttc aataatagcc gagatgcatg gtggagtcaa ttaggcagta ttgctggaat 6240
gtcggggcca gttccgggtg gtcattggcc gcctgtgatg ccatctgcca ctaaatccga 6300
tcattgatcc accgcccacg agggcgtctt tgctttttgc gcggcgtcca ggttcaactc 6360
tctctgcagc tccagtccaa cgctgactga ctagtttacc tactggtctg atcggctcca 6420
tcagagctat ggcgttatcc cgtgccgttg ctgcgcaatc gctatcttga tcgcaacctt 6480
gaactcactc ttgttttaat agtgatcttg gtgacggagt gtcggtgagt gacaaccaac 6540
atcgtgcaag ggagattgat acggaattgt cgctcccata atgatgttct tgcggcttt 6600
gttggcccta ttcgtgggat cgatgccctc ctgtgcagca gcaggctactg ctggatgagg 6660
agccatcgtt ctctgcacgc aaacccaact tctcttcat tctcaaggat gatcaggatc 6720
tccggatgaa ttctccggcg tatatgccgt atacgcaggc gagaatcaag gaaaagggtg 6780
ccgagttctt gaaccatttc gtcactaccg cgctttgctg tccgtcgcgc gtgagcttt 6840
ggacgggaag acaggctcat aataactaatg tgacggatgt gaaccgcct tatggtatgg 6900
aactgcttc gatcgtctt gattcttcag cgtggttaca attgctaatac cggcataggg 6960
ggatacccca aattcgtcgc tcaaggcttc aacgaaaact tctctcccgt ttggctgcag 7020
tccgccggtt acaataccta ctacacgggg aagctgttca actcgcacag tgctcgtacc 7080
tataacgccc cctttgtgaa cggtttcaat ggctccgact tctctctega cccccacaca 7140
tattcctact ggaatgcgac ataccagcga aaccatgagc ctccgcggag ttacgagggg 7200
caatatacta cggatgtgat gaaggagaag gcatcgggat tgttggcaga tgcgctggac 7260
agtgacgccc cattcttctt gacggctcgc ccgatcgcac cgcacacgaa catcgatgtg 7320
gaggggctga gcggtgcggg tggaccgaag atgacagagc cgctgcctgc accgagacat 7380
gcgcatttgt ttgctgatgc aaagggtgccg cggacgccta atttcaatcc ggacaagggtg 7440
tgtgatatcc tgacacagtg gtggggacgg gcaactgaaa gagtaggatt ctggtgcggg 7500
gtggatccaa accatggaac tacagaacca gaccgtcacc gactacgaag accatcttta 7560
tcgccagcgt ctgcgcactt tgcaagccgt cgatgagatg gtggatgcgc tgatcaogca 7620
gctggaagaa agtgggcaga tcgacaatac ctacatcatt tacagtgtg ataacggcta 7680
ccacattggc catcacctc tccccccgg caagacaact ggctatgaag aggacattcg 7740
cgtaccattc tacattcgcg gacctggcat tctgagggg aagagcgttg accgtgtaac 7800
cacgcacatt gacattgcac ctacactggt cgagttggct ggggttccct tgcgagagga 7860
ctttgacggg actccgatgc ccgtgtcgc tagcaagaag acccagtcaa gcttgcacgc 7920
ctgcaggtcg actctagagg atctgccggt ctccctatag tgagtogtat taatttcgat 7980
aagccaggtt aacctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 8040

ES 2 562 654 T3

tgggogctct tccgcttcoct cgcctcactga ctccgctgcgc tccggtcgttc ggctgcggcg 8100
 agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 8160
 aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcggt 8220
 gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 8280
 tcagaggtgg cgaaccocga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 8340
 cctcgtgogc tctcctgttc cgaccctgcc gcttacccga tacctgtccg cctttctccc 8400
 ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt 8460
 cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccogtt cagcccagacc gctgcgcctt 8520
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 8580
 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 8640
 gtggtggcct aactacggct acactagaag gacagtatctt ggtatctgcg ctctgctgaa 8700
 gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 8760
 tagcggtggt ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga 8820
 agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgcctcagtg aacgaaaact cacgtaaggt 8880
 gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg 8940
 aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg totgacagtt accaatgctt 9000
 aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgcctgact 9060
 ccccgctcgtg tagataacta cgatacggga ggccttacca tctggccccca gtgctgcaat 9120
 gataccgoga gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 9180
 aagggccgag cgcagaagtg gtccctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 9240
 ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcggc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat 9300
 tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gottcattca gctccggttc 9360
 ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catggtgtgc aaaaagcgg ttagctcctt 9420
 cggctcctcc atcgttgtoa gaagtaagtt ggcgcagtg ttatcactca tggttatggc 9480
 agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga 9540
 gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccgcc 9600
 gtcaatacgg gataataccg cgcacatag cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa 9660
 acgttcttcg gggcgaaaao tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 9720
 acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 9780
 agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgtg 9840
 aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat 9900
 gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt 9960

ES 2 562 654 T3

tccccgaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 10020
aataggcgt atcacgaggc cctttcgtct cgcgcgttcc ggtgatgacg gtgaaaacct 10080
ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag 10140
acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc 10200
ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca ccatatggac atattgtcgt tagaacgcgg 10260
ctacaattaa tacataacct tatgtatcat acacatacga tttaggtgac actatagaac 10320
tcgagcagct g 10331

REIVINDICACIONES

1. Una fitasa que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 24.
- 5 2. La fitasa de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una modificación de aminoácidos en al menos una de las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 16, 33, 37, 67, 71, 75, 76, 77, 78, 92, 109, 118, 119, 120, 121, 123, 136, 141, 144, 152, 155, 156, 159, 164, 166, 193, 200, 217, 258, 260, 261, 268, 270, 276, 300, 322, 345, 346, 371, 374, 398 y 406, en base a la posición de acuerdo con la SEC ID 24.
3. La fitasa de acuerdo con la reivindicación 2, que tiene 5, preferentemente 6, 7, 8, 9 o 10, de las modificaciones.
- 10 4. La fitasa de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene al menos una de las modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en S1-; D2-,E; T3Q, A4G,E; P5A; A6S,D; G7K; F8Y,M; Q9K; K12R; L16V; N33D,M; H37Y; R67L; Q71 E; P75N; K76N,1; D77T; N78T; D92A,E,N,T,V; Q109N,E; Q118S; N119A,T; I120L; Q121T; A123V; S136K; Q141K; A144E; T152G,A; E155N; T156G; Q159N; S164E; A166E,H; Q193L; A200N; S217G; D258N; M260I; S261 H; K268N; N270Q; Q276N; I300L; T322Q; D345G; N346G; L371A; H374N; D398E y Q406K respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID 24.
- 15 5. La fitasa de acuerdo con la reivindicación 4, que tiene 5, preferentemente 6, 7, 8, 9 o 10, de las modificaciones.
6. La fitasa de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene al menos una de las modificaciones acumuladas seleccionadas del grupo que consiste en

(PhV-001)	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T A123V T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N D398E
(PhV-002)	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92A Q121T A123V T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N D398E
(PhV-003)	D2E A4E A6S F8Y N33M R67L K76N N78T D92A Q121T A123V T152G S164E A200N D258N M260I S261H N270Q H374N D398E
(PhV-004)	D2E A4E A6S F8Y N33M R67L K76N N78T D92N Q109N Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N D398E
(PhV-020)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-031)	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N
(PhV-048)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76I N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-053)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T A123V T152G S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N
(PhV-055)	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q Q276N H374N
(PhV-058)	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N
(PhV-059)	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N D398E
(PhV-060)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q109N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q I300L N346G H374N
(PhV-064)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-065)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92T Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-066)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92V Q121T S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N
(PhV-067)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-068)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92E Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-069)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92T Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-070)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92V Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-072)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92E Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-073)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76I N78T D92N Q109N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N

ES 2 562 654 T3

(continuación)

(PhV-074)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76I N78T D92N Q109N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N D398E
(PhV-075)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92N Q109N Q121T A144E S164E A200N S217G D258N S261H N270Q I300L H374N
(PhV-076)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q121T A123V S164E A200N D258N S261 H N270Q I300L H374N
(PhV-077)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92E Q121T A123V S164E A200N D258N S261 H N270Q I300L H374N
(PhV-078)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92T Q121T A123V S164E A200N D258N S261 H N270Q I300L H374N
(PhV-079)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92V Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N
(PhV-081)	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T A123V T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N D398E
(PhV-083)	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q Q276N I300L H374N D398E
(PhV-084)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q121T S136K S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-085)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76I N78T D92A Q109N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q I300L H374N
(PhV-088)	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G T156G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N D398E
(PhV-089)	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q I300L H374N D398E
(PhV-094)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q109N Q121T A123V T152G T156G S164E A200N D258N S261 H N270Q Q276N I300L N346G H374N
(PhV-095)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76I N78T D92N Q121T A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261H N270Q H374N D398E
(PhV-096)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76I N78T D92A Q121T A123V S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-097)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q109N Q121T A123V Q159N S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-098)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R K76N N78T D92A Q121T S136K S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-099)	D2E A4E A6S F8Y N33D K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N
(PhV-101)	N33D K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N H374N
(PhV-103)	N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-104)	N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-105)	N33D D92N S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N
(PhV-106)	N33D K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H H374N
(PhV-107)	N33D K76N N78T D92N Q121T S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-108)	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261H N270Q H374N
(PhV-109)	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-110)	N33D D92N Q121T T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
(PhV-111)	N33D D92A Q121T T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
(PhV-112)	S1- D2- T3Q A4G P5A N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N
(PhV-113)	S1- D2- T3Q A4G P5A N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N
(PhV-114)	A6D G7K F8M Q9K N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-115)	N33D D92A Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
(PhV-116)	N33D D92N Q121 T A123V A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
(PhV-117)	S1A D2S T3R A4N N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-118)	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
(PhV-119)	N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-120)	D2E A4E A6S F8Y N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N

ES 2 562 654 T3

(continuación)

(PhV-121)	S1- D2- T3Q A4G P5A A6D G7K F8M Q9K K12R N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N
(PhV-122)	N33M K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H N270Q H374N
(PhV-123)	D2E A4E A6S F8Y N33D D92N S164E A200N H374N
(PhV-124)	D2E A4E A6S F8Y N33D K76N N78T D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261 H H374N
(PhV-125)	N33D D92A Q121T A123V T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-126)	N33D D92A Q121T A123V T152G S164E A200N D258N M260I S261H N270Q H374N
(PhV-127)	N33D D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
(PhV-128)	A4E A6S N33D D92N Q121T T152G S164E A200N D258N S261H N270Q H374N
(PhV-129)	N33D R67L D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
(PhV-130)	L16V N33D D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
(PhV-131)	K12R N33D D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
(PhV-132)	K12R L16V N33D D92N Q121T T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
(PhV-133)	N33D R67L D92N Q121T A123V T152G Q159N S164E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
(PhV-134)	N33D D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A166E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
(PhV-135)	N33D R67L D92N Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A166E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N
(PhV-136)	N33D D92A Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A166E A200N S217G D258N M260I S261 H N270Q H374N
(PhV-137)	N33D D92A Q121T T152G Q159N S164E A166E A200N S217G D258N M260I S261H N270Q H374N D398E
(PhV-138)	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G Q159N S164E A166E A200N S217G D258N M260I S261 H N270Q H374N D398E
(PhV-139)	N33D D92N Q121T A144E T152G Q159N S164E A200N S217G D258N S261H N270Q H374N
(PhV-140)	K12R N33D R67L D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261 H N270Q H374N
(PhV-141)	L16V N33D R67L D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261 H N270Q H374N
(PhV-142)	N33D R67L D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A166E A200N S217G D258N S261 H N270Q H374N
(PhV-143)	N33D D92N Q121T A123V A144E T152G S164E A166E A200N S217G D258N S261 H N270Q I300L H374N
(PhV-144)	N33D D92N I120L Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261 H N270Q I300L H374N
(PhV-145)	N33D D92N I120L Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261 H N270Q L371A H374N
(PhV-146)	N33D R67L D92N I120L Q121T A123V A144E T152G S164E A166E A200N S217G D258N S261H N270Q L371A H374N y
(PhV-147)	N33D D92N I120L Q121T A123V A144E T152G S164E A200N S217G D258N S261 H N270Q I300L L371A H374N.

- 5 7. La fitasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene al menos un intercambio de aminoácidos conservador en al menos una posición en comparación con una de las fitasas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6.
8. La fitasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es una fitasa aislada.
9. La fitasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene una estabilidad elevada frente a la pepsina, una termoestabilidad elevada y/o una actividad específica elevada en comparación con las dos fitasas de tipo silvestre de *Yersinia mollaretii* y de *Hafnia* sp.
- 10 10. La fitasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los aminoácidos no están modificados en las posiciones R18, H19, G20, R22, P24 y H306, D307 respecto a la SEC ID 24.
11. Una secuencia de ácido nucleico aislada, que codifica una fitasa, que codifica una de las fitasas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. Una secuencia de ácido nucleico aislada, que codifica una fitasa, que hibrida en condiciones altamente rigurosas con la cadena complementaria de una de las secuencias de acuerdo con la reivindicación 11.
13. Un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 o 12.
- 5 14. Una célula hospedadora recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 o 12 o el vector de acuerdo con la reivindicación 13.
15. Un organismo de producción recombinante no humano que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 o 12 o el vector de acuerdo con la reivindicación 13.
- 10 16. Un aditivo para piensos para animales que comprende al menos una de las fitasas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y otros aditivos para piensos.
17. Un pienso para animales que comprende al menos una de las fitasas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
18. El uso de una fitasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o del aditivo para piensos para animales de acuerdo con la reivindicación 16 en un pienso para animales.
- 15 19. El uso de una fitasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, del aditivo para piensos para animales de acuerdo con la reivindicación 16 o del pienso para animales de acuerdo con la reivindicación 17 para reducir el contenido de fosfato en el estiércol del ganado.

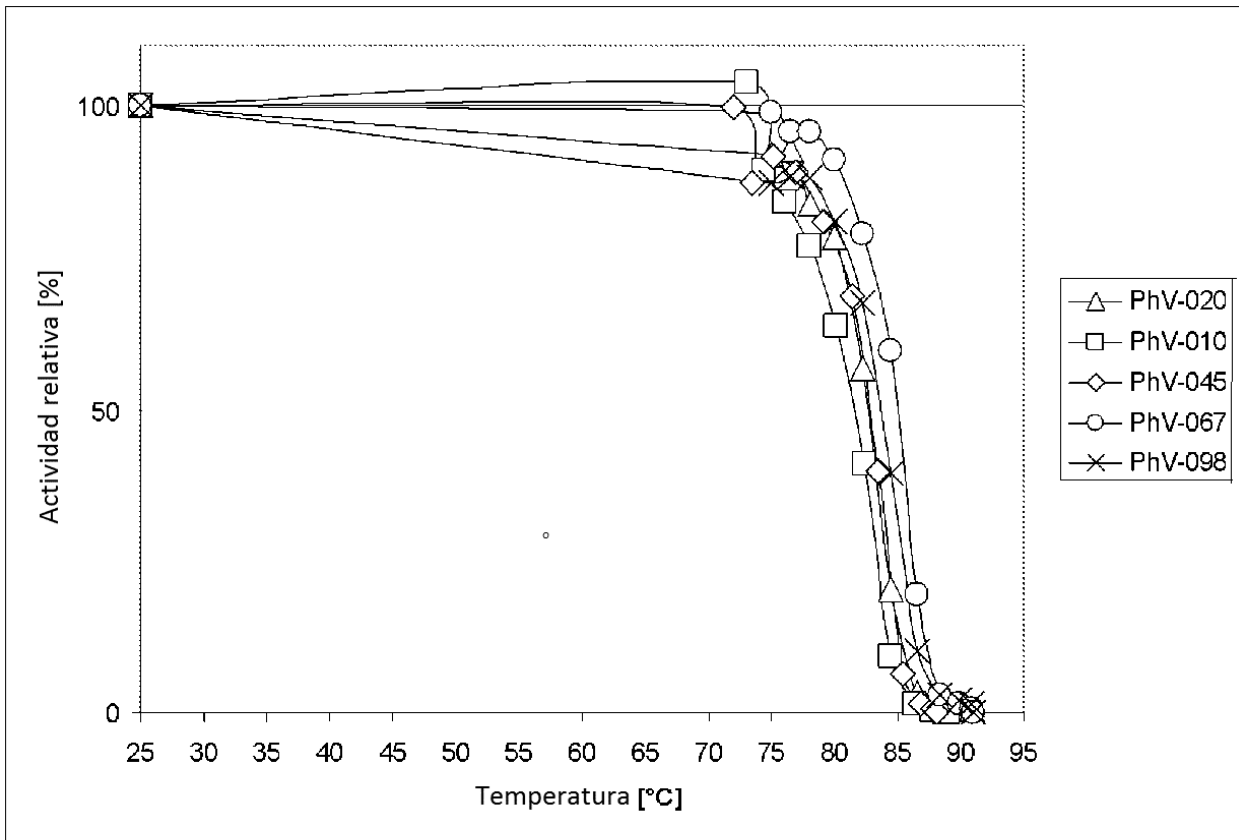


Figura 1

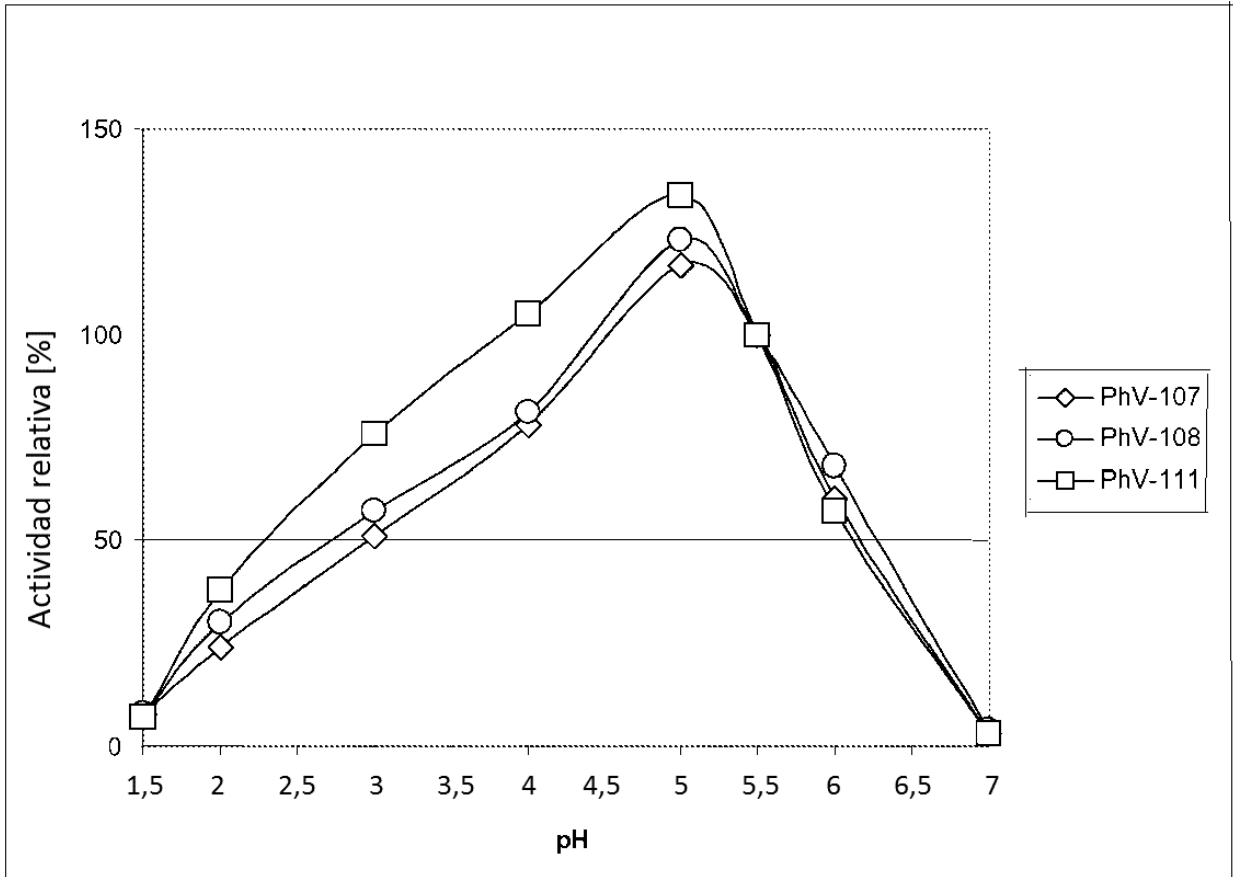


Figura 2A

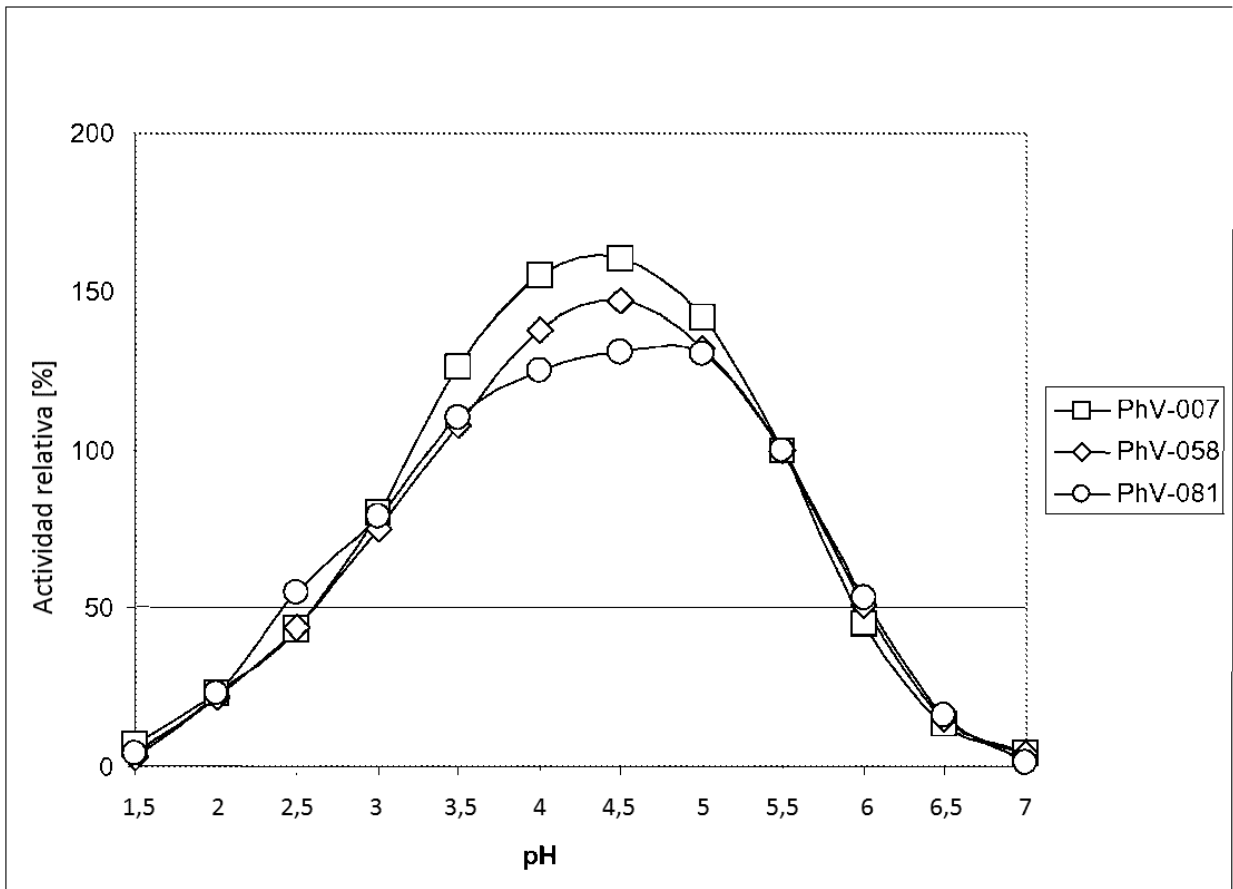


Figura 2 B

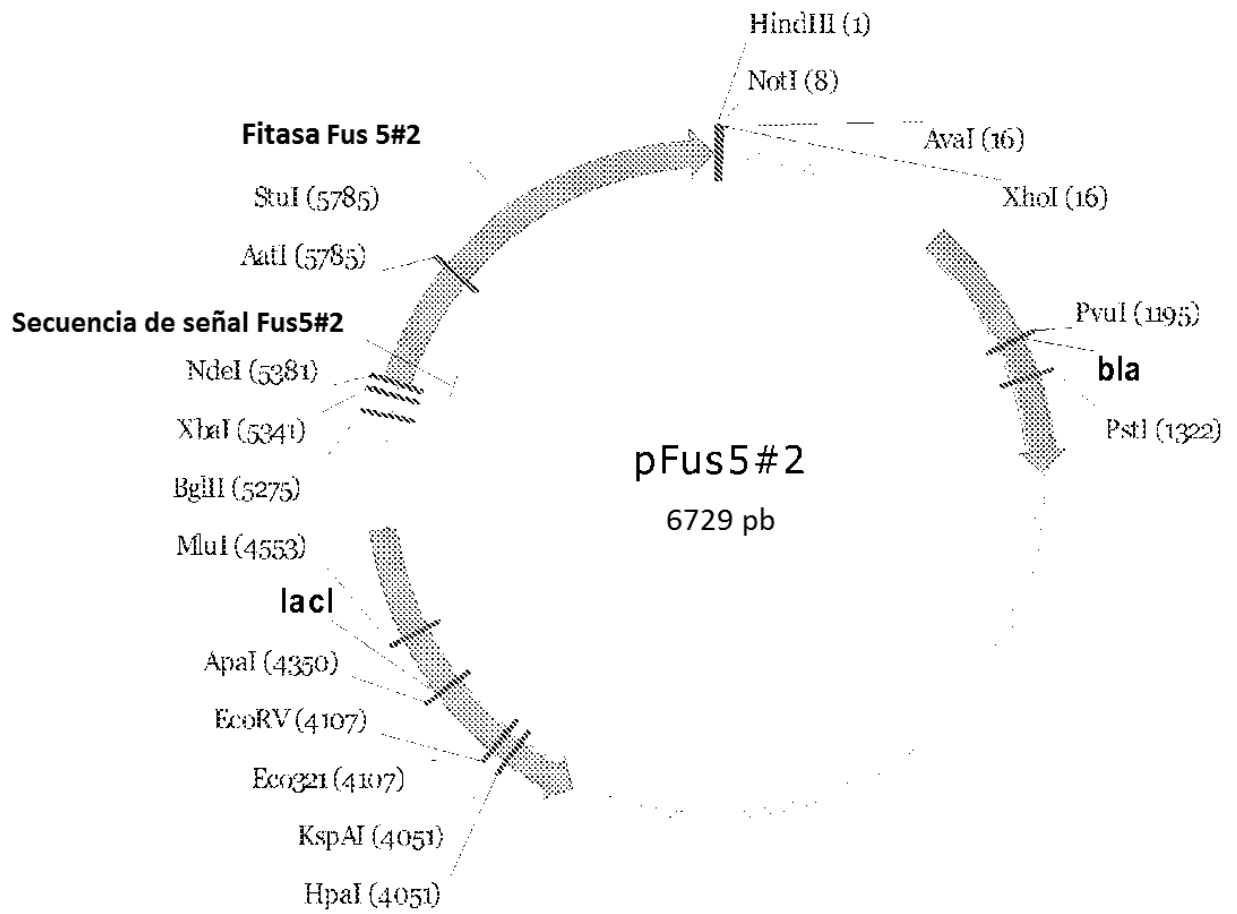


Figura 3

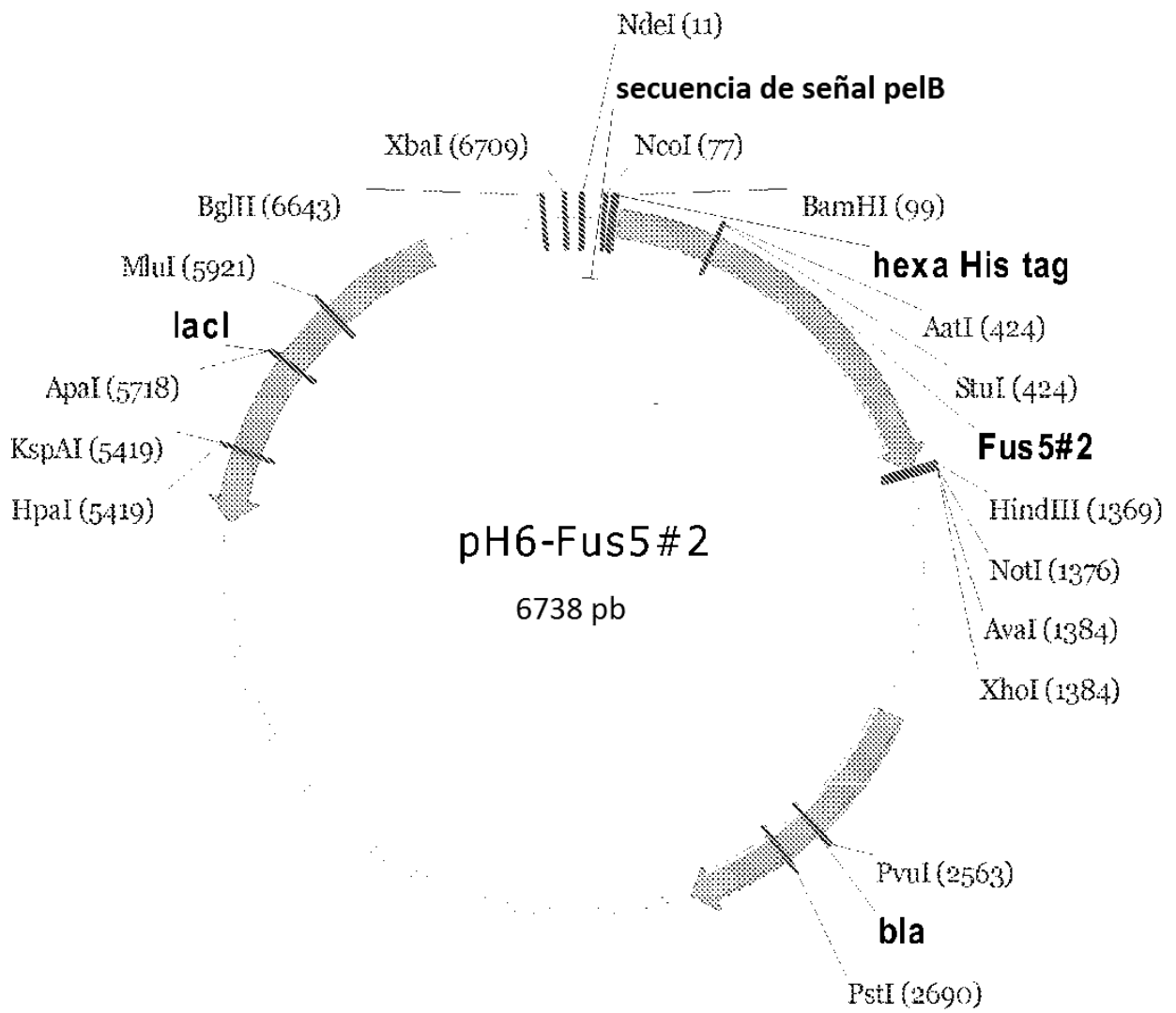


Figura 4

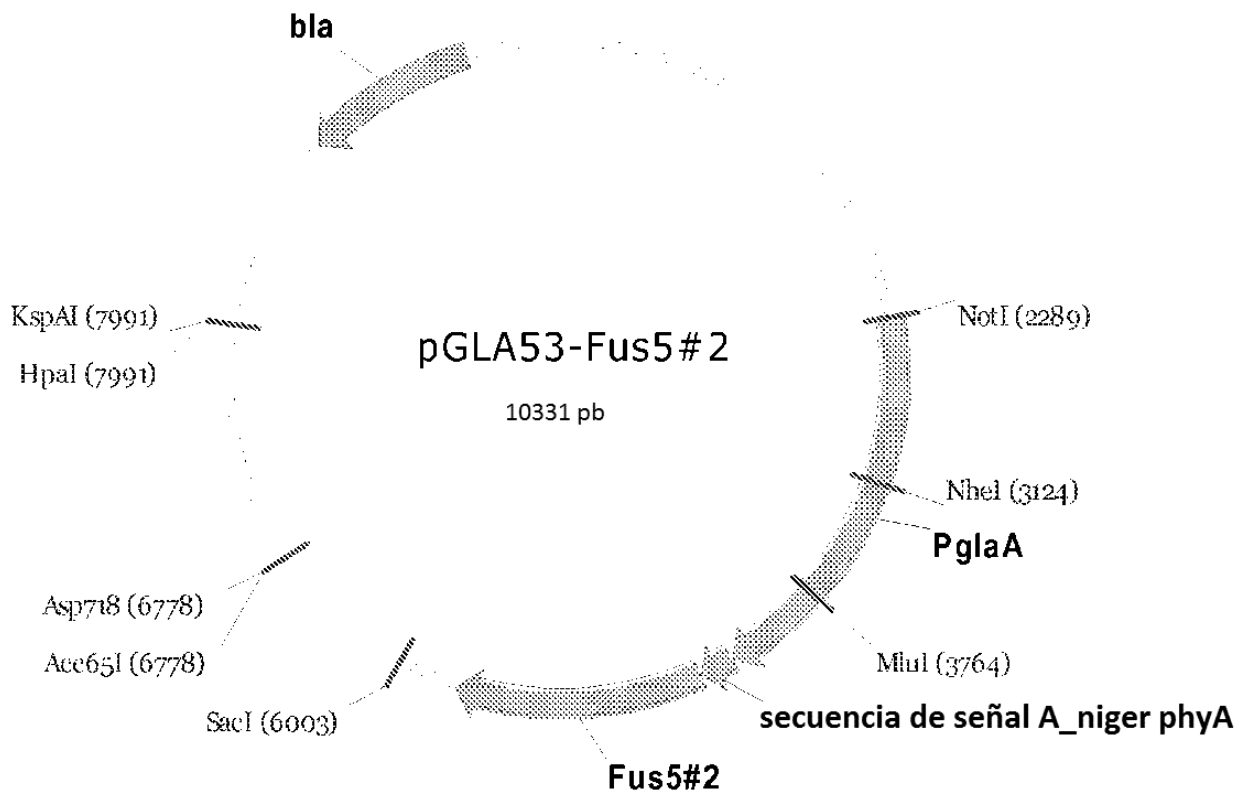


Figura 5