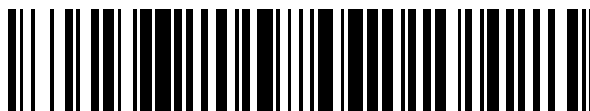


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 819**

51 Int. Cl.:

A23K 20/189 (2006.01)
A23L 33/10 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
A23K 50/30 (2006.01)
A23K 50/75 (2006.01)
A23K 50/80 (2006.01)
C12N 9/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2010** **E 10719104 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016** **EP 2421386**

54 Título: **Complemento para piensos**

30 Prioridad:

24.04.2009 US 172272 P
20.05.2009 GB 0908770
23.12.2009 GB 0922467
10.03.2010 US 312413 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.10.2016

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)
Langebrogade 1
1411 Copenhagen K , DK

72 Inventor/es:

ISAKSEN, MAI FAURSCHOU;
LORENTSEN, RIKKE HØEGH;
PLUMSTEAD, PETER;
ROMERO MILLÁN, LUIS FERNANDO;
MADRID, SUSAN;
LIN, CHERRY;
WARD, MICHAEL y
ZARGAHI, MASOUD RAJABI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 586 819 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

Complemento para piensos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a complementos para piensos. Más específicamente, la presente invención se refiere a complementos para piensos que comprenden fitasas y enzimas lipolíticas que se pueden usar para mejorar la digestión en comidas para animales y a comidas para animales que comprenden los complementos para piensos.

Antecedentes técnicos y técnica anterior

El fitato es una forma de almacenamiento principal de fósforo en cereales y legumbres. Sin embargo, los animales monogástricos tales como cerdos, aves de corral y peces no son capaces de metabolizar o absorber el fitato (o ácido fítico) y por lo tanto se excreta, conduciendo a contaminación por fósforo en zonas de producción ganadera queelar agentes metálicos tales como calcio, cobre y cinc.

A fin de proporcionar suficientes fosfatos para el crecimiento y la salud de estos animales, se añade a sus dietas fosfato inorgánico. Tal adición puede ser costosa e incrementa más los problemas de contaminación.

A través de la acción de la fitasa, el fitato generalmente se hidroliza para dar fosfatos de inositol inferiores y fosfato inorgánico. Las fitasas son útiles como aditivos para piensos en los que mejoran la disponibilidad de fósforo orgánico para el animal y disminuyen la contaminación por fosfato del medio ambiente (Wodzinski RJ, Ullah AH. Adv Appl Microbiol. 42, 263-302 (1996)).

Se ha mostrado que la adición de fitasa a pienso para pollos de engorde incrementa la energía metabolizable aparente (AME, por sus siglas en inglés), la disponibilidad de nitrógeno y aminoácidos (Ravindran, V. et al, Brit. Poultry Sci. 41, 193-200 (2.000)).

Se ha descrito en la bibliografía un número de fitasas de origen fúngico (Wyss M. et al. Appl. Environ. Microbiol. 65 (2), 367-373 (1999); Berka R.M. et al. Appl. Environ. Microbiol. 64 (11), 4423-4427 (1998); Lassen S. et al. Appl. Environ. Microbiol. 67 (10), 4701-4707 (2001)) y bacteriano (Greiner R. et al Arch. Biochem. Biophys. 303 (1), 107-113 (1993); Kerovuo et al. Appl. Environ. Microbiol. 64 (6), 2079-2085 (1998); Kim H.W. et al. Biotechnol. Lett. 25, 1231-1234 (2003); Greiner R. et al. Arch. Biochem. Biophys. 341 (2), 201-206 (1997); Yoon S.J. et al. Enzyme and microbial technol. 18, 449-454 (1996); Zinin N.V. et al. FEMS Microbiol. Lett. 236, 283-290 (2004)).

Sin embargo, las fitasas fúngicas tienden a ser proteolíticamente inestables (Igbasan F.A. et al. Arch. Anim. Nutr. 53,353-373 (2.000)) y por lo tanto propensas a la degradación, mientras que algunas fitasas bacterianas tienen una especificidad de sustrato estrecha para el fitato solo y degradan escasamente los fosfatos de inositol de grados intermedios de fosforilación (Greiner R. et al., Arch. Biochem. Biophys. 303 (1), 107-113 (1993); Kerovuo J et al, Biochem. J. 352, 623-628 (2.000)).

Por otra parte, se sabe que la interacción de calcio con fitato para formar complejos de Ca-fitato es perjudicial para la actividad de las fitasas (Selle, P.H. et al, Livestock Science. 124, 126-141 (2009)). Se ha establecido como hipótesis que el calcio de estos complejos de Ca-fitato forma fitato inaccesible para la fitasa o compite con fitato no complejoado por el sitio activo de la enzima (Long, C., Phytase, Biochemists Handbook, Princeton, NY, Van Nostrand-Reinhold (1961); Wise, A., Nutrition Abstracts & Reviews, 53, 791-806 (1983)).

Se ha mostrado que la adición de fitasa incrementa la AME de una dieta alta en fitato. Ravindran et al. (Br. Poult. Sci., 2.000, 41, 193-200) ha sugerido que los complejos de calcio-fitato reaccionan con ácidos grasos para formar jabones insolubles en la luz del intestino, disminuyendo de ese modo la digestibilidad de las grasas. Se ha sugerido que la adición de fitasa reduce el nivel de estos jabones. Apoyando esta hipótesis, existe la evidencia de que el fitato interacciona con lípido en el maíz (Cosgrove, 1966, Rev. Pure App. Chem. 16:209-224). Estas 'lipofitinas' se han descrito como un complejo de Ca/Mg-fitato, lípidos y péptidos (Cosgrove, 1966, Rev. Pure App. Chem. 16:209-224). Otros trabajos han sugerido interacciones entre Ca, grasa y fitato en la dieta. A modo de ejemplo, Matyka et al. (1990) (Anim. Feed. Sci. Technol. 31:223-230) encontraron que el sebo de la dieta reducía la utilización de fitato P en pollos jóvenes, e incrementaba el porcentaje de grasa excretada como ácidos grasos de jabón.

La adición de lipasas exógenas ha tenido un éxito limitado en el incremento de la digestibilidad de lípidos y minerales. Sin embargo, esto se puede haber limitado por la formación de complejos de ácidos grasos unidos con Ca y fitato (Cosgrove, 1966, anteriormente), que son insolubles en el tracto gastrointestinal y se absorben escasamente (Matyka et al. 1990, anteriormente).

El uso de lipasas exógenas en pienso se ha sugerido previamente con el objetivo de mejorar la digestión de grasas por los animales. Se establece como hipótesis que la lipasa libera ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés) absorbibles más rápidamente de lo que hubiera ocurrido de otro modo. Sin embargo, los intentos de demostrar mejoras en el comportamiento o la digestibilidad de los animales mediante el uso de lipasas exógenas ha

sido en el mejor de los casos inconsistente y a menudo ha mostrado que las lipasas no funcionan. Dierick y Decuyper (2004) (J. Sci. Food Agric. 84:1443-1450) no mostraron mejoras en la digestibilidad de grasas mediante la adición de una lipasa microbiana en dietas para cerdos. Hurtado et al. (2000) (Rev. Bras. Zootec. 29:794-802) no pudieron detectar incrementos de peso corporal, eficacia del pienso y digestibilidad de energía debidos al uso de una lipasa exógena en cochinitos. Adicionalmente, no presentaron efectos aditivos en ninguno de estos parámetros cuando tal lipasa se combinaba con una amilasa y una proteasa. Officer (1995) (Anim. Feed Sci. Technol. 56:55-65) no presentó cambios significativos en el aumento del peso corporal de la toma de pienso de cochinitos por el uso de dos combinaciones de enzimas exógenas que describen como lipasa, proteinasa, B-glucanasa, amilasa y celulosa, y lipasa, B-glucanasa, hemicelulasa, pentosanasa, celulosa, amilasa y proteinasa.

En pollos de engorde, Meng et al. (2004) (Poult. Sci. 83:1718-1727), cuando usaban una lipasa bacteriana en dietas basadas en trigo, no pudieron detectar ningún efecto de la lipasa sobre la digestibilidad aparente de grasa, almidón, nitrógeno y NSP, así como AME. Adicionalmente, rechazaron la hipótesis de que una combinación de carbohidrasas, incluyendo xilanasas, glucanasas y celulasas, además de la lipasa, incrementaría los efectos de la lipasa sobre la digestibilidad de los nutrientes al reducir la viscosidad del digerido e incrementar la digestión y la absorción de grasas.

Al-Marzooqi y Leeson (1999) probaron lipasas de origen animal y extractos pancreáticos. Aunque fueron capaces de demostrar mejoras en la digestibilidad de grasas y reducciones en el nivel de jabones a niveles fecales cuando estos aditivos se usaban en la dieta, también presentaron un efecto anoréxico (reducción de toma de pienso), que explicaron por posibles contaminaciones con pancreocimina en este tipo de extractos. Este hecho limita su utilización en piensos y las posibles mejoras en el crecimiento o la eficacia del pienso en animales.

El documento EP 1 059 041 divulga el uso de triglicéridos que contienen ácidos grasos de cadena media (C4 a C12), combinado con enzimas lipolíticas exógenas (esterasas o lipasas), como un complemento de piensos para animales.

Bogar et al (2003, Biotechnol. Prog. 19, 312-319) estudiaron la producción de fitasa por tres cepas de *Mucor* y ocho de *Rhizopus* mediante fermentación en estado sólido sobre tres ingredientes naturales del pienso comúnmente usados (harina de colza, torta de aceite de coco y salvado de trigo).

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un complemento para piensos que proporcione una disponibilidad mejorada de al menos un nutriente o una mejora en la energía metabolizable aparente a partir de un material para piensos.

Compendio de la invención

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que la adición de un complemento para piensos que comprende al menos una enzima lipolítica específica y al menos una fitasa específica a una comida para animales da como resultado una captación mejorada de al menos un nutriente o mineral en comparación con el uso de las enzimas individualmente.

Según el aspecto más amplio de la presente descripción, se proporciona un complemento para piensos que comprende:-

i. al menos una enzima lipolítica; y

ii. al menos una fitasa.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que contrariamente a los trabajos previos (Mulyantini, N.G.A. et al Aust. Poult. Sci. Symp, 17, 305-307 (2005)), la adición de un complemento para piensos que comprende al menos una fitasa específica y al menos una enzima lipolítica específica a un material para piensos para producir una comida para animales da como resultado un incremento en la disponibilidad de al menos un nutriente y/o un incremento en la energía metabolizable aparente (AME).

Aunque sin querer limitarse por una teoría, los inventores han establecido como hipótesis que este descubrimiento sorprendente se puede deber a la acción de la enzima lipolítica que libera ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés) en una fase temprana de la digestión en la que el pH es ácido. Estos FFA se pueden unir con calcio en exceso para formar jabones en el intestino. Hay menos calcio libre disponible para unirse a fitato, reforzando de ese modo la actividad de la fitasa en las regiones del tracto gastrointestinal (GIT, por sus siglas en inglés) en las que el ácido fítico y el calcio tienden a formar un complejo resistente a fitasas. Esto conduce a un incremento en la liberación y la absorción de fosfato. Los complejos libres de ácido graso-calcio se disuelven más tarde en el GIT dando como resultado un incremento en la absorción de grasa y calcio y/o un incremento en la AME.

La presente invención proporciona un complemento para piensos que comprende una fitasa y una enzima lipolítica, en donde dicha enzima lipolítica tiene actividad de lipasa a un pH en el intervalo de alrededor de pH 1,5 a alrededor de pH 3,5.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una comida para animales que comprende el complemento para piensos según la presente invención o al menos una enzima lipolítica y al menos una fitasa como la definida en un complemento para piensos según la presente invención.

- 5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para elaborar una comida para animales según la presente invención, que comprende añadir a un material para piensos un complemento para piensos según la presente invención.

La presente invención proporciona en otro aspecto un método para elaborar un complemento para piensos según la presente invención, que comprende mezclar al menos una enzima lipolítica y al menos una fitasa.

- 10 La presente invención proporciona en un aspecto adicional un método para incrementar la disponibilidad de al menos un nutriente dietético y/o incrementar la energía metabolizable aparente (AME) de un material para piensos, que comprende añadir al material para piensos un complemento para piensos según la presente invención.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para incrementar la velocidad de crecimiento de un animal, que comprende alimentar al animal con una cantidad eficaz de una comida para animales según la presente invención.

- 15 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un complemento para piensos que comprende una fitasa y una enzima lipolítica en la fabricación de una comida para animales para incrementar la disponibilidad de al menos un nutriente y/o incrementar la energía metabólica disponible de un material para piensos, en el que dicha enzima lipolítica tiene una actividad de lipasa a un pH en el intervalo de alrededor de pH 1,5 a alrededor de pH 3,5.

- 20 Según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para elaborar un complemento para piensos que comprende al menos una enzima lipolítica y al menos una fitasa.

Según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona una comida para animales que comprende un material para piensos y el complemento para piensos o al menos una enzima lipolítica y al menos una fitasa según la presente descripción.

- 25 Según un aspecto adicional de la presente descripción, se proporciona un método para elaborar una comida para animales que comprende añadir a un material para piensos un complemento para piensos o al menos una enzima lipolítica y al menos una fitasa según la presente descripción.

- 30 Según un aspecto adicional de la presente descripción, se proporciona un método para incrementar la disponibilidad de al menos un nutriente dietético y/o incrementar la energía metabolizable aparente (AME) de un material para piensos, que comprende añadir al material para piensos un complemento para piensos que comprende una combinación de al menos una enzima lipolítica y al menos una fitasa o añadir al material para piensos al menos una enzima lipolítica y al menos una fitasa.

Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para incrementar la tasa de crecimiento de un animal que comprende alimentar al animal con una cantidad eficaz de una comida para animales según la presente invención.

- 35 Según un aspecto adicional de la presente descripción, se proporciona el uso de al menos una fitasa y al menos una lipasa en la fabricación de una comida para animales para incrementar la disponibilidad de al menos un nutriente y/o incrementar la energía metabólica disponible de un material para piensos.

- 40 Se entenderá que cualquiera de las características preferidas divulgadas en la presente memoria se considera igualmente aplicable a cualquiera de los aspectos descritos anteriormente a menos que se indique explícitamente otra cosa. También se considera que cualquier característica preferida se divulga en combinación con cualquier otra característica preferida divulgada en la presente memoria.

- 45 Para ser eficaz como un aditivo enzimático para un pienso, una fitasa tiene que combinar un número de propiedades diferentes. A fin de poder degradar el ácido fítico en el entorno ácido del estómago de un animal, tiene que ser activa a pH bajo, preferiblemente a lo largo de un amplio intervalo de valores de pH. Además, tiene que tener una alta actividad específica y preferiblemente alta termoestabilidad para permitir que la proteína soporte las altas temperaturas comúnmente usadas en la preparación de comidas para animales tales como nódulos de pienso.

- 50 También es importante que la enzima tenga amplia especificidad para el sustrato que permita que hidrolice no sólo fitato sino también productos intermedios de la degradación de fitato tales como pentafofosfatos, tetrafofosfatos y trifosfatos de inositol. Estudios sobre la degradación de fitato en cerdos muestran que estos oligofosfatos de inositol de otro modo permanecen mayoritariamente insolubles en el intestino delgado y grueso y así inaccesibles a fosfatasas alcalinas producidas por el animal y la microflora intestinal (Schlemmer U. et al. Arch. Anim. Nutr. 55, 255-280 (2001)). Se han identificado variaciones en los perfiles de especificidad para sustratos de diferentes enzimas. Por ejemplo, los fosfatos de inositol generados por la fitasa procedente de *B. subtilis* son esencialmente resistentes a la hidrólisis adicional por esta enzima [Kerovuo J. et al. Biochem J. 352, 623-628 (2.000)].

En realizaciones preferidas, la fitasa es preferiblemente la fitasa de *E. coli* comercializada bajo el nombre Phyzyme XP™ por Danisco A/S. Alternativamente, la fitasa puede ser fitasa de *Buttiauxella*, por ejemplo, las enzimas fitasa mostradas en los documentos WO 2006/043178, WO 2008/097619, WO 2008/092901 y PCT/US2009/41011.

En la realización más preferida, la fitasa comprende una fitasa de *E. coli* y/o una fitasa de *Buttiauxella*. Más preferiblemente, la fitasa comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en una cualquiera de SEQ ID N°: 1-6 o SEQ ID N°: 13; o un polipéptido que comprende una o varias adiciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con una cualquiera de SEQ ID N°: 1-6 o SEQ ID N°: 13; o un polipéptido que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad con una cualquiera de SEQ ID N°: 1-6 o SEQ ID N°: 13; o un polipéptido producido mediante la expresión de una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de SEQ ID N°: 11; o los nucleótidos 253 a 1.483 de SEQ ID N°: 14 o una secuencia que difiere de SEQ ID N°: 11 o los nucleótidos 253 a 1.483 de SEQ ID N°: 14 debido a la degeneración del código genético; o una secuencia que comprende una o varias adiciones, eliminaciones y/o sustituciones de nucleótidos en comparación con la secuencia de SEQ ID N°: 11; o los nucleótidos 253 a 1483 de SEQ ID N°: 14; o una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID N°: 11 o los nucleótidos 253 a 1.483 de SEQ ID N°: 14.

En una realización preferida, la fitasa tiene actividad de fitasa al menos a un pH en el intervalo de alrededor de pH 2,5 a alrededor de pH 5,5. Más preferiblemente, la fitasa tiene actividad de fitasa al menos a un pH en el intervalo de alrededor de pH 2,5 a alrededor de pH 3,5 y también en el intervalo de alrededor de pH 5 a alrededor de pH 5,5 cuando se mide mediante el ensayo de fitasa divulgado posteriormente en la sección de Materiales y métodos.

Preferiblemente, la fitasa tiene un nivel de actividad específico de al menos 100 FTU/mg de enzima. Más preferiblemente, al menos 200, 300, 400, 500, 700, 1.000 FTU/mg.

Se entenderá que según se usa en la presente memoria 1 FTU (unidad de fitasa, por sus siglas en inglés) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de ortofosfato inorgánico de un sustrato en un minuto bajo las condiciones de reacción definidas en la presente memoria en el ensayo de fitasa a pH 5,5 descrito en la sección de Materiales y métodos.

En realizaciones preferidas, la fitasa para el uso en la presente invención tiene un óptimo de pH en el intervalo de pH 2 a 5,5, preferiblemente 4,0-4,5, reteniendo al menos 50% de la actividad máxima a lo largo del intervalo de pH 2,0-5,5 y/o teniendo una actividad por encima de 300 FTU/mg.

Preferiblemente, la enzima lipolítica para el uso la presente descripción tiene una actividad de lipasa a un pH en el intervalo de alrededor de pH 1,5 a alrededor de pH 5,5 cuando se mide mediante el ensayo de lipasa descrito posteriormente en la sección de materiales y métodos. Más preferiblemente, la enzima lipolítica tiene actividad de lipasa a un pH en el intervalo de alrededor de pH 1,5 a alrededor de pH 3,5, o de alrededor de pH 2,0 a alrededor de pH 3,5.

Se entenderá que la enzima lipolítica para el uso en la presente invención puede ser cualquier enzima lipolítica adecuada que, usando el ensayo definido en la presente memoria, muestre actividad de enzima lipolítica. Preferiblemente, la enzima lipolítica tiene un nivel de actividad de al menos 100 LIPU/mg de enzima. Más preferiblemente, al menos 200, 300, 400, 500, 700, 1.000 LIPU/mg.

Según se usa en la presente memoria, 1 LIPU (unidad de lipasa, por sus siglas en inglés) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de H⁺ por minuto bajo las condiciones descritas en el ensayo de lipasa descrito posteriormente en la sección de Materiales y métodos en la presente memoria.

En una realización preferida, la enzima lipolítica para el uso en la presente invención se deriva del hongo filamentoso *Aspergillus tubingensis* según se describe en el documento WO 98/45453.

Preferiblemente, la enzima lipolítica comprende; un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID N°: 7 o 8; o un polipéptido que comprende una o varias adiciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID N°: 7 u 8; o un polipéptido que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad con la misma; o un polipéptido que se produce mediante la expresión de una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de SEQ ID N°: 9 o 10; o una secuencia que difiere de SEQ ID N°: 9 o 10 debido a la degeneración del código genético; o una secuencia que comprende una o varias adiciones, eliminaciones y/o sustituciones de nucleótidos en comparación con la secuencia de SEQ ID N°: 9 o 10 o una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID N°: 9 o 10.

Alternativamente, la lipasa se puede seleccionar del grupo que consiste en lipasa ácida de *Pseudomonas gessardii* (Ramani, K. et al, J Ind Microbiol Biotechnol (2010) 37:531-535), lipasa ácida de *Rhizopus arrhizus* (Kumar, KK. et al, Hindustan Antibiot Bull. Feb-Mayo 1993; 35(1-2):33-42) (SEQ ID N°: 32, 33), lipasa ácida de *Penicillium simplicissimum* (Gutarra M.L.E. et al, Bioresource Technology 100 (2009) 5249-5254), lipasa ácida de *Aspergillus niger* NCIM 1207 (Mhetras N.C. et al, Bioresource Technology 100 (2009) 1486-1490, Pel, H.J., et al, Nat. Biotechnol. 25 (2), 221-231 (2007)) (SEQ ID N°: 27), lipasas gástricas de mamífero de, por ejemplo, ser humano (SEQ ID N°: 17, 18), bóvido (SEQ ID N°: 19, 20), ratón (SEQ ID N°: 21, 22), rata (SEQ ID N°: 23, 24) y cánidos (SEQ

ID N°: 25, 26) (Chahinian, H. et al, Biochemistry 2006, 45, 993-1001), lipasa ácida de habas de ricino (Eastmond, P.J. The Journal of Biological Chemistry, 279 (2004); 45540-45545) (SEQ ID N°: 28, 29) y lipasa LIP2 de *Yarrowia lipolytica* (Aloulou, A. et al, Biochimica et Biophysica Acta 1771 (2007) 228-237) (SEQ ID N°: 30, 31).

5 Según se indica anteriormente, los inventores han descubierto que la mejora en el comportamiento del complemento para piensos de la presente invención se debe a la acción de la enzima lipolítica que libera ácidos grasos libres (FFA) en una fase más temprana en la digestión. Esto da como resultado la formación de jabones cálcicos y la reducción asociada en complejos de calcio-fitato.

10 En una realización preferida adicional, la enzima lipolítica para el uso en la presente invención se produce en una célula de *Trichoderma reesei*, por ejemplo mediante la expresión de un nucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 en una célula hospedadora de *T. reesei*.

En una realización preferida adicional, el complemento para piensos según la presente descripción comprende:

i) una enzima lipolítica que es una enzima lipolítica caracterizada por al menos una de las siguientes características:-

15 a) una enzima lipolítica que tiene actividad de lipasa a un pH en el intervalo de alrededor de pH 1,5 a alrededor de pH 3,5 cuando se mide mediante el ensayo de lipasa divulgado en la presente memoria;

15 b) una enzima lipolítica que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID N°: 7 u 8 o un polipéptido que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad con la misma;

20 c) una enzima lipolítica que se produce mediante la expresión de una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de SEQ ID N°: 9 o 10; o una secuencia que difiere de SEQ ID N°: 9 o 10 debido a la degeneración del código genético; o una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID N°: 9 o 10; y

ii) una fitasa que se caracteriza por al menos una de las siguientes características:-

d) una fitasa bacteriana;

25 e) una fitasa que tiene actividad de fitasa cuando se mide mediante el ensayo de fitasa descrito posteriormente en la presente a un pH en el intervalo de alrededor de pH 2,5 a alrededor de pH 3,5;

f) una fitasa que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en una cualquiera de SEQ ID N°: 1-6 o SEQ ID N°: 13 o un polipéptido que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad con la misma;

30 g) una fitasa que se produce mediante la expresión de una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de SEQ ID N°: 11 o los nucleótidos 253 a 1.483 de SEQ ID N°: 14; o una secuencia que difiere de SEQ ID N°: 11 o los nucleótidos 253 a 1.483 de SEQ ID N°: 14 debido a la degeneración del código genético; o una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID N°: 11 o los nucleótidos 253 a 1483 de SEQ ID N°: 14.

35 En una realización preferida adicional, el complemento para piensos comprende enzima lipolítica y fitasa que tienen una relación de actividad de lipasa (medida como unidades de lipasa (LIPU)) a actividad de fitasa (medida como unidades de fitasa (FTU)) en el intervalo de alrededor de 1:5 a alrededor de 12:1, preferiblemente, en una relación de alrededor de 1:3 a alrededor de 3:1 y más preferiblemente en una relación de alrededor de 1:1 a alrededor de 3:1 según se define por los ensayos de lipasa y fitasa a pH 5,5 según se describe posteriormente en la presente memoria.

40 Preferiblemente, el al menos un nutriente dietético cuya disponibilidad se incrementa se selecciona del grupo que comprende; fósforo; calcio; aminoácidos, grasa y/o almidón. Preferiblemente, la disponibilidad se mejora en el tracto gastrointestinal ileal y/o el total.

45 Se entenderá por el experto que la enzima lipolítica y la fitasa para el uso en la presente invención se pueden proporcionar independientemente bien como composiciones líquidas o bien como composiciones sólidas/granuladas.

Preferiblemente, cuando dicha enzima está en forma líquida, dicha enzima está en el medio en el que se ha secretado la enzima después del cultivo de una célula que comprende dicha enzima. Preferiblemente, dicho medio está libre de células (es decir la célula o las células se han separado del medio). Preferiblemente, dicho medio está concentrado. Se entenderá que el medio se puede granular para proporcionar una composición enzimática sólida.

50 Se entenderá además que el complemento para piensos o al menos una enzima lipolítica y al menos una fitasa según la presente descripción se pueden proporcionar en la forma de una solución o como un sólido - dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

En una realización, el complemento para piensos o al menos una enzima lipolítica y al menos una fitasa según la presente descripción está en una formulación líquida adecuada para el consumo, preferiblemente tal composición líquida contiene un tampón, sales, sorbitol y/o glicerol.

5 En una realización alternativa, el complemento para piensos o al menos una enzima lipolítica y al menos una fitasa según la presente descripción se pueden proporcionar como una o más células que comprenden dicha enzima lipolítica y/o fitasa.

En una realización, el complemento para piensos se granula o coganula con otras enzimas.

Preferiblemente, el complemento para piensos comprende además al menos un portador fisiológicamente aceptable.

10 El portador fisiológicamente aceptable se selecciona preferiblemente de al menos uno de maltodextrina, piedra caliza (carbonato cálcico), ciclodextrina, trigo o un componente del trigo, sacarosa, almidón, un antiespumante, Na₂SO₄, talco, PVA y mezclas de los mismos.

En una realización, la fitasa y/o la enzima lipolítica se seca sobre el portador fisiológicamente aceptable.

15 En realizaciones preferidas, el complemento para piensos puede comprender al menos una enzima adicional. En realizaciones preferidas, la al menos una enzima para piensos adicional se selecciona del grupo que consiste en las implicadas en el metabolismo del almidón, la degradación de fibras, el metabolismo de los lípidos, proteínas o enzimas implicadas en el metabolismo del glucógeno, acetilesterasas, aminopeptidasas, amilasas, arabinasas, arabinofuranosidasas, carboxipeptidasas, catalasas, celulasas, quitinasas, quimosina, cutinasa, desoxirribonucleasas, epimerasas, esterasas, -galactosidasas, -glucanasas, glucano lisasas, endoglucanasas, glucoamilasas, glucosa oxidasas, -glucosidasas, incluyendo β-glucosidasa, glucuronidasas, hemicelulasas, hexosa
20 oxidasas, hidrolasas, invertasas, isomerasas, lacasas, liasas, manosidasas, oxidasas, oxidorreductasas, pectato liasas, pectina acetilesterasas, pectina despolimerasas, pectina metilesterasas, enzimas pectinolíticas, peroxidasas, fenoloxidasas, poligalacturonasas, proteasas, ramnogalacturonasas, ribonucleasas, taumatina, transferasas, proteínas de transporte, transglutaminasas, xilanasas, hexosa oxidasa (D-hexosa: O₂-oxidorreductasa, EC 1.1.3.5), β-glucanasa, α-amilasa, pectinasa, celobiohidrolasa, fosfatasas ácidas y/u otras o combinaciones de las mismas.
25 Estas incluyen enzimas que, por ejemplo, modulan la viscosidad del pienso.

En una realización más preferida, el complemento para piensos comprende una fitasa, una enzima lipolítica, una xilanasa y/o una amilasa. En la realización más preferida, el complemento para piensos comprende fitasa, una enzima lipolítica, una xilanasa y una amilasa.

30 Preferiblemente, la amilasa está presente en el intervalo de 10 U/kg a 10.000 U/kg de pienso, más preferiblemente, de 100 U/kg a 7.500 U/kg, y aún más preferiblemente, 500 U/kg a 5.000 U/kg. Se entenderá que una U de amilasa es la cantidad de enzima que libera 1 mmol de enlaces glucosídicos de un sustrato de polímero de almidón reticulado insoluble en agua por min. a pH 6,5 y 37°C.

35 Preferiblemente, la xilanasa está presente en el intervalo de 100 U/kg a 10.000 U/kg de pienso, más preferiblemente, de 250 U/kg a 7.500 U/kg, y aún más preferiblemente, de 500 U/kg a 5.000 U/kg. Se entenderá que una U de xilanasa es la cantidad de enzima que libera 0,5 μmol de equivalentes de azúcar reductor (como xilosa por el método del azúcar reductor DNS [4]) de un sustrato de avena-escanda-xilano por min. a pH 5,3 y 50°C. (Bailey, M.J. Biely, P. y Poutanen, K., Journal of Biotechnology, Volumen 23, (3), mayo de 1992, 257-270).

Se entenderá que el complemento para piensos puede ser para cualquier animal adecuado. Preferiblemente, el animal es un animal monogástrico, por ejemplo aves de corral o cerdos.

40 Será evidente que el complemento para piensos puede contener la al menos una fitasa y la al menos una enzima lipolítica en cualquier cantidad adecuada. Preferiblemente, el complemento para piensos comprende al menos 0,1% en peso de enzima lipolítica y fitasa bien individualmente o bien como un porcentaje combinado. Más preferiblemente, el complemento para piensos puede comprender al menos 0,5%; al menos 1%; al menos 2%; al menos 3%; o al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10% en peso de enzima lipolítica y fitasa bien individualmente o bien como
45 un porcentaje combinado.

Será obvio para el experto que el complemento para piensos o al menos una enzima lipolítica y al menos una fitasa según la presente descripción también pueden comprender otros componentes tales como agentes estabilizadores y/o agentes de aumento de volumen y/u otras enzimas.

50 Preferiblemente, el complemento para piensos o al menos una enzima lipolítica y al menos una fitasa según la presente descripción serán térmicamente estables al tratamiento térmico hasta alrededor de 70°C; hasta alrededor de 85°C; o hasta alrededor de 95°C. El tratamiento térmico se puede realizar durante hasta alrededor de 1 minuto; hasta alrededor de 5 minutos; hasta alrededor de 10 minutos; hasta alrededor de 30 minutos; hasta alrededor de 60 minutos. El término térmicamente estable significa que al menos alrededor de 75% de los componentes enzimáticos que estaban presentes/eran activos en el aditivo antes de calentar hasta la temperatura especificada todavía están
55 presentes/son activos después de que se enfríe hasta temperatura ambiente. Preferiblemente, al menos alrededor

de 80% de los componentes enzimáticos que estaban presentes y eran activos en el aditivo antes de calentar hasta la temperatura especificada todavía están presentes y son activos después de que se enfríe hasta temperatura ambiente.

5 El complemento para piensos o al menos una enzima lipolítica y al menos una fitasa según la presente descripción pueden tener una vida útil de más de alrededor de 30 semanas; más de alrededor de 40 semanas; más de alrededor de 50 semanas; más de alrededor de 1 año; más de alrededor de 1,5 años. La vida útil significa que al menos alrededor de 80% de los componentes enzimáticos que estaban presentes y eran activos en el aditivo cuando se preparaba todavía están presentes y son activos.

10 Preferiblemente, el método para preparar un complemento para piensos según la presente descripción comprende una etapa de mezcla que comprende mezclar la al menos una fitasa y al menos una enzima lipolítica opcionalmente con al menos un portador fisiológicamente aceptable.

En una realización particularmente preferida, el complemento para piensos se homogeneiza para producir un polvo.

En una realización preferida alternativa, el complemento para piensos se formula en gránulos según se describe en el documento WO2007/044968 (denominados gránulos de TPT).

15 En otras realizaciones preferidas, cuando el complemento para piensos se formula en gránulos, los gránulos comprenden una sal de barrera hidratada revestida sobre el núcleo proteínico. La ventaja de tal revestimiento salino es una termotolerancia mejorada, una estabilidad al almacenamiento mejorada y una protección contra otros aditivos del pienso que tienen un efecto adverso sobre la enzima.

20 Preferiblemente, la sal usada para el revestimiento salino tiene una actividad en agua mayor de 0,25 o una humedad constante mayor de 60% a 20°C.

Preferiblemente, el revestimiento salino comprende un Na_2SO_4 .

25 El método para preparar un complemento para piensos también puede comprender la etapa adicional de nodulizar el polvo. El polvo se puede mezclar con otros componentes conocidos en la técnica. El polvo, o la mezcla que comprende el polvo, se puede forzar a través de una boquilla y las hebras resultantes se cortan en nódulos adecuados de longitud variable.

30 Opcionalmente, la etapa de nodulización puede incluir un tratamiento con vapor de agua, o fase de acondicionamiento, antes de la formación de los nódulos. La mezcla que comprende el polvo se puede colocar en un acondicionador, p. ej. un mezclador con inyección de vapor de agua. La mezcla se calienta en el acondicionador hasta una temperatura especificada, tal como de 60-100°C, temperaturas típicas serían 70°C, 85°C, 90°C o 95°C. El tiempo de permanencia puede ser variable de segundos a minutos e incluso horas. Tal como 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 30 segundos, 1 minutos 2 minutos., 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos y 1 hora.

Se entenderá que el complemento para piensos de la presente invención es adecuado para la adición de cualquier material para piensos apropiado.

35 Según se usa en la presente memoria, el término material para piensos se refiere al material para piensos básico que va a ser consumido por un animal. Se entenderá además que este puede comprender, por ejemplo, al menos uno o más granos no procesados y/o material vegetal y/o animal procesado tal como harina de soja o harina de huesos.

40 En algunas realizaciones, el material para piensos comprenderá uno o más de los siguientes componentes: a) cereales, tales como granos pequeños (p. ej., trigo, cebada, centeno, avena y combinaciones de los mismos) y/o granos grandes tales como maíz o sorgo; b) subproductos procedentes de cereales, tales como harina de gluten de maíz, granos secos de destilería con solubles (DDGS, por sus siglas en inglés), salvado de trigo, moyuelo de trigo, granza de trigo, salvado de arroz, cáscaras de arroz, cáscaras de avena, almendra de palma y pulpa de cítricos; c) proteína obtenida de fuentes tales como soja, girasol, cacahuete, altramuza, guisantes, habas, algodón, colza, harina de pescado, proteína plasmática secada, harina de carne y huesos, proteína de patata, trigo, copra, sésamo; d) aceites y grasas obtenidos de fuentes vegetales y animales; e) minerales y vitaminas.

Será además evidente que el complemento para piensos de la presente invención es particularmente ventajoso cuando se añade a un material para piensos con alto contenido de fitato.

50 Según se usa en la presente memoria, el término comida para animales se refiere a un material para piensos al que se han añadido uno o más complementos para piensos.

Se entenderá por el experto que diferentes animales requieren diferentes comidas para animales, e incluso el mismo animal puede requerir diferentes comidas para animales, dependiendo del propósito para el que se cría el animal. Se entenderá además que dependiendo de la materia prima para piensos, la comida para animales puede ser una comida para animales alta en fibra o una comida para animales baja en fibra.

- Preferiblemente, la comida para animales puede comprender materiales para piensos que comprenden maíz, trigo, cebada, triticale, centeno, arroz, tapioca, sorgo y/o cualquiera de los subproductos, así como componentes ricos en proteína como harina de soja, harina de semillas de colza, harina de Canola, harina de semillas de algodón, harina de semillas de girasol, harinas de subproductos animales y mezclas de las mismas. Más preferiblemente, la comida para animales puede comprender grasas animales y/o aceites vegetales.
- Opcionalmente, la comida para animales también puede contener minerales adicionales tales como, por ejemplo, calcio, y/o vitaminas adicionales.
- Será evidente para el experto que el complemento para piensos de la presente invención será particularmente beneficioso cuando se usa en una comida para animales que comprende alto contenido de calcio. Más particularmente, una comida para animales que comprende alto contenido de calcio y alto contenido de fitato.
- Será evidente para un experto que el nivel de calcio que representa una dieta alta en calcio puede variar dependiendo del tipo de animal e incluso del uso para el que se cría el animal. Por ejemplo, para gallinas ponedoras, una dieta con >3% sería una dieta alta en Ca. Para pollos de engorde y todos los pavos, una dieta con >1% de Ca sería una dieta alta en Ca. Para los propósitos de la presente invención, se considera que una dieta alta en calcio es una dieta que comprende al menos 1-2% de calcio.
- Será además evidente para un experto que una dieta alta en fitato es una que comprende >0,90% en peso de ácido fítico.
- Según se define en la presente memoria, comida para animales baja en fibra es una comida para animales que comprende uno o más materiales para piensos, que contiene un contenido máximo de paredes celulares insolubles en agua de alrededor de 25%, y/o un contenido máximo de polisacáridos que no son de almidón solubles de alrededor de 4%. Más preferiblemente, un contenido máximo de paredes celulares insolubles en agua de alrededor de 22,5%, alrededor de 20%, alrededor de 17,5%, alrededor de 15%, alrededor de 12,5%; y/o un contenido máximo de polisacáridos que no son de almidón solubles de alrededor de 3%, alrededor de 2,5%, alrededor de 2%, alrededor de 1,75%, alrededor de 1,5%, alrededor de 1,25%.
- En realizaciones preferidas, el complemento para piensos o al menos una enzima lipolítica y al menos una fitasa según la presente descripción se mezcla con al menos un material para piensos bajo en fibra, por ejemplo, maíz, trigo, una harina de subproductos animales o soja y/o cualquiera de los subproductos para proporcionar una comida para animales baja en fibra.
- Preferiblemente, la comida para animales es una mezcla de harina de maíz y soja.
- Preferiblemente, el material para piensos es salvado de arroz no desgrasado.
- En realizaciones preferidas, la comida para animales comprende fitasa en un nivel de alrededor de 250 FT U/kg a alrededor de 15.000 FT U/kg de comida para animales (p. ej. de 250 a 10.000 FT U/kg, 400-7.500 FT U/kg y también 500-5.000 FT U/kg).
- En realizaciones preferidas adicionales, la comida para animales comprende enzima lipolítica en un nivel de alrededor de 125 LIP U/kg a alrededor de 45.000 LIP U/kg de comida para animales (p. ej. de 500 a 30.000 LIP U/kg, 1.000-20.000 LIP U/kg y también 3.000-10.000 LIP U/kg).
- Será claramente evidente para el experto que a fin de que el complemento para piensos de la presente invención proporcione las ventajas reivindicadas, debe estar presente fitato en el material para piensos o la comida para animales. También será claramente evidente que este fitato debe estar presente de forma natural como un constituyente del material para piensos, o se puede añadir como un complemento adicional en un nivel deseado.
- En otro aspecto, se proporciona un método para producir una comida para animales. La comida para animales se produce típicamente en fábricas de piensos en las que las materias primas se trituran en primer lugar hasta un tamaño de partícula adecuado y a continuación se mezclan con aditivos apropiados. La comida para animales se puede producir a continuación como una pasta o nódulos; lo último implica típicamente un método mediante el cual la temperatura se eleva hasta un nivel buscado y a continuación el pienso se hace pasar a través de una boquilla para producir nódulos de un tamaño particular. Los nódulos se dejan enfriar. Posteriormente, se pueden añadir aditivos líquidos tales como grasa y enzima. La producción de comida para animales también puede implicar una etapa adicional que incluye extrusión o expansión antes de la nodulización - en particular mediante técnicas adecuadas que pueden incluir al menos el uso de vapor de agua.
- La comida para animales puede ser una comida para animales para un animal monogástrico, tal como aves de corral (por ejemplo, pollos de engorde, gallinas ponedoras, variedades de engorde, pavos, patos, gansos, aves acuáticas), cerdos (todas las categorías de edad), mascotas (por ejemplo perros, gatos) o peces.
- Opcionalmente, la comida para animales puede comprender aditivos adicionales. Por ejemplo, se puede añadir calcio a la comida para animales en cualquier cantidad para complementar la dieta del animal y/o como un agente

de aumento de volumen. El calcio puede estar en la forma de calcio orgánico (p. ej. hortalizas de hoja verde) o inorgánico (p. ej. piedra caliza/carbonato cálcico). Preferiblemente, después de la adición del complemento de calcio, la comida para animales comprenderá al menos alrededor de 0,5% de calcio. Más preferiblemente, al menos alrededor de 0,8%, al menos alrededor de 1,0%, al menos alrededor de 2,0%, al menos alrededor de 3% de calcio.

- 5 La comida para animales puede comprender al menos 0,0001% en peso del complemento para piensos. Adecuadamente, la comida para animales puede comprender al menos 0,0005%; al menos 0,0010%; al menos 0,0020%; al menos 0,0025%; al menos 0,0050%; al menos 0,0100%; al menos 0,020%; al menos 0,100% al menos 0,200%; al menos 0,250%; al menos 0,500% en peso del complemento para piensos.

- 10 En un aspecto adicional, se proporciona el uso de al menos una fitasa y al menos una enzima lipolítica en la fabricación de una comida para animales para incrementar la disponibilidad de al menos un nutriente y/o incrementar la energía metabólica disponible de un material para piensos.

Preferiblemente, la al menos una fitasa y al menos una enzima lipolítica se formulan como un complemento para piensos. Más preferiblemente, el complemento para piensos es el complemento para piensos según la presente invención.

- 15 En realizaciones preferidas, el al menos un nutriente se selecciona de fósforo; calcio; grasa total y/o aminoácidos.

- Según se usa en la presente memoria, el término "incrementar la disponibilidad de al menos un nutriente y/o incrementar la energía metabólica disponible" significa un incremento en la cantidad del nutriente o la energía disponible para el uso por el animal que consume una unidad de peso de la comida para animales en comparación con la disponibilidad del nutriente o la energía disponible a partir de una unidad de peso del material para piensos al que no se ha añadido fitasa ni enzima lipolítica o complemento para piensos.

- 20 En una realización preferida adicional, el material para piensos es un material para piensos que comprende altos niveles de fitato y/o calcio.

La invención se describirá ahora con referencia a las siguientes figuras, en las que:-

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID N° 1) de fitasa de *Buttiauxella* silvestre.

- 25 La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID N° 2) de una fitasa de *Buttiauxella* variante denominada BP-112.

La Figura 3 muestra un alineamiento de aminoácidos de fitasa de *Buttiauxella* silvestre y 4 fitasas de *Buttiauxella* variantes (SEQ ID N° 1-5).

- 30 La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID N° 6) de una fitasa de *Buttiauxella* variante adicional denominada BP-11.

La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID N° 7) de una enzima lipolítica procedente de *Aspergillus tubingensis* en la que el péptido de señal endógeno se muestra en negrita.

La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID N° 8) de una enzima lipolítica procedente de *Aspergillus tubingensis* que es la misma que SEQ ID N° 7 excepto que se ha retirado el péptido de señal endógeno.

- 35 La Figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos que codifica una enzima lipolítica de *Aspergillus tubingensis* (como se muestra en SEQ ID N° 7) que incluye la secuencia de señal - la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN genómico (y se ha denominado SEQ ID N° 9). La secuencia de señal se muestra en negrita y los intrones se muestran en minúsculas.

- 40 La Figura 8 muestra la secuencia de nucleótidos que codifica una enzima lipolítica de *Aspergillus tubingensis* (como se muestra en SEQ ID N° 8) que no incluye la secuencia de señal - la secuencia de nucleótidos es un ADN genómico (y se ha denominado SEQ ID N° 10). Los intrones se muestran en minúsculas.

La Figura 9 muestra la resistencia de las fitasas que se originan a partir de *Buttiauxella*, variantes BP-17, BP-110, BP-111, y BP-112 y de Phyzyme XP, Natuphos y Ronozyme P frente a concentraciones crecientes de pepsina.

- 45 La Figura 10 muestra una representación esquemática de la unidad de nodulización en the Technological Institute de Kolding.

La Figura 11 muestra la actividad residual relativa de pruebas de nodulización de tres variantes de Fitasa B para el uso en la presente invención.

La Figura 12 muestra la actividad residual relativa cuando Phyzyme XP, una fitasa de *E coli*, se formula en trigo integral triturado.

La Figura 13 muestra los resultados de una prueba en la que la fitasa se extraía del producto Ronozyme revestido y se formulaba en trigo integral triturado para estudiar la termoestabilidad de la molécula de fitasa sin protección.

Las Figuras 14-17 muestran la actividad de las fitasas para el uso en la presente invención y controles contra fitato a diversos pH.

- 5 Las Figuras 18 y 19 son cromatogramas de HPLC que muestran claramente que la fitasa procedente de variantes de *Buttiauxella* catalizaba la hidrólisis de ácido fítico a una temperatura mayor de 85°C.

La Figura 20 muestra el pDONR221::lip 3 que contiene el ADN genómico de lipasa 3 de *Aspergillus tubingensis*.

La Figura 21 muestra la construcción de expresión de lipasa final ATlipasa3Trex.

La Figura 22 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°: 11) que codifica fitasa de *Buttiauxella* silvestre.

- 10 La Figura 23A muestra coeficientes de digestibilidad ileal de energía de cerdos canulados (EEM=0,0009). Las barras con diferentes letras difieren en un nivel de $P<0,05$.

La Figura 23B muestra coeficientes de digestibilidad ileal de proteína bruta de cerdos canulados (EEM=0,0009). Las barras con diferentes letras difieren en un nivel de $P<0,05$.

- 15 La Figura 24 muestra coeficientes de energía digerible en el tracto total de cerdos (EEM=0,009). Las barras con diferentes letras difieren en un nivel de $P<0,05$.

La Figura 25A muestra la retención de calcio en el tracto total de cerdos (EEM=0,027). Las barras con diferentes letras difieren en un nivel de $P<0,05$.

La Figura 25B muestra la retención de fósforo en el tracto total de cerdos (EEM=0,030). Las barras con diferentes letras difieren en un nivel de $P<0,05$.

- 20 La Figura 26 muestra la secuencia de aminoácidos de fitasa de *E. coli* silvestre que incluye la secuencia de señal (SEQ ID N°: 12).

La Figura 27 muestra la secuencia de aminoácidos de fitasa de *E. coli* silvestre madura (SEQ ID N°: 13).

La Figura 28 muestra la secuencia de nucleótidos que codifica la fitasa de *E. coli* silvestre (SEQ ID N°: 14).

- 25 La Figura 29 muestra la producción de ácido graso libre a partir de un pienso de maíz-soja cuando se incubaba con diversas combinaciones de enzima lipolítica/fitasa.

La Figura 30 muestra la producción de un complejo resistente a fitasa de ácido fítico y calcio y la inversión al añadir ácidos grasos libres. La Figura 30A muestra el efecto sobre la actividad de fitasa de incrementar la concentración de CaCl_2 . La Figura 30B muestra el efecto sobre la actividad de fitasa de añadir ácidos grasos libres a la mezcla de reacción que contiene 15 mM.

- 30 La Figura 31 muestra la producción de un complejo resistente a fitasa de ácido fítico y calcio y la inversión al añadir una mezcla de reacción de lipasa que incluye lipasa. La Figura 31A muestra el efecto sobre la actividad de fitasa de incrementar la concentración de CaCl_2 y la Figura 31B muestra el efecto sobre la actividad de fitasa de añadir una mezcla de reacción de lipasa a la mezcla de reacción de fitasa que contiene CaCl_2 30 mM.

La Figura 32 muestra el perfil de pH de lipasa 3 y lipasa pancreática en una dieta de maíz-soja.

- 35 La Figura 33 muestra el coeficiente de digestibilidad ileal de fósforo en pollos de engorde. Las barras con diferentes letras difieren en un nivel de $P<0,05$.

La Figura 34 muestra el coeficiente de digestibilidad ileal de calcio en pollos de engorde. Las barras con diferentes letras difieren en un nivel de $P<0,05$.

- 40 La Figura 35 muestra el coeficiente de retención en el tracto total de fósforo en pollos de engorde. Las barras con diferentes letras difieren en un nivel de $P<0,05$.

Figura 36. Coeficiente de retención en el tracto total de calcio en dos experimentos con pollos de engorde. Las barras con diferentes letras difieren en un nivel de $P<0,05$.

- 45 La Figura 37 muestra la hipótesis de los inventores del mecanismo implicado en la interacción de lipasa y fitasa en el tracto digestivo de aves de corral. La figura muestra una representación esquemática del posible mecanismo detrás del efecto sinérgico observado entre lipasa y fitasa. Debido a la acción de la lipasa 3 bajo condiciones ácidas, los ácidos grasos libres (FFA) se liberan en una fase más temprana en la digestión en comparación con la situación sin lipasa 3. Estos FFA se pueden unir con calcio (Ca) en exceso para formar jabones en el intestino. Entonces, hay menos Ca libre disponible para unirse a ácido fítico (IP6) y formar el complejo resistente a fitasa. Finalmente, más

IP6 es degradado por la fitasa en comparación con la situación sin lipasa 3 añadida. Esto conduce a un incremento de la liberación de fosfato (P) y posteriormente absorción por el animal. Los complejos de FFA-Ca se pueden disolver más tarde en el tracto digestivo dando como resultado un incremento de la absorción de grasa y Ca. Si no está presente fitasa para hidrolizar el IP6, este se puede complejar con el jabón de FFA-Ca para formar un jabón de IP6-Ca-FFA no degradable insoluble, dando como resultado una disminución de la absorción de grasa, Ca y P.

Divulgación detallada de la invención

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan al experto un diccionario general de muchos de los términos usados en esta divulgación.

Esta divulgación no se limita a los métodos y materiales ejemplares divulgados en la presente memoria, y se pueden usar cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o la prueba de realizaciones de esta divulgación. Los intervalos numéricos son inclusivos de los números que definen el intervalo. A menos que se indique otra cosa, las secuencias de ácido nucleico se escriben de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación amino a carboxi, respectivamente.

Los encabezamientos proporcionados en la presente memoria no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de esta divulgación que se pueden tener mediante referencia a la memoria descriptiva como un todo. Según esto, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más a fondo mediante referencia a la memoria descriptiva como un todo.

Los aminoácidos se mencionan en la presente memoria usando el nombre del aminoácido, la abreviatura de tres letras o la abreviatura de una sola letra.

Según se usa en la presente memoria, el término "homólogo" significa una entidad que tiene una cierta homología con las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos. Aquí, el término "homología" se puede equiparar a "identidad". Adecuadamente, "homólogo" en este contexto se refiere al porcentaje de identidad de secuencia entre dos enzimas después de alinear sus secuencias usando algoritmos de alineamiento como los descritos con más detalle posteriormente.

En el presente contexto, se considera que una secuencia de aminoácidos homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos 75, 80, 81, 85 o 90% idéntica, preferiblemente al menos 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos, etc. - p. ej. que la secuencia de aminoácidos en cuestión. Aunque la homología también se puede considerar en cuanto a la similitud (es decir residuos de aminoácido que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en cuanto a la identidad de secuencia.

Por "fragmento funcional" se entiende un fragmento del polipéptido que retiene las propiedades características de ese polipéptido. En el contexto de la presente invención, un fragmento funcional de una enzima fitasa es un fragmento que retiene la capacidad de liberación de fosfato desde el ácido fítico de toda la proteína

Para secuencias de aminoácidos y secuencias de nucleótidos, las comparaciones de homología se pueden efectuar a simple vista o, más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles comercialmente pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología se puede calcular sobre secuencias contiguas, es decir una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido de una secuencia de compara directamente con el aminoácido correspondiente de la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se denomina alineamiento "sin huecos". Típicamente, tales alineamientos sin huecos se realizan a lo largo de un número de residuos relativamente corto.

Aunque este es un método muy simple y coherente, no puede tener en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o eliminación hará que las siguientes secuencias de aminoácidos se salgan del alineamiento, dando así potencialmente como resultado una gran reducción en el % de homología cuando se realiza un alineamiento global. Por consiguiente, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias se diseñan para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta posibles inserciones y eliminaciones sin penalizar excesivamente la puntuación de homología general. Esto se consigue al insertar "huecos" en el alineamiento de secuencias para tratar de maximizar la homología local.

Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones por huecos" a cada hueco que se produce en el alineamiento de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencias con tan pocos huecos como sea posible - que refleja una relación superior entre las dos secuencias comparadas - alcanzará una puntuación superior que uno con muchos huecos. Se usan típicamente "costes de huecos de afino"

que cargan un coste relativamente alto por la existencia de un hueco y una penalización menor por cada residuo posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más comúnmente usado. Por supuesto, las altas penalizaciones de huecos producirán alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de los programas de alineamiento permiten que se modifiquen las penalizaciones por huecos. Sin embargo, se prefiere usar los valores por defecto cuando se usa tal software para las comparaciones de secuencias. Por ejemplo, cuando se usa el paquete de programas GCG Wisconsin Bestfit, la penalización por huecos por defecto para secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

Por lo tanto, el % de homología máximo requiere en primer lugar la producción de un alineamiento óptimo, teniendo en cuenta las penalizaciones por huecos. Un programa informático adecuado para llevar a cabo tal alineamiento es el paquete de programas GCG Wisconsin Bestfit (Devereux et al 1984 Nuc. Acids Research 12 p387). Ejemplos de otro software que puede realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas BLAST (véase Ausubel et al., 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4ª Ed - Capítulo 18), FASTA (Altschul et al., 1990 J. Mol. Biol. 403-410) y el conjunto de herramientas de comparación GENEWORKS. Tanto BLAST como FASTA están disponible para la búsqueda sin conexión y con conexión a la red (véase Ausubel et al., 1999, Short Protocols in Molecular Biology, páginas 7-58 a 7-60).

Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere usar el programa GCG Bestfit. También está disponible una nueva herramienta, llamada BLAST 2 Sequences, para comparar secuencias de proteínas y nucleótidos (véanse FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

Aunque el % de homología final se puede medir en cuanto a la identidad, el propio procedimiento de alineamiento no se basa típicamente en la comparación de pares por todo o nada. En cambio, se usa generalmente una matriz de puntuación de similitud a escala que asigna puntuaciones a cada comparación por pares basada en la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de tal matriz comúnmente usado es la matriz BLOSUM62 - la matriz por defecto para el conjunto de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin usan generalmente bien los valores por defecto públicos o bien una tabla de comparación de símbolos personalizada si se suministra (véase el manual del usuario para detalles adicionales). Para algunas aplicaciones, se prefiere usar los valores por defecto públicos para el paquete de programas GCG o, en el caso de otro software, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

Alternativamente, el porcentaje de homologías se puede calcular usando la característica de alineamiento múltiple en DNASIS™ (Hitachi Software), basada en un algoritmo, análoga a CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244).

Una vez que el software ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, preferiblemente el % de identidad de secuencia. Típicamente, el software hace esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

En un aspecto preferible de la presente invención, se usan el software y los ajustes siguientes para calcular el porcentaje de homología/identidad de secuencia. Para secuencias de aminoácidos, el porcentaje de identidades (homología) o "positivos" se calcula mediante el AlignX VectorNTI (Vector NTI Advance 9.1 de Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, EE.UU. de A.) para cada posible par de secuencias de aminoácidos. Los ajustes son parámetros por defecto (penalización por apertura de hueco - 10, penalización por extensión de hueco 0,1).

Para secuencias de ácido nucleico, el porcentaje de identidades (homología) o "positivos" se calcula mediante el programa AlignX VectorNTI de Informax Inc. (EE.UU. de A.) para cada posible par de secuencias de ácido nucleico. Los ajustes son ajustes por defecto para ADN y son: Penalización por apertura de hueco: 15 y Penalización por extensión de hueco: 6,66. (los mismos ajustes para alineamientos múltiples).

Preferiblemente, la identidad de los aminoácidos (homología) se calcula a lo largo de toda la secuencia de aminoácidos o para un ácido nucleico para un polinucleótido correspondiente que codifica la secuencia de aminoácidos de longitud completa respectiva.

Las secuencias también pueden tener eliminaciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácido que producen un cambio sinónimo y dan como resultado una sustancia funcionalmente equivalente. Se pueden hacer sustituciones de aminoácidos deliberadas basándose en las propiedades de los aminoácidos (tales como polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los residuos) y por lo tanto es útil agrupar entre sí los aminoácidos en grupos funcionales. Los aminoácidos se pueden agrupar entre sí basándose en las propiedades de su cadena lateral sola. Sin embargo, es más útil incluir además datos de mutaciones. Es probable que los conjuntos de aminoácidos así derivados se conserven por razones estructurales. Estos conjuntos se pueden describir en la forma de un diagrama de Venn (Livingstone C.D. y Barton G.J. (1993) "Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation" Comput. Appl Biosci. 9: 745-756)(Taylor W.R. (1986) "The classification of amino acid conservation" J.Theor.Biol. 119; 205-218). Las sustituciones conservativas se pueden hacer, por ejemplo, según la tabla posterior que describe un agrupamiento de aminoácidos en un diagrama de Venn generalmente aceptado.

CONJUNTO		SUBCONJUNTO	
Hidrófobo	FWYHKMILVAGC	Aromático	FWYH
		Alifático	ILV
Polar	WYHKREDCSTNQ	Cargado	HKRED
		Cargado positivamente	HKR
		Cargado negativamente	ED
Pequeño	VCAGSPTND	Minúsculo	AGS

La presente descripción también abarca la sustitución homóloga (sustitución y reemplazo se usan ambos en la presente memoria para indicar el intercambio de un residuo de aminoácido existente por un residuo alternativo) que se puede producir, es decir la sustitución de similar por similar tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También se puede producir una sustitución no homóloga, es decir de una clase de residuo por otra o

5 alternativamente que implica la inclusión de aminoácidos no naturales tales como ornitina (mencionada posteriormente en la presente memoria como Z), ácido diaminobutírico-ornitina (mencionados en la presente memoria posteriormente como B), norleucina-ornitina (mencionadas en la presente memoria posteriormente como O), piridilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Los reemplazos también se pueden hacer por aminoácidos no naturales.

- 10 El término "proteína", según se usa en la presente memoria, incluye proteínas, polipéptidos y péptidos.

Los términos "residuo de aminoácido equivalente a", "aminoácido correspondiente a" y equivalentes gramaticales de los mismos se usan en la presente memoria para referirse a un residuo de aminoácido de una proteína que tiene la posición y el efecto similares a los indicados en una secuencia de aminoácidos particular de una proteína particular. El experto en la técnica conocerá la equivalencia de residuos especificados en proteínas comparables.

- 15 El término "propiedad" o equivalentes gramaticales del mismo en el contexto de un polipéptido, según se usa en la presente memoria, se refieren a cualquier característica o atributo de un polipéptido que se pueda seleccionar o detectar. Estas propiedades incluyen, pero no se limitan a, estabilidad oxidativa, especificidad para el sustrato, actividad catalítica, estabilidad térmica, perfil de actividad de temperatura y/o pH, estabilidad de procesamiento del pienso y capacidad para ser secretado.

- 20 Según se usa en la presente memoria, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo con el término "polipéptido" y/o el término "proteína". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo con el término "péptido". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo con el término "enzima".

La secuencia de aminoácidos se puede preparar/aislar de una fuente adecuada, o se puede elaborar sintéticamente o se puede preparar mediante el uso de técnicas de ADN recombinante.

- 25 Los términos "proteína" y "polipéptido" se usan intercambiabilmente en la presente memoria. En la divulgación y las reivindicaciones presentes, se usan los códigos convencionales de una letra y tres letras para los residuos de aminoácido. El código de 3 letras para los aminoácidos se define de acuerdo con the IUPACIUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). También se entiende que un polipéptido puede ser codificado por más de una secuencia de nucleótidos debido a la degeneración del código genético.

- 30 El término "secuencia de señal" o "péptido de señal" se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos que pueda participar en la secreción de las formas madura o precursora de la proteína. Esta definición de secuencia de señal es una funcional, destinada a incluir todas las secuencias de aminoácidos codificadas por la porción N-terminal del gen proteínico, que participa en la consecución de la secreción de proteína. A menudo, pero no universalmente, se unen a la porción N-terminal de una proteína o a la porción N-terminal de una proteína precursora.
- 35

Por "fragmento funcional" se entiende un fragmento del polipéptido que retiene esas propiedades características de ese polipéptido. En el contexto de la presente invención, un fragmento funcional de una fitasa o enzima lipolítica es un fragmento que retiene la capacidad de escisión de toda la proteína de la fitasa o la enzima lipolítica.

- 40 El término "aislado", "recuperado" o "purificado" se refiere a un material que se retira de su ambiente original. El término "sustancialmente purificado" significa que el material se ha purificado hasta al menos un grado sustancial.

En un aspecto, preferiblemente, el nucleótido o la secuencia de aminoácidos está en una forma aislada. El término "aislado" significa que la secuencia está al menos sustancialmente libre de al menos otro componente con el que la secuencia está naturalmente asociada en la naturaleza y según se encuentra en la naturaleza.

Otras definiciones de términos pueden aparecer a lo largo de la memoria descriptiva. Antes de que se describan con más detalle las realizaciones ejemplares, se debe entender que esta divulgación no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que estas, por supuesto, pueden variar. También se ha de entender que la terminología usada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente divulgación se limitará solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporcione un intervalo de valores, se entiende que también se divulga específicamente cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente otra cosa, entre los límites superior e inferior de ese intervalo. Cada intervalo menor entre cualquier valor indicado o valor intermedio en un intervalo indicado y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado está abarcado dentro de esta divulgación. Los límites superior e inferior de estos intervalos menores se pueden incluir o excluir independientemente en el intervalo, y cada intervalo en el que estén incluidos cualquiera, ninguno o ambos límites en los intervalos menores también está abarcado dentro de esta divulgación, sujeto a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluya uno o ambos límites, los intervalos que excluyan cualquiera o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en esta divulgación.

Se debe apuntar que según se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno(a)" y "el(la)" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "un gen" incluye una pluralidad de tales posibles agentes y la referencia a "la célula" incluye la referencia a una o más células y equivalentes de las mismas conocidos por los expertos en la técnica, etc.

Las publicaciones analizadas en la presente memoria se proporcionan solamente para su divulgación antes de la fecha de publicación de la presente solicitud. Nada en la presente memoria se ha de considerar como una admisión de que tales publicaciones constituyan técnica anterior a las reivindicaciones adjuntas a la presente memoria.

Las enzimas para el uso en la presente invención se pueden producir mediante cultivo bien sólido o bien sumergido, incluyendo procedimientos discontinuos, de alimentación por lotes o de flujo continuo. El cultivo se efectúa en un medio de crecimiento que comprende un medio acuoso de sales minerales, factores de crecimiento orgánicos, el material de fuente de carbono y energía, oxígeno molecular y, por supuesto, un inóculo de partida de una o más especies de microorganismo particulares que se van a emplear.

Además de la fuente de carbono y energía, el oxígeno, el nitrógeno asimilable y un inóculo del microorganismo, es necesario suministrar cantidades adecuadas en proporciones apropiadas de nutrientes minerales para asegurar el crecimiento apropiado de los microorganismos, maximizar la asimilación de la fuente de carbono y energía por las células en el proceso de conversión microbiana y alcanzar rendimientos celulares máximos con densidad celular máxima en el medio de fermentación.

La composición del medio mineral acuoso puede variar a lo largo de un amplio intervalo, dependiendo en parte del microorganismo y el sustrato empleados, como se sabe en la técnica. Los medios minerales deben incluir, además de nitrógeno, cantidades adecuadas de fósforo, magnesio, calcio, potasio, azufre y sodio, en formas iónicas y combinadas asimilables solubles adecuadas, y también deben estar presentes preferiblemente ciertos oligoelementos tales como cobre, manganeso, molibdeno, cinc, hierro, boro y yodo, y otros, de nuevo en forma asimilable soluble adecuada, todo como se sabe en la técnica.

La reacción de fermentación es un procedimiento aeróbico en el que el oxígeno molecular necesario es suministrado por un gas que contiene oxígeno molecular tal como aire, aire enriquecido en oxígeno o incluso oxígeno molecular sustancialmente puro, proporcionado para mantener el contenido del recipiente de fermentación con una presión parcial de oxígeno adecuada eficaz para ayudar a la especie de microorganismo a crecer de un modo próspero. En efecto, al usar un sustrato de hidrocarburo oxigenado, el requerimiento de oxígeno para el crecimiento del microorganismo se reduce. No obstante, se debe suministrar el oxígeno molecular para el crecimiento, puesto que la asimilación del sustrato y el crecimiento correspondiente de los microorganismos es, en parte, un procedimiento de combustión.

Aunque la velocidad de aireación puede variar a lo largo de un intervalo considerable, la aireación se efectúa generalmente a una velocidad que está en el intervalo de alrededor de 0,5 a 10, preferiblemente alrededor de 0,5 a 7, ~ volúmenes (a la presión empleada y a 25°C) de gas que contiene oxígeno por volumen de líquido en el fermentador por minuto. Esta cantidad se basa en aire de contenido de oxígeno normal que se suministra al reactor, y en cuanto a oxígeno puro, los intervalos respectivos sería de alrededor de 0,1 a 1,7, o preferiblemente de alrededor de 0,1 a 1,3, volúmenes (a la presión empleada y a 25°C) de oxígeno por volumen de líquido en el fermentador por minuto.

La presión empleada para el procedimiento de conversión microbiana puede variar ampliamente. Las presiones generalmente están en el intervalo de alrededor de 0 a 0,34 MPa (50 psig), actualmente preferiblemente alrededor de 0 a 0,21 MPa (30 psig), más preferiblemente al menos ligeramente sobre la presión atmosférica, como un equilibrio de equipo y coste de funcionamiento frente a la solubilidad de oxígeno alcanzada. Presiones mayores que la atmosférica son ventajosas ya que tales presiones tienden a incrementar una concentración de oxígeno disuelto en el fermento acuoso, que a su vez puede ayudar a incrementar las velocidades crecimiento celular. Al mismo

tiempo, esto se equilibra por el hecho de que las presiones atmosféricas altas incrementan los costes de equipo y funcionamiento.

La temperatura de fermentación puede variar algo, pero para hongos filamentosos tales como *Trichoderma reesei* la temperatura generalmente estará dentro del intervalo de alrededor de 20°C a 40°C, generalmente preferiblemente en el intervalo de alrededor de 25°C a 34°C, dependiendo de la cepa de microorganismo elegida.

Los microorganismos también requieren una fuente de nitrógeno asimilable. La fuente de nitrógeno asimilable puede ser cualquier compuesto o compuestos que contengan nitrógeno capaces de liberar nitrógeno en una forma adecuada para la utilización metabólica por el microorganismo. Aunque se puede emplear una variedad de compuestos fuente de nitrógeno orgánico, tales como hidrolizados proteínicos, habitualmente se pueden utilizar compuestos que contienen nitrógeno baratos tales como amoníaco, hidróxido amónico, urea, y diversas sales amónicas tales como fosfato amónico, sulfato amónico, pirofosfato amónico, cloruro amónico o varios otros compuestos amónicos. El propio amoníaco gaseoso es conveniente para operaciones a gran escala, y se puede emplear al burbujear a través del fermento acuoso (medio de fermentación) en cantidades adecuadas. Al mismo tiempo, tal amoníaco se puede emplear para ayudar en el control del pH.

El intervalo de pH en el fermento microbiano acuoso (mezcla de fermentación) debe estar en el intervalo ejemplar de alrededor de 2,0 a 8,0. Con hongos filamentosos, el pH normalmente está dentro del intervalo de alrededor de 2,5 a 8,0; con *Trichoderma reesei*, el pH normalmente está dentro del intervalo de alrededor de 3,0 a 7,0. Preferencias de intervalo de pH para ciertos microorganismos dependen hasta algún punto del medio empleado, así como el microorganismo particular, y así cambiar algo con el cambio en el medio como se puede determinar fácilmente por los expertos en la técnica.

Aunque el tiempo de retención medio en la mezcla de fermentación en el fermentador puede variar considerablemente, dependiendo en parte de la temperatura de fermentación y el cultivo empleados, generalmente estará dentro del intervalo de alrededor de 24 a 500 horas, preferiblemente actualmente de alrededor de 24 a 400 horas. Preferiblemente, la fermentación se efectúa de tal modo que el sustrato que contiene carbono se pueda controlar como un factor limitativo, proporcionando de ese modo una buena conversión del sustrato que contiene carbono en células y evitando la contaminación de las células con una cantidad sustancial de sustrato no convertido. Lo último no es un problema con sustratos hidrosolubles, puesto que cualesquiera trazas restantes se eliminan fácilmente por lavado. Sin embargo, puede ser un problema en el caso de sustratos no hidrosolubles, y requiere etapas de tratamiento de producto añadidas tales como etapas de lavado adecuadas. Como se describe anteriormente, el tiempo para alcanzar este nivel no es crítico y puede variar con el microorganismo particular y el procedimiento de fermentación que se efectúe. Sin embargo, se sabe bien en la técnica cómo determinar la concentración de la fuente de carbono en el medio de fermentación y si se ha alcanzado o no el nivel deseado de fuente de carbono.

Aunque la fermentación se puede efectuar como una operación discontinua o continua, la operación con alimentación por lotes se prefiere mucho por la facilidad de control, la producción de cantidades uniformes de productos y los usos más económicos de todo el equipo. Si se desea, parte o la totalidad del material fuente de carbono y energía y/o parte de la fuente de nitrógeno asimilable tal como amoníaco se puede añadir al medio mineral acuoso antes de alimentar el medio mineral acuoso al fermentador. Cada una de las corrientes introducidas en el reactor preferiblemente se controla a una velocidad predeterminada, o en respuesta a una necesidad determinable al verificar tal como la concentración del sustrato de carbono y energía, el pH, el oxígeno disuelto, el oxígeno o el dióxido de carbono en los gases de escape del fermentador, la densidad celular medible por transmitancia de luz o similares. Las velocidades de alimentación de los diversos materiales se pueden variar a fin de obtener una velocidad de crecimiento celular tan rápida como sea posible, de acuerdo con la utilización eficaz de la fuente de carbono y energía, para obtener un rendimiento de células del microorganismo tan alto como sea posible con relación a la carga de sustrato.

Bien en una operación discontinua, o bien la de alimentación por lotes preferida, todo el equipo, el reactor o el medio, el recipiente o el depósito de fermentación, las tuberías, los dispositivos de circulación o enfriamiento adjuntos y similares se esterilizan inicialmente, habitualmente al emplear vapor de agua tal como a alrededor de 121°C durante al menos alrededor de 15 minutos. A continuación, el reactor esterilizado se inocula con un cultivo del microorganismo seleccionado en presencia de todos los nutrientes requeridos, incluyendo oxígeno, y el sustrato que contiene carbono. El tipo de fermentador empleado no es crítico, aunque actualmente se prefiere una operación bajo Biolafitte de 15 l (Saint-Germain-en-Laye, Francia).

La recogida y la purificación de las enzimas de la presente descripción a partir del caldo de fermentación también se puede realizar mediante procedimientos conocidos de por sí en la técnica. Generalmente, el caldo de fermentación contendrá restos celulares, incluyendo células, diversos sólidos suspendidos y otros contaminantes de biomasa, así como el producto enzimático deseado de la presente descripción, que preferiblemente se retiran del caldo de fermentación por medios conocidos en la técnica. Procedimientos adecuados para tal retirada incluyen técnicas de separación sólido-líquido convencionales tales como, p. ej., centrifugación, filtración, diálisis, microfiltración, filtración giratoria a vacío u otros procedimientos conocidos, para producir un filtrado libre de células. Puede ser preferible concentrar adicionalmente el caldo de fermentación o el filtrado libre de células usando técnicas tales como

ultrafiltración, evaporación o precipitación. La precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o el filtrado se puede efectuar por medio de una sal, p. ej., sulfato amónico. Una purificación adicional se puede alcanzar opcionalmente mediante cristalización o mediante una variedad de procedimientos cromatográficos, p. ej., cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o procedimientos reconocidos en la técnica similares.

5 Fitasas.

El ácido fítico (hexaquisfosfato de mioinositol) es un importante constituyente de cereales, legumbres y cultivos oleaginosos. La forma salina, el fitato, es la principal forma de almacenamiento de fósforo en estas plantas.

Según se usa en la presente memoria, el término "fitasa" o "actividad de fitasa" se refiere a una proteína o un polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de fitato en (1) mioinositol y/o (2) mono-, di-, tri-, tetra- y/o penta-fosfatos del mismo y (3) fosfato inorgánico. Por ejemplo, enzimas que tienen la actividad catalítica que se define en Enzyme Commission EC número 3.1.3.8 o EC número 3.1.3.26.

Algunas fitasas, además del fitato, son capaces de hidrolizar al menos algunos de los fosfatos de inositol de grados de fosforilación intermedios.

Los términos "variante de fitasa" o "variante" o "forma modificada" se refieren a una enzima fitasa con una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de una fitasa parental que tiene una o más sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos, que conjuntamente se denominan "mutaciones".

Los términos "fitasa parental" o "enzima parental" se refieren a una enzima fitasa de la que se deriva una variante de fitasa. Una fitasa parental puede ser una fitasa silvestre u otra variante de fitasa. En particular, en la presente invención, una "fitasa parental" se puede derivar de una *Buttiauxella* sp. o *E. coli* según se describe en los documentos WO 99/08539 US 5876997, US 6190897 y AU 735371 EP 1003379 y JP 2001514869. Adecuadamente, la "fitasa parental" se deriva de la cepa P1-29 de *Buttiauxella* depositada bajo en número de registro NCIMB41248 según describía el documento WO2006/043178.

Los términos "fitasa de *E. coli*" y "fitasa de *Buttiauxella* sp." significan que las enzimas no necesitan haberse obtenido de una fuente de *E. coli* o *Buttiauxella* sp. En cambio, las enzimas preferiblemente tienen que tener las mismas características funcionales o secuencia que las de la fitasa de *E. coli* o *Buttiauxella* sp.. Por ejemplo, la fitasa de *Buttiauxella* sp. puede ser una variante derivada de una *Buttiauxella* sp., pero que no está presente naturalmente en especies de *Buttiauxella*.

El término "*Buttiauxella*" se refiere a un género de bacterias facultativamente anaerobias gramnegativas de la familia Enterobacteriaceae y *Buttiauxella* spp incluyen *B. agrestis*, *B. brennerase*, *B. ferragutiae*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae* y *B. warmboldiae*. Cepas de las especies de *Buttiauxella* están disponibles, por ejemplo, de the American Type Culture Collection (ATCC) y DSMZ, the German National Resource Centre for Biological Material.

Las fitasas de *Buttiauxella* se identifican preferiblemente a partir de *Buttiauxella* spp mediante los métodos descritos en el documento WO 2006/043178.

En una realización alternativa, la fitasa parental o la fitasa se puede derivar de *Citrobacter* sp. según se describe en el documento WO2006/038062.

Los términos "fitasa silvestre" o "silvestre", según se usan en la presente memoria, describen una enzima fitasa con una secuencia de aminoácidos encontrada en la naturaleza. En particular, la fitasa de *Buttiauxella* silvestre es la mostrada como SEQ ID. N° 1. La fitasa de *E. coli* silvestre se muestra como SEQ ID N° 13 (Figura 27).

El término "variante de fitasa", según se usa en la presente memoria, significa una enzima fitasa con una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácido en comparación con la secuencia de aminoácidos de la fitasa de SEQ. ID N°: 1 o SEQ ID N° 13. Los términos "variante" y "variación", según se usan en la presente memoria, significan meramente que hay una diferencia entre la secuencia de la secuencia de aminoácidos de la variante de fitasa y la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID N°: 1 o 13, y no significa que una secuencia de aminoácidos de SEQ. ID N°: 1 o 13 o cualquier otra fitasa sirva como una materia prima de ningún modo y/o estuviera físicamente variada, mutada, modificada o bloqueada de otro modo para dar la variante. Indicado simplemente, las variantes de fitasa para el uso en la presente invención se pueden preparar mediante cualquier método, y los expertos estarán muy familiarizados con numerosos métodos, algunos de los cuales se describen en la presente memoria, para elaborar las variantes de fitasa.

Realizaciones de fitasas variantes (p. ej., fitasas de *Buttiauxella* sp. variantes) para el uso en la presente invención se divulgan en WO 2006/043178, WO 2008/097619 y PCT/US2009/41011 y describen fitasas obtenibles de p derivadas de una *Buttiauxella* sp. parental y fitasas correspondientes a enzima fitasa de *Buttiauxella* sp.. Específicamente, el documento WO 2006/043178 describe la mutagénesis de una enzima fitasa silvestre que tiene la secuencia divulgada en la presente memoria como SEQ ID N°: 3. Un número de mutaciones preferidas se muestra en el documento WO 2006/043178. El documento PCT/US2009/41011 muestra mutaciones preferidas

adicionales. Mutaciones preferidas específicas se divulgan en la presente memoria como SEQ ID N°: 2- 6, estas representan:

La fitasa BP-11 (a veces denominada BP 11) - que es la fitasa descrita en al menos la solicitud PCT WO 2006/043178 y que se puede obtener de Danisco A/S. La secuencia de aminoácidos se describe en la presente memoria como SEQ ID N°: 6. La fitasa BP-17 (a veces denominada BP 17) - que es la fitasa descrita en al menos la solicitud PCT WO 2008/097619 y que se puede obtener de Danisco A/S. La secuencia de aminoácidos se describe en la presente memoria como SEQ ID N°: 3.

BP-110 (a veces denominada BP 17 var. 110, o a veces se denomina BP17-110 o BP17 110) - que es la fitasa descrita en al menos la solicitud PCT PCT/US2009/41011. La secuencia de aminoácidos se describe en la presente memoria como SEQ ID N°: 4.

BP-111 (a veces denominada BP 17 var. 111, o a veces se denomina BP17-111 o BP17 111) - que es la fitasa descrita en al menos la solicitud PCT PCT/US2009/41011. La secuencia de aminoácidos se describe en la presente memoria como SEQ ID N°: 5.

BP-112 (a veces denominada BP 17 var. 112, o a veces se denomina BP17-112 o BP17 112) - que es la fitasa descrita en al menos la solicitud PCT PCT/US2009/41011. La secuencia de aminoácidos se describe en la presente memoria como SEQ ID N°: 2.

Las secuencias de aminoácidos para BP-11 (SEQ ID N°: 6) BP-17 (SEQ ID N°: 3), BP-110 (SEQ ID N°: 4), BP-111 (SEQ ID N°: 5) y BP-112 (SEQ ID N°: 2) se presentan en la Figura 3.

Cuando se hace referencia a SEQ ID N°: 1-6 y polipéptidos que comprenden SEQ ID N°: 1-6, se prevé que esto también se refiera a polipéptidos que son procesados co- o postraduccionalmente durante la expresión, por ejemplo por escisión del péptido de señal. La escisión postraducciona también se puede producir en el extremo C. Por lo tanto, en una realización preferida, el fragmento efectivo de la misma (también denominado fragmento funcional de la misma) es el polipéptido maduro producido por el hospedador natural o un hospedador de expresión apropiada adecuado.

En otra realización, la fitasa se caracteriza por que se deriva de la cepa P1-29 de *Buttiauxella* sp. depositada bajo el número de registro NCIMB 41248 según se describe en el documento WO 2006/043178.

Los complementos para piensos según la presente invención pueden incluir fitasas que tienen mejoras de las características de una fitasa parental resultantes de la modificación de uno o más residuos de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la fitasa parental.

La enzima fitasa mejorada para el uso en la invención tiene preferiblemente una identidad con SEQ ID N°: 3 o un fragmento efectivo de la misma de más de 75%, preferiblemente de más de 80%, más preferiblemente de más de 90%, más preferiblemente de más de 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente de más de 99%. Sin embargo, también se prevé que las variantes puedan ser heterólogas, (es decir no homólogas) a SEQ ID N°: 3. Por ejemplo, variantes producidas mediante técnicas de recombinación tales como recombinación exomediada, o barajado familiar, pueden dar como resultado variantes, aunque preparadas usando la fitasa parental, que pueden tener menos de 75% de homología.

Adecuadamente, las variantes muestran características de estabilidad mejoradas con respecto a uno cualquiera de los siguientes: estabilidad térmica, actividad térmica, intervalo de pH, estabilidad frente a pepsina, actividad específica, especificidad para el sustrato y especificidad para el sustrato más amplia. Métodos adecuados para determinar estas características se divulgan en la presente memoria.

El término "estabilidad mejorada" en el contexto de una propiedad tal como la estabilidad a temperaturas superiores, pH inferior, etc. se refiere a una actividad enzimática retenida superior a lo largo del tiempo en comparación con otra fitasa identificada tal como la de, en el caso de *Buttiauxella*, SEQ ID N°: 1. A menos que se identifique específicamente otra fitasa, el término "estabilidad mejorada", cuando se usa en la presente memoria, se referirá a una actividad enzimática retenida superior a lo largo del tiempo en comparación con la fitasa de SEQ ID N°: 1.

Los términos "térmicamente estable" y "termoestable" se refieren a fitasas de la presente divulgación que retienen una cantidad especificada de actividad enzimática después de la exposición a una temperatura elevada. Las variantes de fitasa según esta divulgación se consideran termoestables a una temperatura especificada si la enzima retiene más de 50% de su actividad después de la exposición a la temperatura especificada durante 10 minutos a pH 5,5 en tampón.

El término "actividad térmica mejorada", cuando trata de variantes de fitasa de la presente divulgación, significa que la variante de fitasa exhibe una cantidad igual o incrementada de actividad de enzima fitasa a temperatura elevada en comparación con la actividad de enzima fitasa de otra fitasa identificada tal como la de SEQ ID N°: 1. A menos que se identifique específicamente otra fitasa, el término "actividad térmica mejorada", cuando se usa en la presente

memoria, se referirá a la actividad térmica de una variante de fitasa de esta divulgación en comparación con la actividad térmica de la fitasa de SEQ ID N°: 1.

Variantes de esta divulgación que se describen en los documentos WO 2006/043178, WO 2008/097619 y PCT/US2009/41011 se describen mediante la siguiente nomenclatura: [residuo de aminoácido original de SEQ. ID N°: 1/posición del residuo de aminoácido original en SEQ. ID N°: 1/residuo de aminoácido sustituido]. Por ejemplo, en SEQ ID N°: 2, la sustitución de la alanina (A) original por treonina (T) en la posición 89 de SEQ ID N°: 1 es representada como A89T. Cuando una posición adecuada para la sustitución se identifica en la presente memoria sin un aminoácido específico sugerido, se ha de entender que cualquier residuo de aminoácido puede sustituir al residuo de aminoácido presente en la posición. Cuando una fitasa variante contiene una eliminación en comparación con otras fitasas, la eliminación se indica con "***". Por ejemplo, una eliminación en la posición A89 de SEQ. ID N°: 1 se representa como A89*. Una eliminación de dos o más aminoácidos consecutivos se indica, por ejemplo, como (89-91)*.

Los términos "derivado de" y "obtenido de" se refieren no solo a una fitasa producida o producible por una cepa del organismo en cuestión, sino también una fitasa codificada por una secuencia de ADN aislada de tal cepa y producida en un organismo hospedador que contiene tal secuencia de ADN. Adicionalmente, los términos se refieren a una fitasa que es codificada por una secuencia de ADN de origen sintético y/o de ADNc y que tiene las características identificativas de la fitasa en cuestión. De ahí que una fitasa que se "deriva de" y se "obtiene de" otra fitasa no signifique necesariamente que la fitasa se haya derivado físicamente u obtenido físicamente de la segunda fitasa, sino que en cambio también puede significar que la fitasa en cuestión se ha preparado usando el conocimiento o las ideas derivados del conocimiento de la segunda fitasa.

En particular, las mejoras en las características de la fitasa se dirigen a la estabilidad de la enzima bajo condiciones de procesamiento de alimentos y piensos, a la estabilidad de la enzima durante el tránsito por el estómago y a la actividad y la estabilidad de la enzima en el estómago y/o el tracto intestinal de seres humanos o animales, haciendo a las variantes mejoradas particularmente adecuadas para el uso como complementos para piensos. Así, tales mejoras comprenden entre otros parámetros el incremento en la estabilidad a temperaturas elevadas, preferiblemente a temperaturas por encima de 65°C, el incremento en la estabilidad frente a la digestión proteolítica, preferiblemente una proteasa del trato digestivo tal como pepsina, el incremento en la actividad catalítica a pH bajo, preferiblemente la actividad catalítica por debajo de pH 5,5, y la eficacia general de liberación de grupos fosfato del fitato, y preferiblemente además fosfatos de inositol.

Por lo tanto, en algunas realizaciones la invención se refiere a complementos para piensos que comprenden variantes de fitasa con características mejoradas que, cuando se comparan con la fitasa parental, comprenden mutaciones en una o más de las posiciones divulgadas en los documentos WO 2006/043178, WO 2008/097619 y PCT/US2009/41011 y/o en posiciones correspondientes en una fitasa homóloga a la fitasa que se muestra en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1. Estas posiciones se caracterizan por que la mutagénesis de estas posiciones conducía a una mejora en las características de la enzima.

Las variantes con estabilidad térmica superior (diferencia de estabilidad térmica) se determinan preferiblemente usando los métodos divulgados en el documento WO 2006/043178.

La enzima fitasa variante para el uso en la presente invención tiene preferiblemente una diferencia de estabilidad térmica (T.D, por sus siglas en inglés) de al menos 1,5, más preferiblemente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, lo más preferiblemente al menos 20.

Las variantes con estabilidad proteolítica superior se determinan preferiblemente mediante los métodos divulgados en el documento WO 2006/043178.

Preferiblemente, la variante de enzima fitasa para el uso en la presente invención tiene una estabilidad proteolítica (actividad residual) de al menos 45%, preferiblemente 50%, 55%, más preferiblemente al menos 60% o 65%, lo más preferiblemente al menos 70%.

Preferiblemente, la variante de fitasa para el uso en la presente invención tiene una actividad específica de más de 100% de la actividad silvestre a pH 4,0, preferiblemente más de 105%, 110%, más preferiblemente más de 114%.

En un aspecto, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos está en una forma purificada. El término "purificado" significa que la secuencia está en un estado relativamente puro al menos 1%, 5% puro o 10% puro, más preferiblemente al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% puro. En una realización preferida, cuando se hace referencia a un polipéptido, la pureza según se define anteriormente se determina en cuanto a estar purificado de otros polipéptidos mediante electroforesis SDS-PAGE.

Variantes/derivados

La presente invención también abarca el uso de variantes, homólogos y derivados de cualquier secuencia de aminoácidos de una enzima o de cualquier secuencia de nucleótidos que codifique tal enzima.

Las secuencias de aminoácidos variantes pueden incluir grupos espaciadores adecuados que se pueden insertar entre dos residuos de aminoácido cualesquiera de la secuencia incluyendo grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo además de espaciadores de aminoácido tales como residuos de glicina o β -alanina. Una forma de variación adicional implica la presencia de uno o más residuos de aminoácido en forma peptóide, y será bien entendida por los expertos en la técnica. Para evitar dudas, la "forma peptóide" se usa para referirse a residuos de aminoácido variantes en los que el grupo sustituyente del carbono α está en el átomo de nitrógeno del residuo en vez del carbono α . Procedimientos para preparar péptidos en la forma peptóide se conocen en la técnica, por ejemplo Simon RJ et al., PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 y Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

Otros componentes

- 10 El complemento para piensos de la presente invención se puede usar en combinación con otros componentes o portadores.

Portadores adecuados para enzimas para piensos incluyen maltodextrina, piedra caliza (carbonato cálcico), ciclodextrina, trigo o un componente del trigo, sacarosa, almidón, un antiespumante, Na_2SO_4 , talco, PVA y mezclas de los mismos. Además, existe un número de técnicas de encapsulación incluyendo las basadas en la cobertura con cera/grasa, añadir gomas vegetales, etc.

- 15 Ejemplos de otros componentes incluyen uno o más de: espesantes, agentes gelificantes, emulsionantes, aglutinantes, modificadores de cristales, edulcorantes (incluyendo edulcorantes artificiales), modificadores de la reología, estabilizadores, antioxidantes, tintes, enzimas, portadores, vehículos, excipientes, diluyentes, agentes lubricantes, agentes saborizantes, colorantes, agentes de suspensión, desintegrantes, aglutinantes de granulación, etc. Estos otros componentes pueden ser naturales. Estos otros componentes se pueden preparar mediante el uso de técnicas químicas y/o enzimáticas.

Según se usa en la presente memoria, el término "espesante o agente gelificante", según se usa en la presente memoria, se refiere a un producto que evita la separación al frenar o evitar el movimiento de las partículas, ya sean gotículas de líquidos inmiscibles, aire o sólidos insolubles.

- 25 El término "estabilizador", según se usa en la presente, se define como un ingrediente o una combinación de ingredientes que evita que un producto (p. ej. un producto alimenticio) cambie a lo largo del tiempo.

El término "emulsionante", según se usa en la presente memoria, se refiere a un ingrediente (p. ej. un ingrediente de un producto alimenticio) que evita la separación de emulsiones.

- 30 Según se usa en la presente memoria, el término "aglutinante" se refiere a un ingrediente (p. ej. un ingrediente alimenticio) que une el producto entre sí a través de una reacción física o química.

El término "modificador del cristal", según se usa en la presente memoria, se refiere a un ingrediente (p. ej. un ingrediente alimenticio) que afecta a la cristalización bien de grasa o bien de agua.

- 35 "Portadores" o "vehículos" significa materiales adecuados para la administración de compuestos e incluyen cualquiera de estos materiales conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, cualquier líquido, gel, disolvente, diluyente líquido, solubilizante o similares, que sea atóxico y no interactúe con ningún componente de la composición de un modo perjudicial.

Ejemplos de portadores nutricionalmente aceptables incluyen, por ejemplo, un grano, agua, soluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, vaselina, aceites vegetales, y similares.

- 40 Ejemplos de excipientes incluyen uno o más de: celulosa microcristalina y otras celulosas, lactosa, citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato cálcico dibásico, glicina, almidón, azúcar de la leche y polietilenglicoles de alto peso molecular.

Ejemplos de desintegrantes incluyen uno o más de: almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), almidón glicolato sódico, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos.

- 45 Ejemplos de aglutinantes de granulación incluyen uno o más de: polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, maltosa, gelatina y goma arábiga.

Ejemplos de agentes lubricantes incluyen uno o más de: estearato magnésico, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

Ejemplos de diluyentes incluyen uno o más de: agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

- 50 Los otros componentes se pueden usar simultáneamente (p. ej. cuando están mezclados entre sí o incluso cuando se aportan mediante diferentes vías) o secuencialmente (p. ej., se pueden aportar mediante diferentes vías).

Según se usa en la presente memoria, el término "componente adecuado para el consumo animal o humano" significa un compuesto que se añade o se puede añadir a la composición de la presente descripción como un complemento que puede ser beneficioso nutricionalmente, un sustituto de fibra o tener un efecto generalmente beneficioso para el consumidor.

- 5 A modo de ejemplo, los componentes pueden ser prebióticos tales como alginato, xantano, pectina, goma de algarroba (LBG, por sus siglas en inglés), inulina, goma guar, galactooligosacárido (GOS), fructooligosacárido (FOS), lactosacarosa, oligosacáridos de soja, palatinosa, isomaltoligosacáridos, glucooligosacáridos y xilooligosacáridos.

Enzimas lipolíticas

- 10 Las enzimas lipolíticas (EC 3.1.1.3), que se pueden definir como carboxilesterasas que catalizan la hidrólisis de acilglicerol, son enzimas fisiológicamente muy importantes como una de las tres enzimas digestivas principales junto con las amilasas y las proteasas. Hidrolizan lípidos hasta glicerol y ácidos grasos, pero también pueden funcionar en reacciones de esterificación o transesterificación.

- 15 En realizaciones preferidas, la enzima lipolítica para el uso en la presente invención es una enzima lipolítica derivada del hongo filamentoso *Aspergillus tubingensis* según se divulga en el documento WO 98/45453 y depositada bajo el Tratado de Budapest en el NCIMB el 24 de febrero de 1997 bajo el número de registro 40863. Se entenderá que la enzima lipolítica se puede derivar de *Aspergillus*, o alternativamente se puede producir recombinantemente en otro organismo tal como *E. Coli*.

- 20 Preferiblemente, la enzima lipolítica comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID N°: 7 o 8 o un polipéptido que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad con la misma; o un polipéptido que se produce mediante la expresión de una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de SEQ ID N°: 9 o 10; o una secuencia que difiere de SEQ ID N°: 9 o 10 debido a la degeneración del código genético; o una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID N°: 9 o 10.

- 25 Se entenderá que cualquiera de las definiciones generales de características divulgadas en relación con las fitasas se puede aplicar igualmente a las enzimas lipolíticas y, por motivos de concisión, no se repetirán aquí.

En una realización preferida adicional, la enzima lipolítica para el uso en la presente invención se produce en una célula de *Trichoderma reesei* según se divulga en la presente memoria.

El método para producir la enzima lipolítica comprende las etapas de:

- 30 (i) proporcionar una célula de *Trichoderma reesei* que comprende
- a) al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID N°: 7 o SEQ ID N°: 8 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de secuencia de identidad con SEQ ID N°: 7 o 8; y/o
 - 35 b) al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica en la que la secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10; y/o
 - 40 c) al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica en la que la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida a SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 o el complemento de cualquiera de las mismas bajo condiciones rigurosas; y/o
 - d) al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica en la que la secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10, excepto por la degeneración del código genético; y
- 45 (ii) cultivar la célula bajo condiciones que permitan la expresión de dichas secuencia o secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican dicha enzima lipolítica.

Se entenderá que según se define en la presente memoria, el término condiciones rigurosas se refiere a un lavado a 50°C y 0,2xSSC {1xSSC = NaCl 0,15 M, citrato Na₃ 0,015 M pH 7,0}.

- 50 Se entenderá que estas condiciones pueden ser condiciones muy rigurosas que se definen en la presente memoria como el lavado a 65°C y 0,1xSSC {1xSSC = NaCl 0,15 M, citrato Na₃ 0,015 M pH 7,0}.

Alternativamente se proporciona un método para producir una enzima lipolítica que comprende las etapas de:

(i) transfectar o transformar una célula de *Trichoderma reesei* con

- a) al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID N°: 7 o SEQ ID N°: 8 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 7 o 8; y/o
- 5 b) al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica en la que la secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10; y/o
- 10 c) al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica en la que la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida a SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 o el complemento de cualquiera de las mismas bajo condiciones rigurosas; y/o
- 15 d) al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica en la que la secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 excepto por la degeneración del código genético; y

(ii) cultivar la célula bajo condiciones que permitan la expresión de dichas secuencia o secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican dicha enzima lipolítica.

También se proporciona un método para producir una enzima lipolítica que comprende las etapas de:

(i) transfectar o transformar una célula de *Trichoderma reesei* con

- 20 a) al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID N°: 7 o SEQ ID N°: 8 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 7 o 8; y/o
- b) al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica en la que la secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 o una
- 25 secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10; y/o
- c) al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica en la que la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida a SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 o una
- 30 secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 o el complemento de cualquiera de las mismas bajo condiciones rigurosas; y/o
- d) al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica en la que la secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 excepto por la degeneración del código genético; y

35 (ii) repetir la etapa (i) sobre la célula para transfectar o transformar secuencialmente la célula con al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga adicional según se define en (i)(a), (i)(b) o (i)(c) (p. ej. tal como una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID N°: 7 o SEQ ID N°: 8 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 40% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 7 o 8); y

40 (iii) cultivar la célula bajo condiciones que permitan la expresión de dichas secuencia o secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican dicha enzima lipolítica.

Trichoderma reesei es capaz de producir las enzimas lipolíticas con rendimientos significativamente altos.

Por otra parte, las enzimas lipolíticas producidas mediante la metodología divulgada en la presente memoria no están sobreglicosiladas y por lo tanto tienen buena actividad enzimática.

45 Bradner et al. (en Current Genetics, 44: 224-230, (2003)) usaron *Trichoderma reesei* como un organismo hospedador de expresión en su búsqueda de enzimas lipolíticas previamente desconocidas. Una enzima lipolítica procedente de un aislado antártico de *Penicillium allii* se clonó y se expresó en *Trichoderma reesei*. Bradner et al. concluyeron que los métodos descritos serían útiles para indagar sobre genes de enzimas lipolíticas potencialmente nuevos pero no se hizo ninguna sugerencia de que *T. reesei* se pudiera usar para la sobreexpresión de proteínas.

También se divulga en otro aspecto un método para producir una enzima lipolítica que comprende las etapas de:

50 (i) proporciona una célula de *Trichoderma reesei* transformada o transfectada que comprende al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica;

(ii) cultivar la célula a un pH 4 A pH 5,5 bajo condiciones que permitan la expresión de dichas secuencia o secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican dicha enzima lipolítica;

(iii) aislar, purificar o concentrar la enzima en un medio a pH 5,5 a pH 6,5.

En este aspecto, preferiblemente, la enzima lipolítica:

- 5 a) comprende una secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID N°: 7 o SEQ ID N°: 8 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 7 o 8; y/o
- b) es codificada por un nucleótido que comprende la secuencia mostrada como SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 o que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10; y/o
- 10 c) es codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida a SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 o comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 o el complemento de cualquiera de las mismas bajo condiciones rigurosas; y/o
- 15 d) al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica en la que la secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 excepto por la degeneración del código genético.

Adecuadamente, puede haber al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la enzima lipolítica en la célula de *Trichoderma reesei*. Puede haber dos o más copias (es decir múltiples copias) de la o cada secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la enzima lipolítica según la presente descripción en la célula de *Trichoderma reesei*. Cada secuencia de nucleótidos heteróloga está asociada con y está bajo el control de un promotor. Adecuadamente, cada secuencia de nucleótidos heteróloga puede tener un promotor separado asociado con ella y estar bajo el control de ese promotor. Los promotores pueden ser iguales o diferentes.

Así, la célula de *Trichoderma reesei* puede comprender o ser transfectada o transformada con al menos 2 secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican la enzima lipolítica.

25 Adecuadamente, la (o cada) secuencia de nucleótidos heteróloga puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de señal, secuencia de nucleótidos que codifica dicho péptido de señal que está conectada operativamente a dicha secuencia de nucleótidos que codifica dicha enzima lipolítica. Si existen múltiples secuencias de nucleótidos heterólogas y en las que más de una tiene una secuencia de señal asociada con las mismas, entonces las secuencias de señal pueden ser iguales o diferentes.

30 Adecuadamente, la enzima lipolítica puede comprender un péptido de señal endógeno o exógeno. Cuando el péptido de señal es endógeno - significa que el péptido de señal es el que está conectado naturalmente con la enzima lipolítica cuando se produce naturalmente. Por ejemplo, el péptido de señal puede ser el péptido de señal de *Aspergillus tubingensis* que está conectado naturalmente con la enzima lipolítica cuando se encuentra en *Aspergillus tubingensis*.

35 El término "heterólogo" según se usa en la presente memoria, significa que no está presente naturalmente en la célula de *Trichoderma reesei*. En otras palabras, es exógeno a la célula de *Trichoderma reesei*. Por ejemplo, el término "secuencia de nucleótidos heteróloga", según se usa en la presente memoria, significa que la secuencia de nucleótidos no está presente naturalmente en la célula de *Trichoderma reesei*. En otras palabras, la secuencia de nucleótidos es exógena a la célula de *Trichoderma reesei*. El término también incluye múltiples copias de la secuencia presente en la naturaleza ya que tales múltiples copias adicionales serían heterólogas.

40 La secuencia de nucleótidos heteróloga se puede obtener o ser obtenible a partir de un microorganismo, particularmente un hongo.

La secuencia de nucleótidos heteróloga se puede obtener o ser obtenible a partir de *Aspergillus*, particularmente *Aspergillus tubingensis*.

45 En realizaciones preferidas de los aspectos anteriores, dicha célula de *Trichoderma reesei* tiene al menos dos genes que codifican enzimas no lipolíticas suprimidas.

También se proporciona adicionalmente una enzima lipolítica obtenible mediante los métodos de la presente descripción.

También se proporciona una célula de *Trichoderma reesei* transformada o transfectada que comprende:

- 50 a) al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una proteína de enzima lipolítica que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 7 o 8; y/o

- b) al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica en la que la secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10; y/o
- 5 c) al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica en la que la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida a SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 o el complemento de cualquiera de las mismas bajo condiciones rigurosas; y/o
- 10 d) al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima lipolítica en la que la secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N°: 10 excepto por la degeneración del código genético; y
- en la que dicha célula de *Trichoderma reesei* tiene al menos dos genes que codifican enzimas no lipolíticas suprimidas.
- Preferiblemente, dicha célula de *Trichoderma reesei* según cualquiera de los aspectos precedentes tiene al menos tres genes que codifican enzimas no lipolíticas suprimidas.
- 15 Preferiblemente, dicha célula de *Trichoderma reesei* según cualquiera de los aspectos precedentes tiene al menos cuatro genes que codifican enzimas no lipolíticas suprimidas.
- "Suprimida" significa que la célula no expresa la enzima no lipolítica pertinente al mismo nivel que la célula no transformada/transfectada. En algunas realizaciones, "suprimida" significa que la célula no expresa la enzima no lipolítica pertinente. La supresión se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas en la especialidad, tales como
- 20 eliminaciones.
- Preferiblemente, al menos uno de los genes que codifican una enzima no lipolítica que se suprime es un gen de celulasa.
- Preferiblemente, al menos dos de los genes que codifican una enzima no lipolítica que se suprime son genes de celulasa.
- 25 Un ejemplo de al menos uno de los genes que codifican una enzima no lipolítica que se suprime es un gen que codifica celobiohidrolasas (p. ej. CBHI o CBHII).
- Otro ejemplo de al menos uno de los genes que codifican una enzima no lipolítica que se suprime es un gen que codifica endoglucanasas (p. ej. EGI y EGII).
- 30 En algunas realizaciones, la célula de *Trichoderma reesei* es una célula en la que los genes endógenos que codifican una o ambas celobiohidrolasas (CBHI y CBHII) y/o una o ambas de las endoglucanasas (EGI y EGII) se eliminan o bloquean. Adecuadamente, la célula de *Trichoderma reesei* puede ser una célula no GMM o un derivado de la misma, por ejemplo un derivado de la cepa RL-P37. Adecuadamente, la célula de *Trichoderma reesei* puede ser un derivado de la cepa RL-P37 que se produce usando el método indicado en el Ejemplo 7.
- 35 En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos heteróloga puede codificar una enzima lipolítica que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 7 o SEQ ID N° 8.
- En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos heteróloga puede codificar una enzima lipolítica y comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N° 10.
- 40 Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos heteróloga codifica una enzima lipolítica que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 7 o SEQ ID N° 8.
- Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos heteróloga codifica una enzima lipolítica y comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%
- 45 o al menos 98% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 9 o SEQ ID N° 10.
- La identidad de las secuencias de aminoácidos de un número de enzimas lipolíticas con la enzima lipolítica procedente de *Aspergillus tubingensis* que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID N°: 9 (también llamada en la presente memoria lipasa 3) se muestra en la Tabla 1 posteriormente.

Tabla 1 - Enzimas lipolíticas con identidad de secuencia con la enzima lipolítica procedente de *Aspergillus tubingensis* (lipasa 3).

Enzimas lipolíticas procedentes de diferentes hongos	Nº de Registro	Identidad de secuencias de aminoácidos %
A. niger CBS 513,88	XP_001397501.1	93
Aspergillus niger	ABG73613.1	93
Aspergillus niger	<u>ABG37906.1</u>	93
Aspergillus nidulans FGSCA4	<u>XP 681315.1</u>	61
Aspergillus clavatus NRRL 1	<u>XP 001276337.1</u>	57
Neosartorya fischeri NRRL 181	<u>XP 001266329.1</u>	60
Aspergillus fumigatus Af293	XP 748138.1	59
Aspergillus oryzae RIB40	<u>XP 001818694.1</u>	56
Aspergillus terreus NIH2624	XP_001218444.1	54
Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255	CAP96359.1	55
Aspergillus niger	ABG73614.1	54
Aspergillus niger	XP 001393532.1	53
Thermomyces lanuginosus	<u>059952.1</u>	50
Penicillium marneffei ATCC 18224	XP_002147144.1	49
Aspergillus oryzae R	XP 001824529.1	44
Phaeosphaeria nodorum SN15	XP 001796872.1	45
Penicillium cyclopium	P61869.1	42
Penicillium camemberti.	<u>1TIA A.</u>	42

- La célula hospedadora de *Trichoderma reesei* puede ser cualquier célula de *Trichoderma reesei*. También se puede considerar que la célula es una célula de *Trichoderma reesei* silvestre. La célula de *Trichoderma reesei* puede ser una de la que genes que codifican una o más celobiohidrolasas (CBHI o CBHII) secretadas se han eliminado o disociado de modo que no se expresen. Adecuadamente, la célula de *Trichoderma reesei* puede ser una célula no modificada genéticamente o un derivado de la misma, por ejemplo un derivado de la cepa RL-P37. Adecuadamente, la célula de *Trichoderma reesei* puede ser un derivado de la cepa RL-P37 que se produce usando el método indicado en el Ejemplo 10.
- 5 La célula hospedadora de *Trichoderma reesei* preferiblemente es adecuada para el uso en la fermentación a gran escala.
- 10 La enzima se puede producir en un fermentador que comprende de alrededor de 3 litros a alrededor de 20 litros de medio de cultivo. En otra realización, la presente invención se lleva a cabo como un fermentador a una escala de 10-16 litros, preferiblemente 14 litros. En una realización, preferiblemente, la fermentación se lleva a cabo con más de alrededor de 12 litros, preferiblemente más de alrededor de 14 litros.
- 15 En realizaciones preferidas, la producción de la enzima lipolítica se lleva a cabo a escala comercial. A este respecto, la fermentación se lleva a cabo a una escala de más de alrededor de 50.000 litros, preferiblemente a una escala de más de alrededor de 80.000 litros, preferiblemente una fermentación a una escala de más de alrededor de 200.000 litros.
- 20 En una realización, la proteína total producida mediante el método está muy por encima de alrededor de 20 g/litro.
- 25 De la proteína total producida, la mayoría es la enzima lipolítica deseada. En una realización, la proteína secretada total producida comprende al menos 50% de la enzima lipolítica deseada. En una realización, la proteína secretada total producida comprende al menos 60% de la enzima lipolítica deseada. En una realización, la proteína secretada total producida comprende al menos 70% de la enzima lipolítica deseada. En una realización, la proteína secretada total producida comprende al menos 80% de la enzima lipolítica deseada.

Adecuadamente, el método puede comprender la selección de transformantes que se han secretado para la producción de la enzima lipolítica (preferentemente se seleccionan grandes productores de la enzima deseada).

En una realización, adecuadamente, el método puede comprender una primera etapa de transformación en la que una célula de *Trichoderma reesei* se transforma con al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la enzima lipolítica definida en la presente memoria, la selección de transformantes que se han cribado con respecto a la producción de la enzima lipolítica (preferentemente se seleccionan grandes productores de la enzima deseada), y una segunda etapa de transformación (es decir una etapa de retransformación) de un transformante seleccionado con al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la enzima lipolítica definida en la presente memoria, seguida por una selección adicional de nuevos transformantes que se han cribado con respecto a la producción de la enzima lipolítica (preferentemente se seleccionan grandes productores de la enzima deseada).

En algunas realizaciones, la enzima lipolítica para el uso en la presente invención puede estar glicosilada. En algunas realizaciones, la enzima lipolítica puede estar N-glicosilada en N32 (cuando se numera usando SEQ ID N°: 8) o en una posición equivalente para otras enzimas lipolíticas según la descripción. Este aspecto puede impartir ventajas significativas ya la que la actividad de la enzima no se bloquea o reduce por la glicosilación de la enzima. Sin querer limitarse por una teoría, se puede observar una reducción en la actividad de la enzima lipolítica cuando se produce en otros hospedadores tales como *A. tubingensis* y se cree que se debe a la sobreglicosilación de la enzima al menos en el sitio N242.

Por lo tanto, la enzima lipolítica producida mediante el método divulgado en la presente memoria es distinguible de la enzima lipolítica producida en otros hospedadores, p. ej. *A. tubingensis*, debido al grado de glicosilación de la enzima, particularmente en el sitio N32. En algunas realizaciones de la presente invención, la enzima tiene glicosilación en, al menos, el sitio N32.

Adecuadamente, la enzima lipolítica se puede producir con un péptido de señal. En otras palabras, la secuencia de nucleótidos heteróloga usada en la presente invención comprende una porción de la misma que codifica un péptido de señal.

El péptido de señal se puede usar para dirigir la secreción de la enzima lipolítica a través de una membrana celular particular. Las secuencias del péptido de señal pueden ser endógenas o exógenas para la secuencia codificante de la enzima lipolítica. A modo de ejemplo, el péptido de señal puede ser el péptido de señal que es endógeno para la enzima lipolítica en *Aspergillus tubingensis*. Alternativamente, la secuencia codificante para el péptido de señal se puede obtener (o ser obtenible) de un gen de celobiohidrolasa de *Trichoderma reesei*.

Sin embargo, se puede usar cualquier secuencia codificante del péptido de señal capaz de dirigir la enzima lipolítica expresada en la ruta secretora de una célula de *Trichoderma reesei* de elección.

Cuando se hace referencia a mejorar uno o más de lo siguiente: expresión de la enzima lipolítica, glicosilación de la enzima lipolítica, actividad enzimática y/o rendimiento - esto se compara con métodos convencionales de expresión de esta enzima lipolítica. Por ejemplo, se proporciona una mejora de la expresión de la enzima lipolítica, la glicosilación de la enzima lipolítica, la actividad enzimática y/o el rendimiento en comparación con la producción de la enzima lipolítica en otro organismo hospedador (es decir un organismo hospedador distinto a *T. reesei*). En particular, existe una mejora de la expresión de la enzima lipolítica, la glicosilación de la enzima lipolítica, la actividad enzimática y/o el rendimiento de la enzima lipolítica por la presente descripción (es decir producida en la célula de *Trichoderma reesei*) en comparación con la expresión de la misma enzima lipolítica en una célula de *Aspergillus tubingensis* (por ejemplo, según se muestra en el documento WO98/45453).

El término "glicosilación mejorada", según se usa en la presente memoria, significa que, preferiblemente, la glicosilación se produce en N32 (cuando se numera usando SEQ ID N°: 8). Sin querer limitarse por una teoría, en algunas situaciones, la enzima lipolítica producida en células hospedadoras distintas a *T. reesei* (y particularmente en *Aspergillus tubingensis* (p. ej., según se muestra en el documento WO98/45453)) puede estar glicosilada (o sobreglicosilada), particularmente en N242. Por lo tanto, la enzima lipolítica producida en células hospedadoras distintas a *T. reesei* y particularmente en *Aspergillus tubingensis* (p. ej., según se muestra en el documento WO98/45453) pueden estar glicosiladas en los sitios tanto N32 como N242. Sin embargo, y sin querer limitarse por una teoría, el sitio N242 está en la proximidad de uno de los residuos de sitio activo, a saber His258 de SEQ ID N° 8. Así, se cree que la glicosilación (o sobreglicosilación) en el sitio N242 puede conducir a una actividad (es decir actividad de lipasa) reducida de la enzima. La enzima lipolítica de la presente descripción no tiene actividad reducida. La glicosilación de la enzima lipolítica de la presente descripción se puede producir en el sitio N32 que está alejado de los residuos de sitio activo, tales como His258.

El término "actividad enzimática mejorada", según se usa en la presente memoria, significa que la actividad es la misma o mayor que la actividad de lipasa de la enzima lipolítica producida naturalmente por *Aspergillus tubingensis*.

Por actividad enzimática se entiende al menos actividad de lipasa. La actividad enzimática (p. ej. actividad de lipasa) se puede medir usando los protocolos pertinentes indicados posteriormente en la sección de Ejemplos.

Se ha encontrado sorprendentemente que la enzima lipolítica producida según el método divulgado en la presente memoria es fácil de aislar del medio en el que se ha excretado - es decir el caldo de cultivo (fermentación) - ya que se obtienen altos niveles de expresión.

5 Así, el método puede implicar una o más de las siguientes etapas para el medio en el que la enzima lipolítica se ha secretado después del cultivo de la célula: diluir el medio (preferiblemente con agua); separar la célula o las células del medio; concentrar el medio (preferiblemente en donde dicho medio está libre de células); granular dicho medio (preferiblemente en donde dicho medio está libre de células).

10 El método también puede implicar las siguientes etapas para el medio en el que la enzima se ha secretado después del cultivo de la célula: diluir el medio (preferiblemente con agua); separar la célula o las células del medio; concentrar el medio (preferiblemente en donde dicho medio está libre de células); y opcionalmente granular dicho medio (preferiblemente en donde dicho medio está libre de células).

15 El método también implica opcionalmente someter a las siguientes etapas al medio al que se ha secretado la enzima después del cultivo de la célula: diluir el medio (preferiblemente con agua); separar la célula o las células del medio; concentrar el medio (preferiblemente en donde dicho medio está libre de células); y granular dicho medio (preferiblemente en donde dicho medio está libre de células).

Preferiblemente, el método implica las siguientes etapas para el medio al que se ha secretado la enzima después del cultivo de la célula: diluir el medio con agua; separar la célula o las células del medio; concentrar el medio en donde dicho medio está libre de células; y opcionalmente granular dicho medio en donde dicho medio está libre de células.

20 En un aspecto preferido, el método implica las siguientes etapas para el medio al que se ha secretado la enzima después del cultivo de la célula: diluir el medio con agua; separar la célula o las células del medio; concentrar el medio en donde dicho medio está libre de células; y granular dicho medio en donde dicho medio está libre de células.

25 Preferiblemente, la enzima lipolítica precipita de la solución en el caldo de fermentación. Preferiblemente, el precipitado de enzima lipolítica se resolubiliza mediante ajuste del pH. Preferiblemente, el pH se ajusta hasta un pH por encima del pH del caldo de fermentación.

Además de las ventajas mencionadas anteriormente, otra ventaja de la enzima producida mediante el método es que permite la producción a escala comercial de la enzima lipolítica. El método permite que la enzima lipolítica se produzca con un alto rendimiento.

30 Una ventaja de la enzima lipolítica divulgada en la presente memoria es que se ha encontrado sorprendentemente que es posible ir directamente desde la etapa de transformación y cribado (es decir de la placa de microvaloración) a una fermentación a gran escala (p. ej., una fermentación de al menos 14 litros). Sorprendentemente, esto es posible debido a que la etapa de cribado (particularmente los resultados de la placa de microvaloración) es altamente predictiva de un buen comportamiento en la fermentación a gran escala. Esto contrasta con métodos convencionales en los que a menudo es necesario cultivar la cepa en matraces antes de mover a una fermentación a mayor escala).
35 Esto tiene ventajas significativas para acortar el tiempo de producción y/o simplificar el procedimiento global y/o reducir costes.

40 Una ventaja adicional es que los métodos descritos en la presente memoria proporcionan una expresión potenciada/incrementada y/o un rendimiento mejorado de la enzima lipolítica en comparación con métodos convencionales para expresar esta enzima lipolítica. Por ejemplo, se proporciona una expresión potenciada/incrementada y/o un rendimiento mejorado de la enzima lipolítica en comparación con la producción de la enzima lipolítica en otro organismo hospedador (es decir un organismo hospedador distinto de *T. reesei*). En particular, hay una expresión incrementada y/o un rendimiento mejorado de la enzima lipolítica (es decir producida en la célula de *Trichoderma reesei*) en comparación con la expresión de la misma enzima lipolítica en una célula de *Aspergillus tubingensis* (por ejemplo según se muestra en el documento WO98/45453).
45

Una ventaja adicional es que la enzima lipolítica producida según los métodos divulgados en la presente memoria es fácil de producir y aislar y/o purificar y/o concentrar.

Una ventaja adicional es que la enzima lipolítica producida según el método divulgado es fácil de resolubilizar.

50 Una ventaja adicional es que la enzima lipolítica producida según el método divulgado se puede usar como un granulado o como una solución.

Enzima lipolítica

El término "enzima lipolítica", según se usa en la presente memoria, significa una enzima con actividad hidrolizante de triacilglicerol (clasificada como E.C. 3.1.1.3).

Adecuadamente, la enzima lipolítica para el uso en la presente invención puede exhibir una o más de las siguientes actividades adicionales: actividad de glicolipasa (E.C. 3.1.1.26), actividad de fosfolipasa A2 (E.C. 3.1.1.4), actividad de fosfolipasa A1 (E.C. 3.1.1.32) o actividad de fosfolipasa B (E.C. 3.1.1.5). El término "actividad de glicolipasa", según se usa en la presente memoria, abarca "actividad de galactolipasa".

5 Aislada

En un aspecto, preferiblemente, la enzima lipolítica para el uso en la presente invención es una forma aislada. El término "aislada" significa que la enzima lipolítica está al menos sustancialmente libre de al menos otro componente con el que la enzima lipolítica está asociada naturalmente en la naturaleza y según se encuentra en la naturaleza. El término "aislada" puede significar que la enzima lipolítica está al menos sustancialmente libre de al menos otro componente en el medio de cultivo en el que se produce. La enzima lipolítica de la presente descripción se puede proporcionar en una forma que está sustancialmente libre de uno o más contaminantes con los que la sustancia podría estar asociada de otro modo o con los que la enzima se puede producir.

Así, por ejemplo, puede estar sustancialmente libre de la célula o las células o uno o más polipéptidos y/o moléculas de ácido nucleico potencialmente contaminantes. La enzima lipolítica se puede aislar al separar la célula o las células del caldo durante o después de la fermentación de modo que la enzima lipolítica permanezca en el caldo. La enzima lipolítica se puede aislar al someter el caldo de fermentación a separación de células mediante filtración a vacío.

Purificada

En un aspecto, preferiblemente, la enzima lipolítica para el uso en la presente invención es una forma purificada. El término "purificada" significa que el componente dado está presente a un nivel alto. El componente es deseablemente el componente predominante presente en una composición. Preferiblemente, está presente a un nivel de al menos alrededor de 60%, o al menos alrededor de 65%, o al menos alrededor de 70%, o al menos alrededor de 75%, o al menos alrededor de 80%, determinándose dicho nivel sobre una base peso seco/peso seco con respecto a la composición total que se considera. Para algunas realizaciones, la cantidad es al menos alrededor de 85%, determinándose dicho nivel sobre una base peso seco/peso seco con respecto a la composición total que se considera.

Concentrado

En un aspecto, preferiblemente, la enzima lipolítica para el uso en la presente invención se usa como un concentrado. El concentrado puede ser una forma concentrada del medio al que se ha excretado la enzima. Preferiblemente, el concentrado puede ser una forma concentrada del medio al que se ha secretado la enzima y en el que la célula o las células se han retirado.

Materiales y métodos

1. Ensayo de lipasa a pH 5,5

Según se usa en la presente memoria, 1 LIPU (unidad de lipasa) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de H^+ por minuto bajo las condiciones descritas posteriormente en la presente memoria.

Se prepara sustrato de tributirina al 5% (v/v) al mezclar 15,00 ml de tributirina, 50,00 ml de agente emulsionante y 235 ml de agua destilada durante 20 s en un homogeneizador. El pH del sustrato se ajusta hasta aprox. 5,4 con NaOH 0,5 M.

El agente emulsionante se prepara al mezclar 17,9 g de NaCl, 0,41 g de KH_2PO_4 , 400 ml de agua destilada y 450 ml de glicerol en un vaso de precipitados de 2.000 ml. Bajo agitación vigorosa, añádanse 6,0 g de goma arábiga y continúese la agitación hasta que la goma arábiga se disuelva completamente. Transfírase la solución a un matraz volumétrico de 1.000 ml y llénese hasta la marca con agua destilada.

Para muestras secas: en un matraz volumétrico, disuélvase una cantidad de enzima calculada para dar una solución final de aproximadamente 3,5 LIPU/ml en la mitad de la dilución final y sométase a agitación magnética durante 20 min.

Después de remover, ajústese hasta la dilución final con agua destilada. Cualquier dilución adicional se debe hacer con agua destilada. Las muestras en solución se diluyen directamente en agua destilada

25,00 ml de sustrato se ajustan hasta 30,0°C.

Ajústese el pH del sustrato hasta 5,50 con NaOH/HCl

Mientras se remueve, añádanse 2,00 ml de muestra, e iníciase inmediatamente el valorador pH-estático.

Deténgase la valoración después de 6 minutos.

Calcúlese la pendiente de la curva de valoración. La pendiente de la curva de valoración se calcula a partir de datos entre 3 y 6 min. La pendiente debe estar en el intervalo 0,1-0,2 ml/min.

La actividad (LIPU/g) de la enzima se calcula usando lo siguiente:

$$\text{LIPU/g} = \frac{\text{ml/min.} \times N \times 1000 \times F \times \text{factor para tributirina}}{A \times 2}$$

5 ml/min.: Pendiente de la curva de valoración

N: Normalidad de NaOH

F: Dilución de la muestra

A: Muestra pesada en gramos

2: ml de muestra

10 2. Actividad de lipasa a pH 3,5

1 LPLU (unidad de lipasa a pH bajo) se define como la cantidad de enzima que produce 1 microequivalente de ácido graso libre por min. bajo las condiciones descritas posteriormente en la presente memoria.

Sustrato de trioctanoato: 0,15% de trioctanoato de glicerol, 13% de Triton X-100, 0,3% de NaCl y glicina-HCl 120 mM, pH 3,5. Los sustratos se prepararon al mezclar todos los componentes seguido por remoción durante una hora.

15 La solución de muestra de enzima se diluye en HCl de glicina 50 mM, pH 3,5

El ensayo se lleva a cabo usando un robot de análisis Konelab (Thermo, Vantaa, Finlandia). 50 µl de sustrato de trioctanoato se equilibran a 30°C durante 3 min. antes de mezclar con 10 µl de solución de muestra de enzima e incubación durante 6 min. a 30°C. El ácido graso libre en la mezcla de reacción se midió usando el estuche NEFA-HR(2) (WAKO Chemicals GmbH). Se añaden a la mezcla de reacción 110 µl de reactivo NEFA R1 y se incuban durante 3 min. a 30 °C antes de que se añadan 55 µl de reactivo NEFA R2. La incubación se continúa durante otros 4,5 min. a 30°C antes de que se mida la OD_{520 nm}. El contenido de ácido libre se calcula a partir de una curva estándar preparada a partir de NEFA Standard (WAKO Chemicals GmbH).

1 LPLU corresponde a 0,24 LIPU para lipasa de *Aspergillus tubingensis* (Fig. 5, SEQ ID N° 7).

2. Ensayo de fitasa.

25 Según se usa en la presente memoria 1 FTU (unidad de fitasa) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 µmol de ortofosfato inorgánico a partir de un sustrato en un minuto bajo las condiciones de reacción definidas en la presente memoria

Principio:

30 La fitasa se incuba con fitato sódico, lo que da como resultado la liberación de fosfato inorgánico. El fosfato inorgánico crea complejos coloreados con el reactivo de molibdato-vanadato, que de ese modo se vuelve amarillo. El color amarillo del complejo se mide en el espectrofotómetro a 415 nm.

La cuantificación de la actividad se realiza mediante un método absoluto usando una curva estándar de fosfato.

Reactivos:

1.1 Tampón de acetato (pH 5,5) 0,25 M 1.000 ml

Disuélvanse:

35 30,02 g de trihidrato de acetato sódico (18,10 g de anhidrato de acetato sódico),

0,147 g de dihidrato de cloruro cálcico,

1,76 g de ácido acético al 100% (=1,677 ml, densidad = 1,0498 g/ml) en ap. 900 ml de agua,

Ajustese el pH hasta 5,5 con ácido acético 4 M (22,9 ml de ácido acético concentrado en 100,0 ml de agua desionizada) y transfírase la solución a un matraz volumétrico de 1.000 ml.

40 Añádase 1 ml de Tween 20 al 10% y ajústese la solución hasta 1.000 ml mediante la adición de agua desionizada.

1.2 Dihidrogenofosfato potásico

18 mM

1.000 ml

Solución madre usada para la curva estándar

Séquese KH_2PO_4 a 60°C durante la noche en un armario calentador.

Pésense 2,45 g de KH_2PO_4 seco y dilúyanse en tampón de acetato (1.1). Ajústese hasta 1.000,0 ml.

1.3 Solución de fitato (sustrato)

7,5 mM

250 ml

Disuélvanse:

- 5 2,10 g ($\pm 0,05$ g) de decahidrato de fitato sódico (ácido fítico) en 200 ml de tampón de acetato. Termostátices la solución hasta 37°C en un baño de agua.

A 37°C, el pH se ajusta hasta pH 5,5 mediante la adición de ácido acético 4 M (24 g = 22,9 ml de ácido acético concentrado en 100,0 ml de agua desionizada).

Ajústese hasta 250,0 ml mediante la adición de tampón de acetato.

- 10 Puede ser necesario un factor de corrección para el sustrato cuando se cambia por otro lote de ácido fítico. El factor de corrección para ácido fítico Sigma P0109, partida 057K0049 se define para 1,00

1.4 Solución de ácido nítrico 24,5 %

200 ml

(Para solución de vanadato amónico)

Se añaden 75 ml de ácido nítrico (65%) a 100 ml de agua bajo agitación continua.

La solución se transfiere a un matraz volumétrico de 200 ml y se ajusta con agua desionizada.

1.5 Solución de amonio 25%

50 ml

- 15 (Para solución de heptamolibdato amónico)

40 ml de una solución de amonio al 32% se ajustan hasta 50 ml con agua.

1.6 Solución de heptamolibdato amónico 10%

250 ml

(Para el reactivo de color/parada)

Disuélvanse:

- 20 25 g de tetrahidrato de heptamolibdato amónico en 225 ml de agua. La solución necesita calentarse para disolver el heptamolibdato amónico antes de añadir la solución de amonio. Añádanse 2,5 ml de solución de amonio (25%) (véase 1.5), córtese el calor y déjese en el agitador hasta que se disuelva totalmente.

Cuando se enfría, la solución se transfiere a un matraz volumétrico de 250 ml, se ajusta con agua desionizada y se mezcla.

1.7 Solución de vanadato amónico 0,24%

250 ml

(Para el reactivo de color/parada)

- 25 Disuélvanse 0,5875 g de vanadato amónico en 100 ml de agua precalentada hasta 60°C. Añádanse lentamente 5 ml de solución de ácido nítrico al 24,5% bajo agitación continua.

Cuando la solución se enfría, se transfiere a un matraz volumétrico de 250 ml, se ajusta con agua desionizada y se mezcla.

1.8 Reactivo de color/parada

200 ml

Se debe preparar inmediatamente antes del uso.

- 30 Descárguense 50 ml de solución de heptamolibdato amónico (10%) en un matraz volumétrico de 200 ml seguido por 50 ml de solución de vanadato amónico (0,24%). Descárguense 33 ml de ácido nítrico al 65% bajo agitación continua. Ajústese hasta 200,0 ml mediante la adición de agua desionizada y mézclese.

Condiciones de reacción

pH = 5,5
 Temperatura de incubación = 37°C ± 0,1°C
 Tiempo de incubación = 60 minutos

Preparación de una curva estándar de fosfato (método absoluto)

Se prepara una curva estándar usando el tampón de KH₂PO₄ (1.2). El patrón se diluye con tampón de acetato.

C_{dilución} = 0,0 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM, 3,0 mM, 4,0 mM

5 Úse la siguiente ecuación:

$$C_{\text{solución madre}} * V_{\text{solución madre}} = C_{\text{dilución}} * V_{\text{dilución}}$$

$$V_{\text{solución madre}} = (C_{\text{dilución}} * V_{\text{dilución}}) / C_{\text{solución madre}}$$

Donde C = concentración y V = volumen

Concentración de fosfato final en mM	volumen de KH ₂ PO ₄ (18 mM) en un matraz volumétrico de 50 ml	Volumen del tampón de acetato
0	0,0 ml	50,0 ml
0,5	1,4 ml	48,6 ml
1,0	2,8 ml	47,2 ml
1,5	4,2 ml	45,8 ml
2,0	5,6 ml	44,4 ml
2,5	6,9 ml	43,1 ml
3,0	8,3 ml	41,7 ml
4,0	11,1 ml	38,9 ml

10 1,00 ml de muestra para la curva estándar se mezcla con 2,00 ml de reactivo de color/parada seguido por 2,00 ml de solución de fitato. Las muestras se incuban a temperatura ambiente durante 5-10 minutos, y la OD se midió (como se hace con las muestras después de la incubación).

Preparación de muestras:

- 1A: Productos líquidos (apr. 5.500 FTU/g): 1 g de muestra se pesa en un matraz volumétrico de 100 ml, el peso se anota y el matraz volumétrico se rellena con tampón de acetato.
- 15 1B: Productos secos (fitasa formulada solamente sobre portador de trigo / almidón): 1 g de producto se pesa en un vaso de precipitados de vidrio. Se añaden 100 ml de tampón de acetato usando un vaso dispensador o medidor. La muestra se remueve en un agitador magnético durante 20 minutos. El extracto se filtra a través de un filtro de vidrio.
- 20 1C: Productos secos (gránulos revestidos con una sobrecapa hidrófoba): Productos secos: 1 g de producto se pesa en un vaso de precipitados de vidrio. Se añaden 100 ml de tampón de acetato usando un vaso dispensador o medidor. La muestra se remueve en un agitador magnético durante 20 minutos. El extracto se deja sedimentar, el producto revestido no se debe filtrar a través de un filtro de vidrio.
- 25 2: Prepárese la dilución adicional de la muestra. El intervalo de OD preferido es 0,4 -1,6. Si no se sabe la concentración de la muestra, niveles de diluciones típicos para llevar la actividad dentro del intervalo para el ensayo se muestran posteriormente.

La actividad en las muestras debe ser aproximadamente 0,0300 U/ml.

Las diluciones se deben preparar inmediatamente antes de la determinación.

Determinación de la actividad:

30 Todas las muestras se analizan al mismo tiempo - controles, blancos y muestras. La prueba de ensayo debe ser en un flujo continuo.

Todas las determinaciones se realizan como determinaciones dobles o triples.

Un blanco se incluye al principio de cada serie.

Un control se incluye en cada serie de tubos (control de fitasa o muestra de Phyzyme XP de actividad conocida).

- 5 Muestras enmascaradas: 1,00 ml de cada muestra se mezcla con 2,00 ml de reactivo de color/parada seguido por 2,00 ml de solución de fitato. Las muestras se incuban a temperatura ambiente durante 60 minutos, se centrifugan y se miden con el resto de las muestras.

Muestras:

1. Extráigase 1,00 ml de muestra diluida o control 2 o 3 veces en tubos de plástico. Para los blancos, extráigase 1,00 ml de tampón de acetato.
- 10 2. Póngase la solución de fitato (sustrato) en un baño de agua a 37,0°C durante un mínimo de 5 minutos hasta que se equilibre hasta 37°C.
3. Incúbense las muestras en el baño de agua a 37,0°C durante exactamente 5 minutos.
4. Añádanse 2,00 ml de solución de fitato equilibrada a las muestras con un intervalo de tiempo de exactamente 5 segundos.
- 15 5. Incúbase en el baño de agua a 37,0°C durante exactamente 60 minutos.
6. Añádanse 2,00 ml de reactivo de color/parada, de nuevo con un intervalo de tiempo de 5 segundos, colóquese una tapa e inviértase 5 veces.
7. Centrifúguese durante 10 min. a 3.500 rpm.
8. Mídase a 415 nm. Ajústese el espectrofotómetro hasta cero con agua desmineralizada.

- 20 Cálculo de la actividad

La OD del blanco tiene que ser $\leq 0,13$; si no el análisis se tiene que repetir.

Escríbanse los datos en una hoja de Excel

Elabórese una curva estándar y una línea de tendencia en Excel:

- a) eje y = OD_{415}
- 25 b) eje x = mM de fosfato
- c) la pendiente (α) tiene que estar dentro de 0,36-0,38
- d) la intersección (β) no debe superar $|0,02|$
- e) el coeficiente de correlación (R^2) debe ser $\geq 0,99$

La actividad de fitasa se calcula como sigue:

$$\text{Actividad (FTU/g)} = \frac{((OD_{\text{muestra}} - OD_{\text{blanco}}) - \beta) * DF}{\text{Tiempo de incubación} * \alpha * W_{\text{muestra}}}$$

- 30

OD muestra = absorbancia media de la muestra enzimática

OD blanco = absorbancia media del blanco enzimático

DF = factor de dilución para la muestra

Tiempo de incubación = 60 minutos

- 35 W_{muestra} = peso de la muestra o el control

α = Pendiente de la curva estándar

β = Intersección de la curva estándar

Ensayo de fitasa a pH 3,5:

Este es idéntico al ensayo de fitasa a pH 5,5 con las siguientes sustituciones:

1.1 Tampón de ensayo, tampón de HCl de glicina pH 3,5 (usado en lugar del 1.1 tampón de acetato pH 5,5):

- 5 Se mezclan 250 ml de glicina 0,2 M con 130 ml de HCl 0,2 M y apr. 500 ml de agua desionizada. El pH se ajusta hasta 3,5 con HCl 0,5 M o NaOH 0,5 M. Transfírase la solución a un matraz volumétrico de 1.000 ml y ajústese la solución hasta 1.000 ml mediante la adición de agua desionizada

1.3 Solución de fitato (sustrato) 7,5 mM (en 250 ml totales):

Disuélvanse 2,10 g ($\pm 0,05$ g) de decahidrato de fitato sódico (ácido fítico) en 200 ml de tampón de ensayo (tampón de HCl de glicina pH 3,5).

- 10 Termostatícese la solución hasta 37°C en un baño de agua.

A 37°C, el pH se ajusta hasta pH 3,5 mediante la adición de HCl 4 M o NaOH 4 M.

Ajústese hasta 250,0 ml mediante la adición de tampón de ensayo (pH 3,5). La botella que contiene la solución necesita envolverse en papel de aluminio.

Vida útil: dos semanas

- 15 Puede ser necesario un factor de corrección para el sustrato cuando se cambia a otro lote de ácido fítico. El factor de corrección para la partida de ácido fítico 128H1234 (Sigma P-3168) se define para 1,00

Todas las diluciones de las enzimas y el fosfato en el método se realizan con tampón de ensayo de HCl de glicina, pH 3,5, en lugar de tampón de acetato, pH 5,5.

Ejemplos

- 20 Ejemplo 1 - Introducción

Para ser eficaz como un aditivo enzimático para alimentos o piensos, la fitasa tiene que combinar un número de propiedades diferentes. A fin de poder degradar el ácido fítico en el entorno ácido del estómago de un animal, tiene que ser activa a pH bajo, preferiblemente a lo largo de un amplio intervalo de valores de pH. Además, tiene que tener alta actividad específica y preferiblemente alta termoestabilidad para permitir que la proteína soporte las altas temperaturas comúnmente usadas en la preparación de comidas para animales tales como nódulos de pienso.

- 30 También es importante que la enzima tenga amplia especificidad para sustrato permitiéndola hidrolizar no sólo fitato sino también productos intermedios de la degradación de fitato tales como pentafofosatos, tetrafofosatos y trifosfatos de inositol. Estudios sobre la degradación de fitato en cerdos muestran que estos oligofosfatos de inositol permanecen de otro modo principalmente insolubles en el intestino delgado y grueso y así inaccesibles a fosfatasa alcalinas producidas por el animal y la microflora intestinal. Se han identificado variaciones en los perfiles de especificidad para sustratos de diferentes enzimas. Por ejemplo, los trifosfatos de inositol generados por la fitasa procedente de *B. subtilis* son esencialmente resistentes a la hidrólisis adicional por esta enzima.

- 35 Adecuadamente, estas variantes muestran características mejoradas con respecto a una cualquiera de los siguientes: estabilidad a la temperatura, intervalo de pH, estabilidad a pepsina, actividad específica, especificidad para el sustrato y especificidad para el sustrato más amplia. Métodos adecuados para determinar estas características se divulgan en la presente memoria.

- 40 En particular, las mejoras en las características de la fitasa se dirigen a la estabilidad de la enzima bajo condiciones de procesamiento de alimentos y piensos, a la estabilidad de la enzima durante el tránsito estomacal y a la actividad y estabilidad de la enzima en el estómago y/o el tracto intestinal de un ser humano o un animal, que hacen a las variantes mejoradas particularmente adecuadas para el uso como complementos para piensos. Así, tales mejoras comprenden entre otros parámetros el incremento en la estabilidad a temperaturas elevadas, preferiblemente a temperaturas por encima de 65°C, el incremento en la estabilidad frente a la digestión proteolítica, preferiblemente una proteasa del tracto digestivo tal como pepsina, el incremento en la actividad catalítica a pH bajo, preferiblemente la actividad catalítica por debajo de pH 5,5, y la eficacia general para liberar grupos fosfato del fitato y preferiblemente además fosfatos de inositol.

- 50 Las mejoras en las características de la fitasa se dirigen al uso en el procesamiento de alimentos y piensos así como al uso como un aditivo para productos para alimentos y piensos. En particular, las mejoras se dirigen a la estabilidad bajo condiciones de procesamiento de alimentos y piensos, a la estabilidad durante el tránsito estomacal y a la actividad y la estabilidad en el estómago y/o el tracto intestinal de un ser humano o un animal. Tales mejoras comprenden entre otros parámetros el incremento en la estabilidad a temperaturas elevadas, preferiblemente a temperaturas por encima de 65°C, el incremento en la estabilidad frente a la digestión proteolítica, preferiblemente

una proteasa del tracto digestivo, el incremento en la actividad catalítica a pH bajo, preferiblemente la actividad catalítica por debajo de pH 5,5, y la eficacia general para liberar grupos fosfato del fitato.

El incremento en la estabilidad a temperaturas elevadas se cuantifica mediante la temperatura de inactivación de la enzima. La temperatura de inactivación se define como la temperatura a la que la actividad residual de una enzima fitasa después de la incubación durante un cierto tiempo y el enfriamiento posterior hasta temperatura ambiente es 50% de la actividad residual de la misma enzima fitasa incubada durante el mismo tiempo bajo las mismas condiciones a temperatura ambiente. Las diferencias de termoestabilidad son las diferencias en °C entre las temperaturas de inactivación de dos enzimas.

Ejemplo 2. Estabilidad frente a pepsina

- 10 La resistencia a pepsina a pH 2 de fitasas de *Buttiauxella*, variantes BP-17, BP-110, BP-111, BP-112, y Phyzyme XP se comparó con Natuphos (BASF) y Ronozyme P (Novozymes/DSM).

Materiales y métodos

Tampones:

- 15 Tampón de incubación en pepsina: HCl de glicina 0,1 M, pH 2,0, 3 mg/ml de BSA, 2,9 mg de cloruro sódico anhidro/ml, 0,73 mg de cloruro cálcico/ml. Para soluciones con pepsina, el tampón de incubación se prepara para que contenga 500, 1.000, 3.000, 6.000 o 10.000 U/ml de pepsina (Sigma P-7.000, 10.000 U/mg corresponden a 27 mg/ml), respectivamente. Una unidad de pepsina se define como la cantidad de enzima que producirá una ΔOD_{280} de 0,001 por min. a pH 2,0 a 37°C, medida como productos solubles en TCA usando hemoglobina como sustrato (Food Chemical Codex).

- 20 Tampón de ensayo de fitasa: tampón de acetato 250 mM, pH 5,5

Tampón de ensayo de fitasa con BSA: tampón de acetato 250 mM, pH 5,5, con 3 mg/ml de BSA

Resistencia frente a una concentración de pepsina creciente:

- 25 Los ajustes para todas las enzimas eran los mismos: Se prepararon seis muestras con enzima (por duplicado): Cuatro muestras con cantidad creciente de pepsina en tampón (pH 2), una muestra sin pepsina pero en tampón de incubación (pH 2), y una muestra de control positivo con enzima en tampón de ensayo con BSA (pH 5,5).

- 30 Para cada muestra, 900 µl de tampón de incubación sin o con cantidades crecientes de pepsina o 900 µl de tampón de ensayo se mezclaron con 100 µl de solución de enzima seguido por incubación a 40°C. Después de 120 min. de incubación, se extrajeron 100 µl y se mezclaron con 900 µl de tampón de ensayo. Las muestras se analizaron inmediatamente con respecto a la fitasa a pH 5,5 frente a una curva estándar de fosfato según se describe por el borrador de estándar internacional de la ISO ISO/DIS 30024.

Resultados

Resistencia a pepsina

- 35 Las variantes de *Buttiauxella* mostraban todas una excelente estabilidad hacia pepsina a pH 2. En contraste, la actividad de Natuphos se redujo drásticamente ya con una concentración de pepsina de 500 U/ml, con una actividad reducida adicional que encuentra una meseta de alrededor de 45% de recuperación a una concentración de pepsina 3.000 U/ml. La recuperación de Ronozyme P era aún peor con una reducción en la recuperación de menos de 20% a una concentración de pepsina de solo 500 U/mg (Fig 9A).

- 40 La Figura 9 muestra la resistencia de las fitasas que se originan a partir de *Buttiauxella*, variantes BP-17, BP-110, BP-111 y BP-112, y de Phyzyme XP, Natuphos y Ronozyme P frente a concentraciones crecientes de pepsina. Los datos son relativos a la incubación a pH 2 sin pepsina. A: todos los puntos de datos, B: los mismos datos pero mostrando solamente más de 70% de recuperación.

Tabla 1. Los mismos datos que se presentan en la Fig. 9

Nivel de pepsina	BP-17	BP-17 v. 110	BP-17v. 111	BP-17v. 112	Phyzyme XP	Natuphos	Ronozyme P, new
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
500	87%	96%	98%	85%		61%	19%
1.000	81%	98%	96%	85%		51%	16%
3.000	82%	96%	94%	84%	93%	44%	17%

Nivel de pepsina	BP-17	BP-17 v. 110	BP-17v. 111	BP-17v. 112	Phyzyme XP	Natuphos	Ronozyne P, new
6.000	82%	92%	89%	80%	89%	45%	18%
10.000	86%	95%	94%	79%	98%	46%	21%

Existen ligeras diferencias entre las variantes de *Buttiauxella*, donde la variante BP-17 var. 110 muestra la mejor estabilidad, permaneciendo 95% de actividad después de dos horas de incubación a la concentración de pepsina más alta, 10.000 U/ml (Fig. 9B). En comparación, BP-17 mostraba una recuperación de cerca de 85% después de dos horas de incubación.

- 5 Las fitasas de *Buttiauxella* también mostraban excelente estabilidad a los ácidos. Comparar la actividad medida a pH 5,5 después de dos horas de incubación bien a pH 2 o bien a pH 5,5 mostraba que ninguna de las cuatro fitasas de *Buttiauxella* perdía actividad durante la incubación de 2 horas a pH 2, mientras que Phyzyme XP, Natuphos y la nueva Ronozyme P mostraban una reducción de ligera a significativa en la actividad (Tabla 2).

- 10 Tabla 2. La actividad medida a pH 5,5 después de la incubación en un tampón a pH 2 o pH 5,5 durante dos horas. Los números son relativos a la actividad procedente de las muestras incubadas a pH 5,5.

	BP-17	BP-17 v. 110	BP-1 v.111	BP-17 v. 112	Phyzyme XP	Natuphos	Ronozyne P, nueva
Tampón de ensayo	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
pH 2, sin pepsina	101%	102%	106%	120%	83%	90%	67%

Compendio de datos

Las variantes de fitasa de *Buttiauxella* según la presente descripción muestran más de 75% de recuperación después de 2 horas de incubación a pH 2, 37°C, 10.000 U/ml de pepsina en comparación con la actividad de la muestra incubada bajo la misma condición pero sin pepsina presente.

- 15 Ejemplo 3. Recuperación de la actividad enzimática

Evaluación de la recuperación de la actividad enzimática

Materiales y métodos

- 20 Aquí se evaluó la recuperación de la actividad enzimática después de la nodulización de la enzima formulada con trigo. La enzima se pulveriza sobre trigo granulado y se seca antes de mezclar con el pienso seguido por el procedimiento de nodulización.

- 25 Se formularon enzimas líquidas sobre trigo triturado y se secaron hasta un contenido de materia seca de aproximadamente 90%. La inactivación de enzimas durante el estrés térmico en el procedimiento de nodulización se probó usando una unidad de nodulización en the Technological Institute in Kolding (presentada esquemáticamente en la Figura 10). La muestra de prueba se añade a 10 kg de premezcla y se mezcla durante 10 min. A continuación, 10 kg de premezcla se añadieron a 150 kg de pienso (mezclador horizontal grande) y se mezclaron durante 15 min. antes del acondicionamiento/tratamiento con vapor de agua. El pienso se trata 30 s a 90°C/95°C antes de la nodulización. La temperatura se mide a la salida del mezclador de cascada. Inmediatamente después de abandonar la prensa de nodulización, los nódulos se enfrían hasta temperatura ambiente.

La actividad de fitasa se midió según la metodología citada en la presente memoria.

- 30 La actividad de fitasa es 5 unidades por g en el pienso en forma de pasta antes de la nodulización.

Resultados

Los resultados se presentan en las Figuras 11 a 13.

- 35 En la Figura 11, se divulgan los resultados de las pruebas de nodulización de tres variantes de fitasa B según la presente descripción. Las enzimas se formularon sobre trigo integral triturado y se secaron hasta un contenido de agua de apr. 10%. Aquí, la recuperación de la actividad de fitasa después de nodulizar para BP 17 var 111 es 90% a 90°C en comparación con una recuperación de 19% a 90°C para la BP 17.

Como referencia, la Phyzyme XP, una fitasa de *E coli*, se formuló sobre trigo integral triturado. Los resultados se muestran en la Figura 12. Aquí, la recuperación de la actividad de fitasa después de nodulizarse a 90°C a partir de tres partidas de Phyzyme XP formuladas sobre trigo integral triturado es 47%.

- 5 También se probó Ronozyme. El producto se vende en una versión revestida, para proteger a la enzima del calor en el procedimiento de nodulización. En esta prueba, la fitasa se extrajo del producto revestido y se formuló sobre trigo integral triturado para estudiar la termoestabilidad de la molécula de fitasa sin protección. Los resultados se muestran en la Figura 13.

Compendio de datos

- 10 Las variantes de fitasa de *Buttiauxella* fitasa de la presente descripción formuladas sobre trigo muestran más de 70% de recuperación después de nodulizarse a 90°C.

Ejemplo 4. Degradación de ácido fítico

Resultados de un estudio de degradación de ácido fítico por fitasa

Soluciones

Se usaron tres tampones diferentes en las incubaciones. Eran como sigue:

- 15 acetato 250 mM pH 5,5;
acetato M 250 mM pH 3,5; y
HCl glicina 250 mM pH 2,5.

Todas las fitasas usadas en las incubaciones se diluyeron en tampón de ensayo hasta un nivel de enzima de 1 U/ml.

La solución de sustrato de fitato usada en la incubación es un fitato al 1% (1 g/100 ml de tampón).

- 20 El sustrato se prepara en el mismo tampón que se usó para la dilución de fitasas para mantener el nivel de pH constante en la reacción.

La reacción se termina mediante HCl 1 M.

Incubación

- 25 Los volúmenes de incubación son: 1,5 o 3,0 ml de fitato + 0,25 ml en enzima + 3,25 o 1,75 ml de tampón a 37°C, un volumen total de 5,0 ml.

Se toman submuestras de 0,5 ml en diferentes momentos (0, 30, 60 y 90 min).

Se prepara un tubo de Eppendorf con 0,2 ml de HCl 1 M para cada submuestra antes del submuestreo. Al combinar la submuestra procedente de la incubación con HCl, la reacción enzimática se termina. Cada submuestra de 0,7 ml se almacena a 4°C hasta el análisis por HPLC.

- 30 Método de HPLC

Análisis de fitato e isómeros de inositol mediante cromatografía iónica de alta resolución (HPIC, por sus siglas en inglés). Este método ha sido descrito por Skoglund y Carlsson et al. (J. Agric. Food Chem., 45(1997), 451-436 5. J. Agric. Food Chem., 46 (1998), 1877-1882; y J. Agric. Food Chem., 49(2001), 11695-1701. La columna usada era un intercambiador aniónico fuerte (4 x 250 mm) de Dionex con una precolumna de 4 x 50 mm. Disolvente A, agua MilliQ, Disolvente B, HCl 1 N preparado en agua. El gradiente es de 2,5% a 49% de B en 30 min. seguido por 3 min. isocráticos a 50% y 2 min. isocráticos a 2,5% a un flujo de 0,8 ml/min. Cada recorrido es de 35 min. Es posible reducir el recorrido a 25 min. totales ya que la fitasa no produce demasiados de los isómeros de IP teóricamente posibles. El eluyente se derivó en línea con una solución acuosa que contenía 0,1% de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y 2% de ácido perclórico (HClO_4) a un flujo de 0,4 ml/min. El fitato y los isómeros de IP se detectaron a 290 nm como un pico positivo. Esto se debe a la formación de complejo de fitato- Fe^{3+} - ClO_4^- . Una solución de ácido perclórico de 60% se compró de Sigma.

- 40 Resultados

Los resultados se presentan en las Figuras 14-17.

Compendio de datos

- 45 Todas las enzimas de la presente descripción presentan características favorables.

Las fitasas de la presente descripción disocian el fitato a todos los niveles de pH probados.

Las enzimas de la presente descripción son muy activas a pH 5,5.

BP 110 y BP 111 presentan una actividad similar a pH 2,5 y 3,5.

5 BP 110 y BP 111 disocian todo el fitato añadido a las incubaciones después de 90 min. tanto a pH 2,5 como a pH 3,5

BP112 disocia 75% del fitato añadido a las incubaciones después de 90 min. tanto a pH 2,5 como a pH 3,5

Las enzimas de la presente descripción presentan mejores características que Ronozyme y Natuphos a pH 2,5 (véase al menos la Figura 17) (La concentración de enzima es superior a la observada en las Figs 14-16, de modo que *Buttiauxella* BP17 está como referencia.)

10 Ejemplo 5. Hidrólisis de ácido fítico en un licuefacto

Determinación de ácido fítico:

15 Contenido de ácido fítico: El ácido fítico se extrajo de una muestra al ajustar el pH de la suspensión al 5% (si es una muestra seca) hasta pH 10 y a continuación determinar mediante un método de HPLC usando una columna de intercambio de hierro. El ácido fítico se eluyó de la columna usando un sistema de gradiente de NaOH. A continuación, se calculó el contenido de ácido fítico en el líquido al comparar con un patrón de ácido fítico.

Resultados

Se estudió el efecto de la temperatura sobre la hidrólisis de ácido fítico del licuefacto de maíz integral triturado a partir de un procedimiento de licuefacción con trituración en seco convencional (fuente: Illinois River Energy, Monroe, Illinois) mediante diferentes fitasas variantes de BP termoestables, es decir, BP110, BP111 y BP112. El pH de un licuefacto de maíz sólido seco de 32% de maíz integral triturado sólido seco se ajustó hasta pH 5,0 y se puso en un baño de agua mantenido a 85°C y 89°C. Después del equilibrado de la temperatura, se añadió fitasa de BP en 4,0 FTU/g de maíz ds. Se tomaron muestras a los 20 minutos y la reacción enzimática se terminó mediante la adición de hidróxido sódico 10 mM (diluido de 1 a 10 veces). A continuación, las muestras diluidas se filtraron y se analizaron mediante HPLC con respecto a su perfil de derivados de fitato (IP1 a IP6). Los cromatogramas de HPLC en las Figuras 18 y 19 mostraban claramente que la fitasa procedente de las tres variantes catalizaba la hidrólisis de ácido fítico a una temperatura mayor de 85°C. El contenido de ácido fítico (ácido fítico (IP6) y productos intermedios IP1 a IP5) en licuefacto de maíz integral triturado está cerca de 1,7% de maíz ds y los datos de la Figura 18 mostraban que más de 95% del ácido fítico era hidrolizado por fitasa termoestable bajo las condiciones de licuefacción normales. Significativamente, el perfil de HPLC de las muestras incubadas a 89°C mostraba que la variante de fitasa BP-111 exhibía una termoestabilidad superior en comparación con fitasa procedente de otras variantes (véase la Figura 19; BP-110 y BP-112).

Ejemplo 6

Expresión de la lipasa 3 de *Aspergillus tubingensis* en *Trichoderma reesei*

1. Construcción de expresión y cepa usada para la transformación

35 Se usó ADN del plásmido pDONR™221 obtenido de Invitrogen (Nº catálogo 12536-017) como el vector donante. pDONR221::lip 3 que contenía el ADN genómico de lipasa 3 de *Aspergillus tubingensis* (Figura 20) se recombinó en el vector de destino Gateway de *T. reesei* pTrex3G (descrito con detalle en el documento WO 05/001036), dando como resultado la construcción de expresión final ATlipasa3Trex (Figura 21).

40 El casete de expresión contenía las regiones promotora y terminadora del gen de celobiohidrolasa 1 (cbh1) de *T. reesei*. También contenía el gen amdS de acetamidasa de *Aspergillus nidulans* como un marcador seleccionable para la transformación de *T. reesei*.

El ADN genómico de lipasa 3 de *Aspergillus tubingensis* codifica una enzima lipolítica lipasa 3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID Nº 7.

45 El término "lipasa 3", cuando se usa en la presente memoria, se refiere a una enzima lipolítica que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID Nº 8, tal como la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID Nº 7. SEQ ID Nº 7 contiene la secuencia de señal y SEQ ID Nº 8 es la proteína de lipasa madura sin la secuencia de señal.

50 La cepa usada para la transformación era *Trichoderma reesei*, un derivado de la cepa no GMM RL-P37 de la que se han eliminado los genes que codifican las dos celobiohidrolasas secretadas, CBHI y CBHII, y dos de las endoglucanasas secretadas, EGI y EGII.

El vector de expresión pTrex3g.

Lo siguiente describe la construcción del vector pTrex3g que se puede usar para expresar los genes de la presente descripción.

Este vector se basa en el vector de *E. coli* pSL1180 (Pharmacia Inc., Piscataway, NJ, EE.UU. de A.) que es un vector basado en el fagémido pUC118 (Brosius, J. (1989) DNA 8:759) con un sitio de clonación múltiple extendido que contiene secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción de 64 hexámeros. Se diseñó como un vector de destino Gateway (Hartley, J.L., Temple, G.F. y Brasch, M.A. (2.000) Genome Research 10:1788-1795) para permitir la inserción usando tecnología Gateway (Invitrogen) de cualquier marco de lectura abierto deseado entre las regiones promotora y terminadora del gen *cbh1* de *T. reesei*. También contiene el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* para el uso como un marcador seleccionable en la transformación de *T. reesei*.

Los detalles de pTrex3g son como sigue. El vector tiene un tamaño de 10,3 kb.

Insertados en la región policonectora de pSL1180 están los siguientes segmentos de ADN:

1. Un segmento de 2,2 pb de ADN procedente de la región promotora del gen *cbh1* de *T. reesei*
2. El casete del marco de lectura A Gateway de 1,7 kb adquirido de Invitrogen que incluye los sitios de recombinación attR1 y attR2 en cualquier extremo que flanquee el gen de resistencia a cloranfenicol (CmR) y el gen *ccdB*
3. Un segmento de 336 pb de ADN procedente de la región terminadora del gen *cbh1* de *T. reesei*
4. Un fragmento de 2,7 kb de ADN que contiene el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* con sus regiones promotora y terminadora naturales.

2. Transformación de cepa hospedadora con eliminación cuádruple de *T. reesei*

La construcción de expresión, ATlipasa3Trex, que contiene el gen de lipasa 3 de *A. tubingensis* se transformó en una cepa de *T. reesei* usando electroporación o transformación biolística mediante bombardeo de partículas usando el sistema PDS-1000 Helium (Nº Cat. BioRad 165-02257). Los productos de PCR que contenía solo ADN fúngico o todo el plásmido de expresión se usaron para generar transformantes mediante transformación biolística y electroporación.

A. Transformación mediante electroporación

La cepa hospedadora de *T. reesei* que se iba a transformar se hizo crecer hasta la esporulación completa sobre placas de PDA durante 5 días. Las esporas de 2 placas se recogieron con sorbitol 1,2 M y se filtraron a través de Miracloth para deshacerse del agar. Las esporas se transfirieron a un tubo de Falcon de 50 ml y se lavaron mediante centrifugación repetida 5-6 veces con 50 ml de agua. Las esporas se resuspendieron en un pequeño volumen (menos de 2x el volumen de nódulos) usando solución de sorbitol 1,2 M. A continuación, la suspensión de esporas se mantuvo sobre hielo. 90 µl de suspensión de esporas se dividieron en partes alícuotas en la cubeta de electroporación (E-shot, cubeta de electroporación estándar de 0,1 cm de Invitrogen). Se añadieron 10-20 µl de construcción de ADN (plásmido Figura 4 o producto de PCR) a la suspensión de esporas y la electroporación se ajustó a 16 kV/cm, 25 µF, 50 Ω. Después de la electroporación, la suspensión de esporas se dejó sobre hielo, se resuspendió en 5 partes de sorbitol 1,0 M y 1 parte de YEPD, y se dejó germinar mediante incubación a 28°C con agitación a 250 rpm durante la noche. Al día siguiente, los esporofitos se plantaron en placas de agar que contenían acetamida. Los transformantes se recogieron y se transfirieron individualmente a placas de agar con acetamida.

B. Transformación mediante bombardeo de partículas (transformación biolística)

Se preparó una suspensión de esporas procedentes de una cepa con cuádruple eliminación de *T. reesei*. 200 µl de suspensión de esporas se extendieron en el centro de las placas de medio mínimo (MM)-acetamida. (Las placas de MM-acetamida tenían la siguiente composición: 0,6 g/l de acetamida; 1,68 g/l de CsCl; 20 g/l de glucosa; 20 g/l de KH₂PO₄, 0,6 g/l de CaCl₂ 2H₂O; 1 ml/l de 1.000 x solución de oligoelementos; 20 g/l de agar Noble, y pH 5,5. 1.000 x solución de oligoelementos contenía 5,0 g/l de FeSO₄ 7H₂O; 1,6 g/l de MnSO₄; 1,4 g/l de ZnSO₄ 7H₂O y 1,0 g/l de CoCl₂ 6H₂O. Se dejó que la suspensión de esporas se secase sobre la superficie del medio de MM-acetamida durante 1 hora en la campana estéril. La transformación seguía las instrucciones del fabricante. 60 mg de partículas de volframio se pusieron en un tubo de microcentrífuga. Se añadió 1 ml de etanol y se dejó reposar durante 15 segundos. El etanol se retiró y las partículas se lavaron tres veces con dH₂O estéril antes de que se añadieran 250 µl de glicerol estéril al 50% (v/v). 25 µl de suspensión de partículas de volframio se pusieron en un tubo de microcentrífuga. Mientras se sometía a turbulencia continuamente, se añadieron los siguientes: 5 µl (100-200 ng/ul) de ADN plasmídico, 25 µl de CaCl₂ 2,5 M y 10 µl de espermidina 0,1 M. Las partículas se centrifugaron durante 3 segundos. El sobrenadante se retiró y las partículas se lavaron con 200 µl de etanol al 100% y se centrifugaron durante 3 segundos. El sobrenadante se retiró. Se añadieron 24 µl de etanol al 100% y se mezclaron mediante pipeteado, a continuación se retiraron partes alícuotas de 8 µl de partículas y se pusieron en el centro de discos

microportadores que se mantenían en un desecador. Una vez que la solución de volframio/ADN se hubo secado, el disco microportador se puso en la cámara de bombardeo junto con la placa de MM-acetamida con esporas y el procedimiento de bombardeo se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Después del bombardeo de las esporas sembradas con las partículas de volframio-ADN, las placas se incubaron a 28°C. Las colonias transformadas se transfirieron a placas recientes de medio de MM-acetamida y se incubaron a 28°C.

3. Crecimiento de transformantes en placas de microvaloración

Después de 5 días de crecimiento sobre placas de MM-acetamida, los transformantes obtenidos mediante electroporación o mediante transformación biolística y que presentaban morfología estable se inocularon en 200 µl de medio definido con glucosa/soforosa en placas de microvaloración de 96 pocillos. El medio definido con glucosa/soforosa consiste (por litro) en 5 g de NH_4SO_4 , 33 g de tampón de PIPPS g, 9 g de casaminoácidos, 4,5 g de KH_2PO_4 g, 1 g de CaCl_2 (anhidro), 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH hasta 5,50 ajustado con NaOH al 50% con H_2O milli-Q llevado hasta 966,5 ml. Después de la esterilización, se añadieron los siguientes: 5 ml de Mazu, 26 ml de glucosa/soforosa al 60% y 2,5 ml de 400 X oligometales de *T. reesei*. La placa de microvaloración se incubó en una cámara de crecimiento oxigenada a 28°C durante 5 días.

Ejemplo 7

Las células hospedadoras de expresión para el uso en la presente invención pueden ser una cepa de *T. reesei* en la que los genes que codifican celobiohidrolasa I (CBHI, Cel7a), celobiohidrolasa II (CBHII, Cel6a), endoglucanasa I (EGI, Cel7b) y endoglucanasa II (EGII, Cel5a) se han inactivado por eliminación o bloqueo usando técnicas de genética molecular. Esta cepa (una cepa con cuádruple eliminación) es útil como un hospedador para la sobreexpresión de genes que codifican otras proteínas secretadas por *T. reesei*.

Preferiblemente, las células hospedadoras adecuadas para el uso en la presente invención se pueden derivar de una célula de *Trichoderma reesei* de la cepa RL-P37 usando los métodos descritos en los documentos WO 2005/001036 y US28026376 A1.

Una cepa de *T. reesei* adecuada para el uso en la presente invención se puede derivar de la cepa disponible públicamente de *T. reesei* RL-P37. La cepa de *T. reesei* RL-P37 se puede modificar para formar la cepa de *T. reesei* 1A52 según se describe en el documento WO 05/001036. La cepa de *T. reesei* 1A52 se puede modificar según se describe en el documento US 20080026376 para formar una célula de *T. reesei* utilizable en la presente invención.

RL-P37 se puede modificar para formar la cepa de *T. reesei* 1A52 según se describe posteriormente.

La cepa hospedadora de *T. reesei* usada se puede derivar de la cepa disponible públicamente RL-P37 que se ha usado previamente para fabricar preparaciones comerciales de celulasa de Genencor International, Inc. La derivación y la caracterización de esta cepa se ha publicado previamente (Sheir-Neiss, G. y Montenecourt, B.S. (1984) Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:46-53; Patente de EE.UU. 4.797.361). Es una celulasa que sobreproduce la cepa mutante que se ha obtenido como resultado de varias etapas de mutagénesis a partir de la cepa silvestre (QM6a).

1) Aislamiento de una cepa mutante *pyr4*.

A fin de preparar la cepa RL-P37 para la transformación con ADN plasmídico, era necesario aislar un derivado que tenía una mutación completa en el gen *pyr4*.

El gen *pyr4* codifica orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa, una enzima requerida para la biosíntesis de uridina. El inhibidor tóxico ácido 5-fluoroorótico (FOA, por sus siglas en inglés) se incorpora en uridina mediante células silvestres y así envenena las células. Sin embargo, las células defectuosas en el gen *pyr4* son resistentes a este inhibidor pero requieren uridina para el crecimiento. Por lo tanto, es posible seleccionar cepas mutantes *pyr4* usando FOA. En la práctica, se prepararon esporas de la cepa de *T. reesei* RL-P37 sobre la superficie de un medio sólido que contiene 2 mg/ml de uridina y 1,2 mg/ml de FOA. Aparecieron colonias resistentes a FOA espontáneas en de tres a cuatro días. Se identificaron mutantes resistentes a FOA que requerían uridina para el crecimiento. A fin de identificar los mutantes que tenían específicamente un gen *pyr4* defectuoso, se generaron y transformaron protoplastos con un plásmido que contenía un gen *pyr4* silvestre (Smith, J.L., Bayliss, F.T. y Ward, M. (1991) Curr. Genet. 19:27-33). Después de la transformación, los protoplastos se sembraron sobre medio que carecía de uridina. El crecimiento posterior de colonias transformadas demostraba la complementación de un gen *pyr4* defectuoso por el gen *pyr4* soportado por plásmido. De este modo, la cepa GC69 se identificó como un mutante *pyr4* de la cepa RL-P37.

2) Construcción de un plásmido diseñado para eliminar el gen que codifica CBHI.

El gen *cbhl*, que codifica la proteína de CBHI, se clonó a partir del ADN genómico de la cepa RL-P37 mediante hibridación con una sonda oligonucleotídica diseñada basándose en la secuencia publicada para este gen (Shoemaker, S., Schweickart, V., Ladner, M., Gelfand, D., Kwok, S., Myambo, K. y Innis, M. (1983) Biotechnology 1:691-696). El gen *cbhl* reside en el fragmento *PstI* de 6,5 kb y se insertó en el sitio *PstI* de pUC4K (Pharmacia Inc.,

Piscataway, NJ, EE.UU. de A.) reemplazando el gen de resistencia a kanamicina de este vector. El plásmido resultante, pUC4K::cbh1, se cortó a continuación con HindIII y el fragmento más grande se aisló y se religó para dar pUC4K::cbh1ΔH/H. Este procedimiento retiraba toda la secuencia codificante de *cbh1* y aproximadamente 1,2 kb de secuencias de flanco 5' y 1,5 kb de 3'. Aproximadamente 1 kb de ADN de flanco permanecía de cualquier extremo del fragmento de *PstI* original. El gen *pyr4* de *T. reesei* se clonó como un fragmento de HindIII de 6,5 kb de ADN genómico en pUC18 para formar pTpyr2 (Smith, J.L., Bayliss, F.T. y Ward, M. (1991) Curr. Genet. 19:27-33). El plásmido pUC4K::cbh1ΔH/H se cortó con HindIII y los extremos se desfosforilaron con fosfatasa alcalina intestinal de ternero. Este ADN se ligó con el fragmento de HindIII de 6,5 kb que contiene el gen *pyr4* para dar pΔCBHlpyr4.

La digestión de pΔCBHlpyr4 con EcoRI liberaba un fragmento más grande que consistía en las regiones de flanco del locus *cbh1* en cualquier extremo, reemplazando el gen *pyr4* a la secuencia codificante de *cbh1* en el centro. El único ADN en este fragmento que no se derivaba de *T. reesei* era un fragmento de 21 pb derivado del sitio de clonación múltiple de pUC4K.

3) Eliminación del gen *cbh1* de *T. reesei*.

Protoplastos aislados de micelio de la cepa GC69 se transformaron con el plásmido pΔCBHlpyr4 digerido con EcoRI usando métodos esbozados por Smith *et al.*, 1991. Se obtuvieron transformantes estables y aquellos de los que se había eliminado el gen *cbh1* se identificaron como se describe posteriormente.

Se aisló ADN total de los transformantes, se digirió con PstI, se sometió a electroforesis en gel de agarosa y se transfirió a un filtro de membrana. A continuación, el filtro se hibridó con pΔCBHlpyr4 marcado con P³² y el patrón de hibridación se observó mediante autorradiografía. Esta sonda se hibridó con los genes *cbh1* y *pyr4* naturales en una cepa no transformada. En un transformante (cepa P37PΔCBHl) se observó un patrón de hibridación que se predeciría si se hubiera producido un episodio de integración cruzada doble. Esto es, el gen *cbh1* se ha eliminado mediante la integración de una sola copia del fragmento de EcoRI más grande obtenido a partir de pΔCBHlpyr4 en el locus *cbh1* de la cepa RL-P37.

También se realizó un análisis Southern como anteriormente, excepto que la sonda usada era plntCBHl radiomarcado. Este plásmido consiste en un vector pUC que contiene un fragmento de BglII de 2 kb procedente del locus *cbh1* dentro de la región que se eliminaba en pUC4K::cbh1ΔH/H. Este plásmido se hibridaba al locus *cbh1* de la cepa GC69 pero no se hibridaba a ADN procedente de la cepa P37PΔCBHl. Esto confirma que el gen *cbh1* se había eliminado y que el fragmento de ADN de pUC procedente de pΔCBHlpyr4 no había sido incorporado por la cepa sometida a eliminación.

El análisis de proteínas secretadas mediante separación sobre geles de enfoque isoeléctrico mostraba que la proteína de CBHl no era producida por la cepa P37PΔCBHl.

4) Generación de un mutante completo *pyr4* de P37PΔCBHl.

Esporas del transformante (P37PΔCBHl) del que se había eliminado el gen *cbh1* se extendieron sobre medio que contenía FOA. Se obtuvo posteriormente un derivado deficiente en *pyr4* de este transformante usando los métodos descritos en la sección anterior. Esta cepa deficiente en *pyr4* se denominó P37PΔCBHlPyr⁻26. El análisis Southern ha mostrado que se había producido una eliminación espontánea cuando se seleccionaba la cepa P37PΔCBHlPyr⁻26. Esta eliminación retiraba completamente el gen *pyr4* que se había integrado en el locus *cbh1* en la cepa P37PΔCBHl, así como ADN de flanco procedente del locus *cbh1* más allá de la extensión del fragmento de *PstI* de 6,5 kb de ADN genómico que se clonaba originalmente.

5) Construcción de un vector diseñado para eliminar el gen *cbh2*.

El gen *cbh2* de *T. reesei*, que codifica la proteína de CBHII, se ha clonado como un fragmento de EcoRI de 4,1 kb de ADN genómico (Chen *et al.*, 1987, Biotechnology 5:274-278). Este fragmento de 4,1 kb se insertó entre los sitios EcoRI de pUC4XL. El último plásmido es un derivado de pUC (construido por R. M. Berka, Genencor International Inc.) que contiene un sitio de clonación múltiple con un patrón de sitios de endonucleasas de restricción simétricos dispuesto en el orden mostrado aquí, EcoRI, BamHI, SacI, SmaI, HindIII, XhoI, BglII, ClaI, BglII, XhoI, HindIII, SmaI, SacI, BamHI, EcoRI. Se construyó el plásmido pPΔCBHII en el que una región central de 1,7 kb de este clon *cbh2*, entre un sitio HindIII (a 74 pb 3' del sitio de inicio de la traducción de CBHII) y un sitio ClaI (a 265 pb 3' del último codón de CBHII), se ha retirado y reemplazado por un fragmento de ADN de HindIII-ClaI de 1,6 kb que contiene el gen *pyr4* de *T. reesei* obtenido como sigue. El gen *pyr4* de *T. reesei* se escindió de pTpyr2 en un fragmento de NheI-SphI de 1,6 kb y se insertó entre los sitios SphI y XbaI de pUC219 (derivado de pUC119 al expandir el sitio de clonación múltiple para incluir sitios de restricción para BglII, ClaI y XhoI; Wilson *et al.*, 1989, Gene 77:69-78) para crear p219M (Smith *et al.*, 1991, Curr. Genet. 19:27-33). A continuación, el gen *pyr4* podía retirarse como un fragmento de HindIII-ClaI que tenía siete pb de ADN en un extremo y seis pb de ADN en el otro extremo derivado del sitio de clonación múltiple de pUC219 e insertarse en los sitios HindIII y ClaI del gen *cbh2* para formar el plásmido pPΔCBHII.

La digestión de este plásmido con EcoRI liberaba un fragmento que tenía 0,7 kb de ADN de flanco procedente del locus *cbh2* en un extremo, 1,7 kb de ADN de flanco procedente del locus *cbh2* en el otro extremo y el gen *pyr4* de

T. reesei en el medio. El único ADN de este fragmento que no se derivaba de *T. reesei* era los fragmentos de 6 pb y 7 pb del sitio de clonación múltiple de pUC219 en cualquier extremo del gen *pyr4*.

6) Eliminación del gen *cbh2* de la cepa P37PΔCBHIPyr⁻26

5 Protoplastos de la cepa P37PΔCBHIPyr⁻26 se generaron y se transformaron con pΔCBHII digerido con EcoRI según los métodos esbozados en 3 anteriormente. Transformantes adecuados se cultivaron en matraces agitados y la proteína de los sobrenadantes de cultivo se examinó mediante enfoque isoeléctrico. Se identificó un transformante (denominado P37PΔΔCBH67) que no producía ninguna proteína de CBHII (ni CBHI).

10 Se extrajo ADN de la cepa P37PΔΔCBH67, se digirió con EcoRI y Asp718 y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. El ADN procedente de este gel se transfirió a un filtro de membrana y se hibridó con pΔCBHII marcado con ³²P. El fragmento de EcoRI de 4,1 kb que contiene el gen *cbh2* silvestre se observó en el ADN procedente de una cepa de control no transformada. En contraste, en la cepa P37PΔΔCBH67, la única banda de 4,1 kb se eliminó y se reemplazó por dos bandas de aproximadamente 0,9 y 3,1 kb. Este es el patrón esperado si una sola copia del fragmento de EcoRI más grande procedente de pΔCBHII se ha integrado precisamente en el locus *cbh2* y ha eliminado el gen *cbh2*.

15 Las mismas muestras de ADN también se digirieron con EcoRI y se realizó un análisis Southern como anteriormente. En este ejemplo, la sonda era pIntCBHII marcado con ³²P. Este plásmido contiene una porción de la secuencia codificante del gen *cbh2* desde dentro de ese segmento de ADN de *cbh2* que se eliminaba en el plásmido pΔCBHII. No se observó hibridación con ADN procedente de la cepa P37PΔCBH67, confirmando que el gen *cbh2* se suprimía y que el fragmento plasmídico pUC de pΔCBHII no había sido incorporado por esta cepa.

20 7) Selección de un mutante completo *pyr4* de la cepa P37PΔΔCBH67.

25 Esporas del transformante (P37PΔΔCBH67) del que se eliminaban ambos genes *cbh1* y *cbh2* se extendieron sobre medio que contenía FOA. Un derivado deficiente en *pyr4* de este transformante se obtuvo posteriormente usando los métodos descritos en la sección 1 anteriormente. Esta cepa deficiente en *pyr4* se denominó P37PΔΔCBH67Pyr⁻1. El análisis Southern ha mostrado que se había producido una eliminación espontánea cuando se seleccionaba la cepa P37PΔΔCBH67Pyr⁻1. Esta eliminación retiraba completamente el gen *pyr4* que se había integrado en el locus *cbh2* en la cepa P37PΔCBH67, así como ADN de flanco procedente del locus *cbh2* más allá de la extensión del fragmento de EcoRI de 4,1 kb de ADN genómico que se clonaba originalmente. Los fragmentos cortos (6 pb y 7 pb) de ADN derivados del sitio de clonación múltiple de pUC219 que estaban presentes en cualquier extremo del gen *pyr4* también habrían sido retirados del genoma por esta eliminación.

30 8) Construcción de un plásmido diseñado para bloquear el gen *egl2*.

35 El gen *egl2*, que codifica EGII (previamente denominada EGIII por algunos), se ha clonado de *T. reesei* y se ha publicado la secuencia de ADN (Saloheimo et al., 1988, Gene 63:11-21). Se ha obtenido el gen de la cepa RL-P37 como un fragmento de PstI-XhoI de aproximadamente 4 kb de ADN genómico insertado entre los sitios PstI y XhoI de pUC219. El gen *pyr4* de *T. reesei*, presente en un fragmento de Sall de 2,7 kb de ADN genómico obtenido de pTpyr2, se insertó en un sitio Sall dentro de la secuencia codificante de EGII para crear el plásmido pEGII::P-1. Esto daba como resultado el bloqueo de la secuencia codificante de EGII pero sin eliminación de ninguna secuencia. El plásmido, pEGII::P-1, se puede digerir con HindIII y BamHI para dar un fragmento lineal de ADN derivado exclusivamente de *T. reesei* excepto por 5 pb en un extremo y 16 pb en el otro extremo, ambos de los cuales se derivan del sitio de clonación múltiple de pUC219.

40 9) Bloqueo del gen *egl2* de la cepa P37PΔCBH67Pyr⁻1.

45 La cepa P37PΔΔCBH67Pyr⁻1 se transformó con pEGII::P-1 que previamente se había digerido con HindIII y BamHI y se seleccionaron transformantes estables. Se aisló ADN total de los transformantes y se usó análisis Southern para identificar cepas en la que el fragmento de ADN plasmídico que contenía los genes *pyr4* y *egl2* se había integrado en el locus *egl2* y por consiguiente bloqueaba la secuencia codificante de EGII. El análisis Southern se realizó usando como una sonda un fragmento de PstI de aproximadamente 4 kb de ADN de *T. reesei* que contenía el gen *egl2*. Cuando ADN aislado de la cepa P37PΔΔ67P⁻1 se digería con PstI para el análisis Southern, el locus *egl2* se visualizaba posteriormente como una sola banda de 4 kb en la autorradiografía. Sin embargo, para un transformante bloqueado con respecto al gen *egl2*, esta banda se perdía y se reemplazaba por dos nuevas bandas según se esperaba. Cuando el ADN se digería con BglII o EcoRV, el tamaño de la banda correspondiente al gen *egl2* incrementaba de tamaño en aproximadamente 2,7 kb (el tamaño del fragmento de *pyr4* insertado) entre la cepa P37PΔΔ67P⁻1 no transformada y el transformante bloqueado con respecto a *egl2*. Este último transformante, ahora con eliminación de los genes *cbh1*, *cbh2* y *egl2*, se denominó cepa B31. Un análisis Southern adicional confirmaba que el fragmento de ADN de pUC de pEGII::P-1 no se incorporaba en esta cepa.

10) Selección de un mutante completo *pyr4* de la cepa B31.

55 Esporas del transformante (B31) del que se habían eliminado los genes *cbh1*, *cbh2* y *egl2* se extendieron sobre medio que contenía FOA. Posteriormente, se obtuvo un derivado deficiente en *pyr4* de este transformante usando

los métodos descritos en la sección 1 anteriormente. Esta cepa deficiente en *pyr4* se denominó B31 P6. El análisis Southern ha mostrado que se había producido una eliminación espontánea cuando se seleccionaba la cepa B31 P6. Esta eliminación retiraba la mayoría del gen *pyr4* que se había integrado en el locus *egl2* en la cepa B31, pero no se extendía al ADN de flanco del locus *egl2*.

5 11) Construcción de un plásmido diseñado para eliminar el gen *egl1*.

El gen *egl1* de *T. reesei* se ha clonado y la secuencia de ADN del gen se ha publicado (Penttilä et al., 1986, Gene 45:253-263; van Arsdell et al., 1987, Biotechnology 5:60-64). Se ha obtenido este gen de la cepa RL-P37 de *T. reesei* como un fragmento de HindIII de 4,2 kb de ADN genómico insertado en el sitio HindIII de pUC100 (un derivado de pUC18 con un oligonucleótido insertado en el sitio de clonación múltiple que añade sitios de restricción para *BglII*, *Clal* y *XhoI*) para dar pUCEGI. Un fragmento de RcoRV de aproximadamente 1 kb que se extiende desde una posición cercana al medio de la secuencia codificante de EGI hasta una posición más allá del extremo 3' de la secuencia codificante se retiró y se reemplazó por un fragmento de *ScaI* de 3,5 kb de ADN de *T. reesei* que contiene el gen *pyr4* obtenido de pTpyr2. El plásmido resultante se llamó pΔEGI.

El plásmido, pΔEGI, se podía digerir con HindIII para liberar un fragmento de ADN que comprendía solamente ADN genómico de *T. reesei* que tenía un segmento del gen *egl1* en cualquier extremo y el gen *pyr4*, reemplazando parte de la secuencia codificante de EGI, en el centro.

12) Eliminación del gen *eal1* en la cepa B31P6.

Se construyeron dos formas de pΔEGI que diferían solamente en la orientación del gen *pyr4* con respecto a las regiones de flanco de *egl1*. La cepa B31P6 se transformó con una mezcla de ambas formas del plásmido después de que se hubiera digerido con HindIII. Se extrajo ADN total de transformantes estables, se digirió con HindIII y se sometió a análisis Southern. La sonda era pUCEGI radiomarcado. Se observó la hibridación a un fragmento de 4,2 kb de ADN procedente de la cepa B31P6 que representa el gen *egl1* eliminado. Se identificó un transformante (cepa 1A52) en el que estos 4,2 kb ya no estaban presentes sino que habían sido reemplazados por un fragmento de aproximadamente 6,8 kb. Este es el patrón esperado si el fragmento de HindIII más largo procedente de pΔEGI se había integrado precisamente como se predice en el locus *egl1* conduciendo a la eliminación de parte de la secuencia codificante de EGI y la inserción de *pyr4* en esta posición. Usando un plásmido pUC como una sonda para el análisis Southern, se confirmó que el fragmento de ADN de pUC de pΔEGI no se había incorporado en la cepa 1A52.

La cepa 1A52 de *T. reesei* se puede modificar para formar una célula de *T. reesei* utilizable en la presente invención.

Ejemplo 8 Digestibilidad de nutrientes de dietas complementada con una combinación de fitasa y lipasa junto con amilasa y xilanasas en cochinillos canulados.

Esta prueba se realizó en the University of Illinois, EE.UU. de A.

Materiales y métodos

Se evaluaron la energía y la digestibilidad ileal de proteínas, la digestibilidad de energía del tracto total y la retención de Ca y P del tracto total de dietas basadas en harina de maíz/soja complementadas con lipasa además de una fitasa, amilasa y xilanasas en combinación en cochinillos quirúrgicamente canulados. Los tratamientos consistían en:

- Control positivo. Dieta adecuada en nutrientes.
- Control negativo. Reducida en 150 kcal de DE/kg de pienso, 0,15% de calcio y 0,12% de P disponible en comparación con el control positivo.
- Fitasa (500 FT U/kg).
- Fitasa (500 FT U/kg), amilasa (1.800 u/kg) y xilanasas (2.000 u/kg).
- Fitasa (500 FT U/kg), amilasa (1.800 u/kg), xilanasas (2.000 u/kg) y lipasa (3.000 LIP U/kg).

Doce cerdos castrados fueron asignados aleatoriamente a un diseño de cuadrado latino de 6 x 6 duplicado con 6 dietas y 6 períodos por cuadrado cada uno. Los cerdos individuales se identificaron mediante etiquetas en la oreja.

Las formulaciones de dietas y la composición calculada para el control positivo y el control negativo se presentan en la Tabla 3. Las dietas se mezclaron al complementar con productos enzimáticos el control negativo (CN) a costa del almidón de maíz. La dieta basal se basaba en maíz, harina de soja y DDGS de maíz. Se añadió óxido crómico en 0,4% a las dietas como un marcador indigerible.

Tabla 3. Formulación de dietas y especificaciones nutricionales

Ingrediente	CP	CN
	------(%)-----	-----
Maíz	51,05	57,05
Harina de soja al 48%	24,00	21,75
DDGS	3,50	3,50
Suero, secado	12,00	12,00
Harina de pescado	4,00	4,00
Aceite de soja	3,00	0,00
Almidón o enzima	0,05	0,05
Fosfato dicálcico	0,85	0,10
Piedra caliza	0,60	0,60
Sal	0,40	0,40
HCl de lisina	0,20	0,20
DL-metionina	0,00	0,00
L-treonina	0,05	0,05
Premezcla ¹	0,30	0,30
<i>Total</i>	100,00	100,00
Composición de nutrientes calculada		
DE (kcal/kg)	3.570	3.420
NE (kcal/kg)	2.500	2.360
Almidón	31,12	34,70
NSP	8,87	9,05
CP (%)	20,54	19,97
Grasa en crudo (%)	6,16	3,40
Calcio (%)	0,81	0,64
Fósforo medio (%)	0,40	0,28
Lisina Dig. (%)	1,19	1,14
Metionina Dig. (%)	0,32	0,32
TSAA Dig. (%)	0,66	0,65
Treonina Dig. (%)	0,74	0,71

¹ Proporcionense las siguientes cantidades de vitaminas por kilogramo de dieta completa: Vitamina A, 10,990 IU; vitamina D3, 1,648 IU; vitamina E, 55 IU; vitamina K, 4,4 mg; tiamina, 3,3 mg; riboflavina, 9,9 mg; piridoxina, 3,3 mg; vitamina B12, 0,044 mg; ácido D-pantoténico, 33 mg; niacina, 55 mg; ácido fólico, 1,1 mg; biotina, 0,17 mg; Cu, 16 mg como sulfato de cobre; Fe, 165 mg como sulfato de hierro; I, 0,36 mg como yodato potásico; Mn, 44 mg como sulfato de manganeso; Se, 0,3 mg como selenito sódico; y Zn, 165 mg como óxido de cinc.

5

Todos los cerdos usados en este estudio se originaron del apareamiento de verracos de la línea 337 y hembras C22 (Pig Improvement Company, Franklin, KY). Se usaron cerdos castrados con un peso corporal inicial medio de 12,5 kg (SD = 2,15). A los cerdos se les acopló quirúrgicamente una cánula en forma de T en el íleon distal. Después de la cirugía, los cerdos se alojaron en corrales individuales. Los animales fueron alimentados con dieta posdestete convencional hasta el inicio del experimento. El pienso se proporcionó a niveles diarios de tres veces el requerimiento de mantenimiento de energía estimado (es decir 106 kcal ME/kg PC^{0,75}). La tolerancia al pienso se ajustó al principio de cada período cuando se registraban los PC (pesos corporales) de los cerdos .

Los productos enzimáticos se administraron oralmente mezclados con una dieta durante 7 días en cada período: 4 días para la adaptación, 1 día para la recogida fecal y 2 días para la recogida de digerido ileal. Se recogieron muestras de digerido ileal durante 8 h los días 6 y 7. Resumiendo, una bolsa de plástico se unió al tubo de la cánula usando una abrazadera de cable y se recogieron los digeridos que fluían a la bolsa. Las bolsas se retiraron siempre que estuvieran llenas con digerido, o al menos una vez cada 30 minutos. Las muestras recogidas se almacenaron a -20°C para evitar la degradación bacteriana de aminoácidos en el digerido. Al final del experimento, muestras ileales congeladas se dejaron descongelar a temperatura ambiente, se mezclaron dentro del animal y la dieta y se recogió una submuestra para análisis clínico. Las muestras de digeridos ileales se liofilizaron y se trituraron finalmente antes del análisis químico.

Las muestras ileales se analizaron con respecto a la materia seca (procedimiento 930.15; AOAC, 2005). La concentración de energía bruta en muestras ileales se midió usando calorimetría en bomba (calorímetro Parr 6300, Parr Instruments Co., Moline, IL). El contenido de Cr de las dietas y las muestras de digeridos ileales se midió usando un método de ICP (procedimiento 990.08; AOAC, 2005) después de la preparación de una muestra de cenizas húmedas en ácido nítrico-ácido perclórico (procedimiento 968.088D; AOAC, 2005). Estos valores se usaron para calcular los coeficientes de digestibilidad ileal. Las muestras fecales se secaron en un horno de aire forzado y se trituraron finalmente antes del análisis. Estas muestras se analizaron con respecto a DM, energía bruta, proteína en crudo, Ca, y P.

Los datos se analizaron como un diseño de cuadrado latino usando el procedimiento PROC MIXED de SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). El modelo incluía tratamiento dietético, período en el animal y bloqueo. Las medias se separaron usando pruebas de t pareadas. Cada animal se consideraba la unidad experimental para todos los cálculos. Se usó un nivel de α de 0,05 para la determinación de la significación estadística.

Resultados

La digestibilidad ileal de energía (Fig. 23A) no se incrementaba con la adición de fitasa en comparación con el control negativo, pero se incrementaba en 2,95% y 9,28% con la adición de fitasa + xilanasas + amilasa y fitasa + xilanasas + amilasa + lipasa, respectivamente. Estos cambios indican un efecto de 6,3% que se debía puramente a la adición de lipasa a un fondo de fitasa + xilanasas + amilasa. De forma similar, la digestibilidad ileal de proteína cruda no se incrementaba con la complementación con fitasa en comparación con la dieta de control negativo (Fig. 23B), pero la complementación de fitasa + xilanasas + amilasa incrementaba significativamente la digestibilidad de proteína cruda en comparación con el control negativo (+5,6%) y la complementación con fitasa (+4,0%). La complementación adicional de lipasa además de fitasa + xilanasas + amilasa incrementaba adicionalmente la digestibilidad de proteína cruda en comparación con el control negativo (+10,7%), la complementación con fitasa (+9,1%) y fitasa + xilanasas + amilasa (+4,9%).

A nivel del tracto total (Fig. 24), ni la inclusión de fitasa ni fitasa + xilanasas + amilasa afectaban a la digestibilidad de energía. La reducción de la diferencia del nivel ileal al fecal con la inclusión de fitasa + xilanasas + amilasa no era sorprendente, puesto que la actividad microbiana en el intestino grueso tiende a anular diferencias iniciales en la digestibilidad de energía en cerdos. En contraste, la adición de lipasa a esta combinación exhibía un coeficiente de digestibilidad de energía fecal mayor que los otros tratamientos, lo que sugiere la liberación y absorción de nutrientes que de otro modo no serían digeridos ni siquiera por microorganismos del intestino grueso. La combinación de fitasa + xilanasas + amilasa + lipasa incrementaba la digestibilidad de energía del tracto total en 4,7% en comparación con el pienso de control negativo.

También eran evidentes en el presente estudio incrementos relativos en la retención de Ca (Fig. 25A) y P (Fig. 25B) totales de dietas con fitasa (+32% y +293%), fitasa + xilanasas + amilasa (+36% y +323%) y fitasa + xilanasas + amilasa + lipasa (+45% y 334%, respectivamente) en comparación con la dieta de control negativo. Aunque los cambios en las digestibilidades de Ca y P con la inclusión de fitasa eran esperados, mejoras adicionales con la adición de xilanasas + amilasa + lipasa indicaban un papel principal de la lipasa en el incremento de la retención de Ca y P de dietas con fitasa, amilasa y xilanasas. Estos incrementos eran significativamente mayores frente al pienso de control y la fitasa por sí misma, lo que demuestra un efecto aditivo de la lipasa sobre la retención de Ca y P.

En conclusión, la adición de lipasa sobre fitasa + amilasa + xilanasas incrementaba la digestibilidad de energía y proteína a nivel ileal y la digestibilidad de energía a nivel del tracto total en comparación con el control negativo, la adición de fitasa y la adición de fitasa + amilasa + xilanasas. De forma similar, la adición de lipasa sobre fitasa + amilasa + xilanasas incrementaba la retención de Ca y P en el tracto total en comparación con el control negativo, y las dietas con adición de fitasa. Ejemplos in vitro contenidos en esta patente indican que estos incrementos de digestibilidad provocados por la adición de lipasa se deben principalmente a una actividad de fitasa incrementada promovida por la competición de la lipasa por el calcio de la dieta.

Ejemplo 9. Producción de ácidos grasos libres en una dieta de maíz-soja en condiciones ácidas

Resultados de un estudio de producción de ácidos grasos libres en dieta de maíz-soja por lipasa

Se incubaron muestras de pienso a 40°C con diferentes combinaciones de lipasas y fitasas a ~pH 2,8.

Reactivos:

- Los reactivos apropiados y sus concentraciones eran como sigue. Tampón de ensayo de fitasa: acetato sódico 0,25 M, CaCl_2 1 mM, Tween 20 al 0,01%, pH 5,5. Solución de pepsina: HCl 0,75 M que contiene 2.000 U/ml de pepsina (Sigma P7000). La muestra de pienso usada era una dieta básica de maíz-soja que contenía 60,01% de maíz, 31,52% de harina de soja 48, 4% de aceite de soja, 0,4% de sal, 0,2% de DL-metionina, 1,16% de piedra caliza, 1,46% de fosfato dicálcico y 1,25% de mezcla de vit/min.

Enzimas:

- Lipasa 3 según se describe en la presente memoria. Phyzyme según se describe en la presente memoria. La lipasa de Tfull es una cutinasa bacteriana procedente de *Thermobifida fusca* (Tfu_0883; número de registro del NCBI YP_288944,1) expresada en *Bacillus subtilis*. Tfull se analizó usando el ensayo de lipasa que se describe en Materiales y métodos. Además, la enzima se analizó usando el mismo ensayo, aunque las condiciones de pH se cambiaban hasta pH 7,0 en lugar de pH 5,5. La actividad de lipasa medida a pH 7,0 se describe como LIP7U, usando la misma definición que se describe en el ensayo de lipasa en Materiales y métodos. Se encontró que la relación entre la actividad de lipasa medida a pH 5,5 (LIPU) y pH 7,0 (LIP7U) era 1:1,4.
- Ronozyne P-CT y Natuphos son fitasas fúngicas disponibles comercialmente. Las muestras se obtuvieron como productos secos. 1 g de la muestra se resuspendió inicialmente en 50 ml de tampón de ensayo de fitasa y se extrajo usando un agitador magnético durante 20 min. La mezcla de extracción se rellenó hasta 100 ml finales con tampón de ensayo de fitasa y se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio. La actividad de fitasa de los extractos finales se midió según el ensayo de fitasa descrito en Materiales y métodos.
- Las muestras de lipasa se diluyeron en H_2O hasta una actividad enzimática de 30 LIPU/ml para lipasa 3 y 30 LIPU/ml para Tfull.

Las muestras de fitasa se diluyeron en tampón de ensayo de fitasa hasta una actividad enzimática de 5 FTU/ml.

Incubación in vitro a pH ácido:

- Las siguientes combinaciones de enzimas se evaluaron en la incubación in vitro: Lipasa 3, Lipasa 3 + Ronozyne P, Lipasa 3 + Natuphos, Lipasa 3 + Phyzyme, Tfull, Tfull + Ronozyne P, Tfull + Natuphos, Tfull + Phyzyme, y sin lipasa o fitasa.
- Para cada incubación, un g de muestra de pienso se pesó en un tubo con tapón roscado de 50 ml. Se añadieron a los tubos respectivos 100 μl de cada solución de enzima respectiva seguido por H_2O hasta 1 ml en total. Posteriormente, se añadieron a cada tubo 0,5 ml de solución de pepsina y el contenido se mezcló cuidadosamente. Se añadieron cinco canicas de vidrio antes de que las muestras se incubaran a 40°C en un baño de agua agitado durante 45 min. Después de la incubación, los tubos se centrifugaron durante 10 min. a 3.500 rpm. Se midió el pH del sobrenadante para la incubación "sin lipasa y sin fitasa". Finalmente, las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se pusieron en el liofilizador durante la noche. Todas las incubaciones se realizaron por duplicado.

Medida de ácidos grasos libres:

- La cantidad de ácido graso libre producida durante la incubación se midió usando un estuche NEFA-HR(2) (WAKO Chemicals GmbH). Las muestras se pusieron a temperatura ambiente y se añadieron 20 ml de etanol al 96%. Las muestras se resuspendieron manualmente antes de mezclarse en una rueda giratoria durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de mezclar, las muestras se centrifugaron a 3.500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se diluyó 5 veces en etanol al 96% antes de que se midieran los ácidos grasos libres en la muestra. 110 μl de reactivo NEFA R1 se equilibraron durante 5 minutos a 37°C antes de que se añadieran 15 μl de muestra diluida y la mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 10 minutos. Se añadieron 55 μl de reactivo NEFA R2 y la incubación continuó durante otros 10 minutos a 37°C antes de que se midiera la $\text{OD}_{520 \text{ nm}}$. El contenido de ácido graso libre se calculó a partir de una curva estándar preparada a partir de NEFA Standard (WAKO Chemicals GmbH).

Resultados:

- Los resultados de la medida de ácidos grasos libres se presentan en la Figura 29. Esta Figura muestra la producción de ácidos grasos libres en dieta de maíz-soja. La cantidad de ácidos grasos libres (FFA) producidos se corrige para el valor del blanco sin lipasa o fitasa añadida. Se midió que el pH de la incubación sin lipasa y sin fitasa era pH 2,8 y se supuso que era representativo de todas las incubaciones en este ejemplo. Esto demuestra que las incubaciones se realizaban a condiciones muy ácidas. La lipasa 3 sola o en combinación con Phyzyme, Natuphos o Ronozyne P muestra una liberación significativa de FFA en comparación con todas las muestras con Tfull, bien sola o bien en combinación con Phyzyme, Natuphos o Ronozyne P. Esto muestra claramente que la lipasa 3 sería muy eficaz en la hidrólisis de grasas en el ambiente ácido del estómago de un cerdo o la molleja de un pollo.

Ejemplo 10. Efecto sobre la actividad de fitasa de añadir calcio a la mezcla de ensayo y efecto de añadir ácido graso libre a un ensayo que contiene CaCl_2

Resultados de un estudio de formación de complejo ácido fítico-calcio con concentración creciente de calcio y recuperación de la actividad de fitasa al añadir ácido graso libre.

Bases:

- 5 El ácido fítico puede formar fácilmente quelatos con minerales divalentes tales como calcio. Este complejo de fitato-mineral puede existir como precipitados insolubles o complejos solubles y potencialmente puede ser resistente a la hidrólisis por fitasa. El ácido graso libre puede funcionar potencialmente como un quelador competitivo, al formar jabones de Ca dando como resultado una disminución de la formación de formas resistentes a fitasa de ácido fítico y un incremento concomitante en el fitato-P liberado.

Reactivos:

- 10 Los reactivos apropiados y sus concentraciones eran como sigue. Tampón de ensayo: acetato sódico 0,25 M, Triton X-100 al 3% (p/v), pH 5,5. Solución de fitato: hidrato de sal sódica de ácido fítico (Sigma P0109) 9,1 mM en tampón de ensayo. Solución de CaCl_2 : CaCl_2 0,3 M en tampón de ensayo. Solución de FFA: 40,8 mg/ml de mezcla de ácido palmítico - ácido esteárico (Sigma 09586) disuelta en etanol al 96%. Etanol: etanol al 96%.

Enzimas:

- 15 Phyzyme según se describe en la presente memoria. Ronozyme P-CT y Natuphos son fitasas fúngicas disponibles comercialmente. BP17 según se describe en la presente memoria. Las muestras se obtuvieron como producto seco. 1 g de la muestra se resuspendió inicialmente en 50 ml de acetato sódico 0,25 M, CaCl_2 1 mM, Tween 20 al 0,01%, pH 5,5 y se extrajo usando un agitador magnético durante 20 min. La mezcla de extracción se rellenó hasta 100 ml finales con acetato sódico 0,25 M, CaCl_2 1 mM, Tween 20 al 0,01%, pH 5,5 y se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio. La actividad de fitasa de los extractos finales se midió según el ensayo de fitasa descrito en Materiales y métodos.

Las muestras de fitasa se diluyeron en acetato sódico 0,25 M, CaCl_2 1 mM, Tween 20 al 0,01%, pH 5,5 hasta una actividad enzimática de 0,3 FTU/ml.

Hidrólisis de ácido fítico por fitasa:

- 25 Se mezclaron 0,5 ml de etanol con 1,4 ml de tampón de ensayo y 1 ml de solución de fitato en un tubo de ensayo de 12 ml. La mezcla se equilibró en un baño de agua a 37°C durante 5 min. antes de que la reacción se iniciara mediante la adición de 0,1 ml de solución de fitasa. Para la medida del blanco, se añadieron 0,1 ml de tampón de ensayo en lugar de la solución de fitasa. Después de 1 hora de incubación a 37°C, la reacción se detuvo mediante la adición de 0,75 ml de HCl 2,5 M. Todas las incubaciones se realizaron por duplicado.

- 30 Hidrólisis de ácido fítico por fitasa con concentración creciente de CaCl_2 :

El volumen apropiado de solución de CaCl_2 se mezcló en un tubo de ensayo de 12 ml con 0,5 ml de etanol, 1 ml de solución de fitato y tampón de ensayo hasta un volumen final de 3 ml. La mezcla se equilibró en un baño de agua a 37°C durante 5 min., antes de que la reacción se iniciara mediante la adición de 0,1 ml de solución de fitasa. Para la medida del blanco, se añadieron 0,1 ml de tampón de ensayo en lugar de solución de fitasa. Después de 1 hora de incubación a 37°C, la reacción se detuvo mediante la adición de 0,75 ml de HCl 2,5 M. Todas las incubaciones se realizaron por duplicado.

Hidrólisis de ácido fítico por fitasa en presencia de CaCl_2 15 mM y con concentración creciente de FFA:

- 40 El volumen apropiado de solución de FFA se mezcló en un tubo de ensayo de 12 ml con etanol hasta un volumen de 0,5 ml. Se añadieron 0,15 ml de solución de calcio, 1 ml de solución de fitato y tampón de ensayo hasta un volumen de ensayo final de 3 ml. La mezcla se equilibró en un baño de agua a 37°C durante 5 min. antes de que se iniciara la reacción mediante la adición de 0,1 ml de solución de fitasa. Para la medida del blanco, se añadieron 0,1 ml de tampón de ensayo en lugar de la solución de fitasa. Después de 1 hora de incubación a 37°C, la reacción se detuvo mediante la adición de 0,75 ml de HCl 2,5 M. Todas las incubaciones se realizaron por duplicado.

Medida de la actividad de fitasa:

- 45 La concentración de fosfato inorgánico en las muestras de hidrólisis se midió usando el Phosphorus reagent (Thermo Scientific) en el analizador Konelab. Se mezclaron 180 μl de Phosphorus reagent con 5 μl de muestra y se incubaron durante 4 minutos a 37°C antes de que se midiera la $\text{OD}_{340\text{ nm}}$. El contenido de fosfato se calculó usando el sCal Konelab Calibrator y Nortrol Konelab Control (Thermo Scientific). La actividad de fitasa se calculó como fosfato inorgánico liberado al restar la medida del banco del resultado. Todas las actividades se calcularon con relación a la muestra sin CaCl_2 presente.

Resultados

La Figura 30 muestra la producción de un complejo resistente a fitasa de ácido fítico y calcio y la inversión al añadir ácidos grasos libres. La Figura 30A muestra el efecto sobre la actividad de fitasa de incrementar la concentración de CaCl_2 . La Figura 30B muestra el efecto sobre la actividad de fitasa de añadir ácidos grasos libres a la mezcla de reacción que contiene 15 mM.

Los resultados de la hidrólisis de ácido fítico con concentración creciente de CaCl_2 se presentan en la Figura 30A. La disminución de la actividad de fitasa con concentración creciente de CaCl_2 se observa para las cuatro fitasas. Para Phyzyme, BP17 y Ronozyme P, la reducción de la actividad empieza a CaCl_2 5 mM, mientras que Natuphos tiene un incremento de actividad a 5 mM y la reducción de la actividad empieza a CaCl_2 15 mM. A CaCl_2 20 mM no se observa actividad de fitasa para Phyzyme, BP17 y Ronozyme P, indicando que a concentraciones de CaCl_2 por encima de 20 mM todo el ácido fítico está unido en un complejo resistente, al menos, frente a la hidrólisis por Phyzyme, BP17 y Ronozyme P. Para Natuphos, se observa una reducción significativa en la actividad de fitasa a CaCl_2 30 mM, aunque una concentración de CaCl_2 de 60 mM parece ser necesaria para unir todo el ácido fítico en un complejo resistente frente a la hidrólisis por Natuphos. Los resultados sobre la actividad de fitasa de Phyzyme, BP17 y Ronozyme P de añadir ácidos grasos libres a la mezcla de reacción que contiene CaCl_2 15 mM se presentan en la Figura 30B. Cuando se añade ácido graso libre a la mezcla de reacción que contiene CaCl_2 15 mM, las fitasas recuperan cada vez más actividad con una cantidad creciente de ácido graso libre. Se observan pequeñas diferencias entre las tres fitasas en respuesta a la concentración de ácido graso libre, aunque las tres recuperan 100% de actividad con ácido graso libre 25 mM. Esto demuestra claramente que los ácidos grasos libres se pueden unir competitivamente a calcio, y de ese modo tienen la capacidad de evitar la formación de un complejo de ácido fítico-calcio resistente a fitasa. Los ácidos grasos libres se pueden añadir como un solo componente según se demuestra aquí o se pueden formar mediante la acción de una lipasa sobre un sustrato de triglicérido.

Ejemplo 11 Incubación de lipasa seguida por ensayo de fitasa - Efecto sobre la actividad de fitasa de añadir calcio a la mezcla de ensayo y efecto de añadir mezcla de reacción de lipasa a un ensayo que contiene CaCl_2

Resultados de un estudio de formación de complejo de ácido fítico-calcio con concentración creciente de calcio y recuperación de la actividad de fitasa al añadir ácido graso libre producido por lipasa 3.

Bases:

En el ejemplo 11, se describió el efecto sobre la actividad de fitasa de añadir ácidos grasos libres a una mezcla de reacción de fitasa que contiene CaCl_2 15 mM. En este ejemplo, se efectúa un experimento similar, aunque los ácidos grasos libres se producen mediante lipasa 3. Una emulsión de triglicérido se incuba con lipasa 3, una fracción de esta mezcla se añade posteriormente a la mezcla de reacción de fitasa que contiene CaCl_2 30 mM y se observa el efecto sobre la actividad de fitasa.

Reactivos:

Los reactivos apropiados y sus concentraciones eran como sigue. Tampón de muestra de lipasa: acetato sódico 50 mM, pH 5,0, BSA al 0,1% (p/v), NaCl al 1,2% (p/v). Sustrato de triglicérido: trioctanoato de glicerilo al 2% (v/v), NaCl al 0,3% (p/v), Triton X-100 al 13% (p/v), acetato sódico 120 mM, pH 5,0. Tampón de ensayo de fitasa acetato sódico 0,25 M, pH 5,5. Solución de fitato: hidrato de sal sódica de ácido fítico (Sigma P0109) 9,1 mM en tampón de ensayo. Solución de CaCl_2 : CaCl_2 0,3 M en tampón de ensayo. Etanol: etanol al 96%.

Enzimas:

Lipasa 3 y Phyzyme según se describen en la presente memoria. La muestra de lipasa 3 se diluyó en una muestra de tampón de lipasa hasta una actividad enzimática de 10 LIPU/ml. La muestra de fitasa se diluyó en acetato sódico 0,25 M, CaCl_2 1 mM, Tween 20 al 0,01%, pH 5,5 hasta una actividad enzimática de 0,3 FTU/ml.

Mezcla de reacción de lipasa:

Se mezclaron 5 ml de sustrato de triglicérido con 1,0 ml de solución de lipasa en un tubo de ensayo de 12 ml. Para una mezcla de blanco, se añadió 1,0 ml de tampón de muestra de lipasa en lugar de la solución de lipasa. Las mezclas se incubaron en un baño de agua a 30°C durante 120 min. con remoción continua. Las mezclas se usaron directamente como mezcla de reacción de lipasa o mezcla de reacción en blanco, respectivamente, en el siguiente ensayo de fitasa.

Hidrólisis de ácido fítico por fitasa con concentración creciente de CaCl_2 incluyendo mezcla de reacción en blanco:

El volumen apropiado de solución de CaCl_2 se mezcló en un tubo de ensayo de 12 ml con 1,3 ml de mezcla de reacción de blanco, 1 ml de solución de fitato y tampón de ensayo hasta un volumen de ensayo final de 3 ml. La mezcla se equilibró en un baño de agua a 37°C durante 5 min. antes de que la reacción se iniciara mediante la adición de 0,1 ml de solución de fitasa. Para la medida del blanco, se añadieron 0,1 ml de tampón de ensayo en

lugar de solución de fitasa. Después de 1 hora de incubación a 37°C, la reacción se detuvo mediante la adición de 0,75 ml de HCl 2,5 M.

Hidrólisis de ácido fólico por fitasa en presencia de CaCl_2 30 mM y mezcla de reacción de lipasa:

- 5 Se mezclaron 1,3 ml de mezcla de reacción de blanco o mezcla de reacción de lipasa en un tubo de ensayo de 12 ml con 0,3 ml de solución de calcio, 1 ml de solución de fitato y tampón de ensayo hasta un volumen de ensayo final de 3 ml. La mezcla se equilibró en un baño de agua a 37°C durante 5 min. antes de que la reacción se iniciara mediante la adición de 0,1 ml de solución de fitasa. Después de 1 hora de incubación a 37°C, la reacción se detuvo mediante la adición de 0,75 ml de HCl 2,5 M.

Medida de la actividad de fitasa:

- 10 La concentración de fosfato inorgánico en las muestras de hidrólisis se midió usando el Phosphorus reagent (Thermo Scientific) en el analizador Konelab. Se mezclaron 180 μl de Phosphorus reagent con 5 μl de muestra y se incubaron durante 4 minutos a 37°C antes de que se midiera la $\text{OD}_{340\text{ nm}}$. El contenido de fosfato se calculó usando el sCal Konelab Calibrator y Nortrol Konelab Control (Thermo Scientific). La actividad de fitasa se calculó como fosfato inorgánico liberado al restar la medida del banco del resultado. Todas las actividades se calcularon con relación a la muestra sin CaCl_2 presente.

Resultados

- 20 La Figura 31 muestra la producción de un complejo resistente a fitasa de ácido fólico y calcio y la inversión al añadir mezcla de reacción de lipasa que incluye lipasa. La Figura 31A muestra el efecto sobre la actividad de una concentración de CaCl_2 creciente y la Figura 31B muestra el efecto sobre la actividad de fitasa de añadir mezcla de reacción de lipasa a la mezcla de reacción de fitasa que contenía CaCl_2 30 mM.

- 25 Los resultados de la hidrólisis de ácido fólico con concentración creciente de CaCl_2 en presencia de una mezcla de reacción de lipasa en blanco (sin lipasa presente) se presentan en la Figura 31A. Disminuir la actividad de fitasa con una concentración creciente de CaCl_2 se observa con una reducción significativa en la actividad de fitasa con CaCl_2 30 mM y sin actividad restante con CaCl_2 40 mM. Este perfil de inhibición de calcio es diferente de la curva correspondiente mostrada en el Ejemplo 11. La razón es la cantidad de Triton X-100 aplicada para emulsionar el sustrato de triglicérido en la mezcla de reacción de lipasa, que da como resultado dos veces más Triton X-100 en la mezcla de reacción de fitasa en comparación con el experimento descrito en el Ejemplo 11. El cambio de concentración de Triton X-100 cambia las propiedades para la formación de un complejo entre el ácido fólico y el calcio.

- 30 Los resultados de añadir mezcla de reacción de lipasa a la mezcla de reacción de fitasa que contiene CaCl_2 30 mM se presentan en la Figura 31B. Añadir la mezcla de reacción de lipasa que incluye lipasa da como resultado un incremento significativo de la actividad de fitasa en comparación con las muestras sin lipasa añadida. Esto demuestra claramente que los ácidos grasos libres producidos por la actividad de lipasa sobre un sustrato de triglicérido se pueden unir competitivamente a calcio, y de ese modo tiene la capacidad de evitar la formación de un complejo de ácido fólico-calcio resistente a fitasa. Cuando el complejo de ácido fólico-calcio no se forma, una cantidad mayor de ácido fólico está más fácilmente accesible a la degradación por la fitasa conduciendo a un incremento en la actividad de fitasa.

- 40 En el animal, este incremento en la actividad de fitasa como resultado de la actividad de lipasa conducirá a un incremento en la retención de P y Ca así como un incremento en la digestibilidad aparente de aminoácidos (Ravindran, V. et al, Br. Poult. Sci., 41, 193-200 (2.000) y Selle, P:H. et al, Livestock Science, 124, 126-141 (2009)). Esto conducirá a un incremento de la retención de P y Ca así como un incremento de la capacidad de metabolización de energía y la digestibilidad aparente de aminoácidos cuando se comparan con animales sin complemento de lipasa además de fitasa.

Ejemplo 12 perfil de pH de lipasas en el pienso

- 45 Resultados de un estudio del perfil de pH de lipasa 3 y lipasa pancreática en el pienso

Las muestras de pienso se incuban a 40°C con lipasa 3 y lipasa pancreática usando diferentes tampones de pH para mostrar el perfil de pH de lipasa 3 y lipasa pancreática.

Enzimas:

- 50 Lipasa 3 según se describe en la presente memoria. Lipasa pancreática como en pancreatina de páncreas porcino (Sigma P7545). La muestra de lipasa 3 se diluyó en H_2O hasta una actividad enzimática de 300 LIPU/ml. La muestra de pancreatina se diluyó en H_2O hasta una concentración de 2 mg/ml.

Reactivos:

Los tampones apropiados y sus concentraciones eran como sigue: HCl 0,25 M; HCl de glicina 0,5 M, pH 2,5; HCl de glicina 0,5 M, pH 3,5; fosfato sódico 0,5 M, pH 6,5; fosfato sódico 0,5 M, pH 7,5; Tris 0,5 M, pH 8,5; NaHCO₃ 1 M, pH 10. Otros reactivos eran como sigue. Solución de TDC: taurodesoxicolato sódico (Sigma T0875) se diluyó en H₂O hasta 80 mM. La muestra de pienso usada era una dieta de maíz-soja básica que contenía 60,01% de maíz, 31,52% de harina de soja 48, 4% de aceite de soja, 0,4% de sal, 0,2% de DL-metionina, 1,16% de piedra caliza, 1,46% de fosfato dicálcico y 1,25% de mezcla de vit/min.

Incubación in vitro con diferentes tampones de pH:

Para cada incubación, un g de muestra de pienso de maíz-soja se pesó en un tubo con tapón roscado de 50 ml. Se añadieron a los tubos respectivos 0,1 ml de solución de enzima seguido por 0,1 ml de solución de TDC y 1,8 ml de tampón respectivo. Se añadieron cinco canicas de vidrio antes de que las muestras se incubaran a 40°C en un baño de agua agitado durante 120 min. Después de la incubación, los tubos se centrifugaron durante 10 min. a 3.500 rpm y se midió el pH del sobrenadante. Posteriormente, las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se pusieron en el liofilizador durante la noche. Todas las incubaciones se realizaron por duplicado.

Medida de ácidos grasos libres:

La cantidad de ácido graso libre producido durante la incubación se midió usando un estuche NEFA-HR(2) (WAKO Chemicals GmbH). Las muestras se pusieron a temperatura ambiente y se añadieron 20 ml de etanol al 96%. Las muestras se resuspendieron manualmente antes de mezclarse en una rueda giratoria durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la mezcladura, las muestras se centrifugaron a 3.500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se diluyó 5 veces en etanol al 96% antes de que se midieran los ácidos grasos libres en la muestra. 110 µl de reactivo NEFA R1 se equilibraron durante 5 minutos a 37°C antes de que se añadieran 15 µl de muestra diluida y la mezcla de reacción se incubara a 37°C durante 10 minutos. Se añadieron 55 µl de reactivo NEFA R2 y la incubación continuó durante otros 10 minutos a 37°C antes de que se midiera la OD_{520 nm}. El contenido de ácido graso libre se calculó a partir de una curva estándar preparada a partir de NEFA Standard (WAKO Chemicals GmbH).

Resultados:

La Figura 32 muestra el perfil de pH de lipasa 3 y lipasa pancreática medido en una dieta de maíz-soja. La concentración de lipasa 3 era 30 LIPU/g de pienso y la concentración de lipasa pancreática era 0,2 mg/ml de pienso. La actividad se muestra con relación a la cantidad más alta medida de ácido graso libre producido.

El pH en los diferentes tampones era como sigue para lipasa 3 y lipasa pancreática, respectivamente: HCl 0,25 M proporciona pH 3,41 y pH 3,02; HCl de glicina 0,5 M, pH 2,5 proporciona pH 3,99 y pH 3,76; HCl de glicina 0,5 M, pH 3,5 proporciona pH 4,93 y pH 5,18; fosfato sódico 0,5 M, pH 6,5 proporciona pH 6,45 y pH 6,45; fosfato sódico 0,5 M, pH 7,5 proporciona pH 7,26 y pH 7,22; Tris 0,5 M, pH 8,5 proporciona pH 8,33 y pH 8,18; NaHCO₃ 1 M, pH 10 proporciona pH 9,95 y pH 10,07. Para la lipasa 3, el óptimo de pH en el pienso se encuentra a pH 4,0 con actividad decreciente a pH tanto superior como inferior. El pH 3,4 es el pH más bajo evaluado y la actividad probablemente continuará disminuyendo con un pH que desciende adicionalmente. Para la lipasa pancreática, el óptimo de pH en el pienso se encuentra a pH 8,2 con actividad descendente a pH tanto inferior como superior. La conclusión es que la lipasa 3 tiene un perfil de pH muy diferente del perfil de pH de la lipasa pancreática. Además, el perfil de pH de la lipasa 3 indica que la lipasa 3 podría ser muy eficaz en la hidrólisis de grasas en el ambiente ácido del estómago de un cerdo o la molleja de un pollo.

Ejemplo 13 digestibilidad ileal y retención en el tracto total de fósforo y calcio de dietas complementadas con lipasa, fitasa y la combinación de lipasa+fitasa frente a una dieta de control en pollos de engorde.

Materiales y métodos

Se efectuaron experimentos para evaluar la digestibilidad ileal y la retención en el tracto total de P y Ca en pollos de engorde alimentados con dietas complementada con lipasa o fitasa por sí mismas, y lipasa y fitasa en combinación, frente a una dieta de control negativo. Las dietas (Tabla 4) se basaban en maíz y harina de soja, y contenían DDGS de maíz, harina de gluten de maíz y aceite de soja.

Tabla 4. Composición y análisis calculado (g/kg como pienso) de las dietas

Ingrediente	Preiniciador (0-14 d: g/kg)	Control negativo (14-21 d: g/kg)
Maíz	498,3	496,8
DDGS de maíz	50,0	50,0
Harina de gluten de maíz, 60%	50,0	50,0
Harina de soja, 48%	311,9	312,2

Ingrediente	Preiniciador (0-14 d: g/kg)	Control negativo (14-21 d: g/kg)
Almidón de maíz/trigo	2,0	2,0
Aceite de soja	40,0	40,0
HCl de lisina	3,8	3,8
DL-metionina	2,7	2,7
L-treonina	1,0	1,0
Marcador inerte	3,0	3,0
Sal	3,6	3,6
Piedra caliza	13,8	3,0
Fosfato dicálcico	16,4	13,5
Premezcla de oligominerales-vitaminas	3,5	3,5
Space (enzima)	0,0	14,9
Análisis calculado		
Energía metabolizable, kcal/kg	3,140	3,100
Proteína cruda, g/kg	240	240
Lisina digerible, g/kg	12,6	12,6
Metionina digerible, g/kg	6,4	6,4
Metionina + cisteína digeribles, g/kg	9,0	9,0
Treonina digerible, g/kg	7,9	7,9
Calcio, g/kg	10,5	5,7
Fósforo disponible, g/kg	4,3	3,8

El diseño experimental consistía en 6 tratamientos dietéticos, cada uno asignado aleatoriamente a 6 jaulas reproducidas exactamente (8 pájaros por jaula) como sigue:

1. Control negativo (CN)

2. CN + lipasa (1.000 LIP U/kg)

5 3. CN + lipasa (3.000 LIP U/kg)

4. CN + fitasa (500 FTU / kg)

5. CN + fitasa (500 FTU / kg) + lipasa (1.000 LIP U/kg)

6. CN + fitasa (500 FTU / kg) + lipasa (3.000 LIP U/kg)

10 Pollos de engorde con días de edad se asignaron aleatoriamente a incubadoras calentadas eléctricamente por pilas en una habitación de ambiente controlado. Los pollos recibían iluminación fluorescente constante y se les dejó acceso libre a las dietas y el agua. Las aves recibieron una dieta preiniciadora hasta el día 14. A esta edad, a las aves se les asignaron tratamientos dietéticos basándose en el peso corporal y se transfirieron a jaulas de cría. Las aves se alimentaron con las dietas experimentales desde el día 14 hasta el día 21. La temperatura se mantuvo a 31°C durante la primera semana y a continuación se redujeron gradualmente hasta 22°C para la tercera semana.

15 La toma de pienso y la producción de excrementos total de cada jaula se midieron desde el día 17 al 20 después de la eclosión. Los excrementos de cada jaula se reunieron, se mezclaron en un mezclador y se submuestrearon. Cada submuestra se liofilizó, se trituró para pasar a través de un tamiz de 0,5 mm y se almacenó en recipientes de plástico herméticos a -4°C esperando el análisis. Las dietas y las muestras de excrementos se analizaron con respecto al contenido de materia seca (DM, por sus siglas en inglés), calcio (Ca) y fósforo (P).

20 El d 21, dos aves de cada jaula reproducida exactamente se seleccionaron y se sacrificaron mediante inyección intracárdica de pentobarbitona sódica. El intestino delgado se expuso inmediatamente y el contenido de la mitad inferior del íleon se recogió al barrer suavemente con agua destilada en bolsas de plástico. El íleon se definió como la porción del intestino delgado que se extiende desde el divertículo vitelino hasta un punto 40 mm proximal a la

unión ileocólica. Se reunieron los digeridos dentro de una jaula y se liofilizaron, se trituraron para pasar a través de un tamiz de 0,5 mm y se almacenaron a -4°C en recipientes hermético hasta el análisis de laboratorio con respecto a DM, titanio, Ca y P.

- 5 Los datos se analizaron mediante ANOVA usando el procedimiento PROC MIXED de SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). El modelo incluía el efecto fijo del tratamiento dietético y el efecto aleatorio de bloque. Las medias se separaron usando pruebas de t pareadas. Cada gallinero se consideraba la unidad experimental para todos los cálculos. Se uso un nivel de α de 0,05 para la determinación de la significación estadística.

Resultados

- 10 La Figura 33 muestra que la fitasa no incrementaba significativamente la digestibilidad ileal de fósforo en comparación con el control negativo, pero producía un incremento numérico de 6,0% como se esperaba. La lipasa, tanto en 1.000 como en 3.000 LIP U/kg, no producía efecto sobre la digestibilidad de fósforo ileal en comparación con el control negativo. En contraste, la combinación de lipasa + fitasa era capaz de incrementar significativamente la digestibilidad de fósforo ileal en comparación con el control negativo en 14,3% a 1.000 LIP U/kg y 10,6% a 3.000 U/kg de inclusión de lipasa. La combinación de lipasa + fitasa incrementa significativamente la digestibilidad de fósforo ileal en comparación con el tratamiento con fitasa, solo cuando la lipasa se incluía en 1.000 U/kg en una diferencia de 7,8%.

- 20 La Figura 34 muestra que no existen efectos significativos sobre la digestibilidad de calcio ileal de cualquiera de los tratamientos enzimáticos en comparación con la dieta de control negativo. No obstante, los valores de digestibilidad de Ca numéricamente más altos se obtenían con las combinaciones fitasa + lipasa, que exhibían valores que eran 118,3% y 115,6% de los valores obtenidos con la dieta de control negativo, cuando se incluía lipasa en 1.000 U/kg y 3.000 U/kg, respectivamente.

- 25 La Figura 35 muestra que ni la inclusión de lipasa ni la inclusión de fitasa daban como resultado diferencias significativas en la retención de fósforo en el tracto total en comparación con el control negativo. No obstante, la fitasa producía un incremento numérico de retención de fósforo de 9,7% en comparación con el control negativo. La combinación de lipasa + fitasa incrementaba significativamente la retención de fósforo en comparación con el control negativo en 13,4% y 16,0% cuando la lipasa se complementaba en 1.000 y 3.000 LIP U/kg, respectivamente.

- 30 La Figura 36 muestra que ni la inclusión de lipasa ni la inclusión de fitasa daban como resultado diferencias significativas en la retención de calcio en el tracto total en comparación con el control negativo. Sin embargo, la combinación de fitasa y 3.000 LIP U/kg incrementaba significativamente la retención de Ca en 17,7% en comparación con el control negativo.

- 35 En síntesis, ni la lipasa ni la fitasa producían efectos significativos de digestibilidad de P y Ca en el estudio actual. Sin embargo, la combinación de fitasa y 1.000 LIP U/kg de lipasa incrementaba la retención de fósforo ileal y en el tracto total en comparación con el control negativo, y la digestibilidad de fósforo ileal en comparación con la inclusión de fitasa. La combinación de fitasa y 3.000 LIP U/kg de lipasa incrementaba la retención de fósforo ileal y en el tracto total y la retención de Ca en el tracto total en comparación con el control negativo. Estos efectos incrementales de la lipasa además de la fitasa en la absorción y la utilización de calcio y fósforo parecen estar relacionados principalmente con la producción de ácidos grasos libres mediante lipasa en el tracto gastrointestinal, que promueve la competición por el calcio y mejora la actividad de fitasa, según se confirmó en los ejemplos in vitro descritos en la presente memoria.

40 Listado de Secuencias

- <110> DANISCO A/S
 <120> Complemento para piensos
 <130> P030196WO
 <150> US 61/172272
 45 <151> 24-04-2009
 <150> US 61/312413
 <151> 10-03-2010
 <150> GB 0908770.1
 <151> 20-05-2009
 50 <150> GB 0922467.6
 <151> 23-12-2009
 <160> 33

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 413

<212> PRT

5 <213> Buttiauxella sp.

<400> 1

Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val 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 Asn Thr 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 Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys Pro
65 70 75 80

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

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

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

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

Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln His
145 150 155 160

Tyr Ile Pro Phe Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser Thr
165 170 175

Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu Gly
180 185 190

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

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

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

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

Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Asn 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 Ala Gly Met Leu Asn Met Arg
305 310 315 320

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

Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser Val
340 345 350

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

Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly Cys
370 375 380

Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr Arg
385 390 395 400

Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
405 410

<210> 2

<211> 413

<212> PRT

5 <213> Buttiauxella sp.

<400> 2

Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val 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 Tyr Thr 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 Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Pro Gln Gly Ser Cys Pro
65 70 75 80

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

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

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

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

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

Tyr Ile Pro Glu Leu Ala Leu Met Asn Thr Val Leu Asn Phe Ser Lys
165 170 175

Ser Pro Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Pro Cys Asp Leu Ala
180 185 190

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

<210> 3
 <211> 413
 <212> PRT
 <213> Butiauxella sp.

<400> 3

ES 2 586 819 T3

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

Phe Asp Leu Met Glu Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Lys 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 Ala Gly Met Leu Asn Met Arg
305 310 315 320

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

Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser Val
340 345 350

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

Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly Cys
370 375 380

Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr Arg
385 390 395 400

Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
405 410

<210> 4
<211> 413
<212> PRT
<213> Buttiauxella sp.

<400> 4

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

ES 2 586 819 T3

305 310 315 320
 Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala Leu
 325 330 335
 Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser Val
 340 345 350
 Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro Leu
 355 360 365
 Ser Leu Asn Gln Pro Pro Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly Cys
 370 375 380
 Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr Arg
 385 390 395 400
 Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 405 410
 <210> 5
 <211> 413
 <212> PRT
 5 <213> Buttiauxella sp.
 <400> 5
 Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val 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 Tyr Thr 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 Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Pro Arg Gly Ser Cys Pro
 65 70 75 80
 Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Thr Asp Val Ala Gln Arg Thr Leu
 85 90 95
 Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly Leu
 100 105 110
 Thr Ile His His Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe His

ES 2 586 819 T3

115					120					125					
Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Ile	Cys	Ser	Met	Asp	Lys	Thr	Gln	Val	Gln	Gln
130						135					140				
Ala	Val	Glu	Lys	Glu	Ala	Gln	Thr	Pro	Ile	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln	Arg
145					150					155					160
Tyr	Ile	Pro	Glu	Leu	Ala	Leu	Met	Asn	Thr	Ile	Leu	Asn	Phe	Ser	Lys
				165					170					175	
Ser	Pro	Trp	Cys	Gln	Lys	His	Ser	Ala	Asp	Lys	Pro	Cys	Asp	Leu	Ala
			180					185					190		
Leu	Ser	Met	Pro	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Lys	Asp	Asn	Gly	Asn	Glu	Val
		195					200					205			
Ser	Leu	Asp	Gly	Ala	Ile	Gly	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Ala	Glu	Ile	Phe
	210					215					220				
Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Gln	Val	Ala	Trp	Gly	Asn	Ile
225					230					235					240
His	Ser	Glu	Gln	Glu	Trp	Ala	Leu	Leu	Leu	Lys	Leu	His	Asn	Val	Tyr
				245					250					255	
Phe	Asp	Leu	Met	Glu	Arg	Thr	Pro	Tyr	Ile	Ala	Arg	His	Lys	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	Ala	Gly	Met	Leu	Asn	Met	Arg
305					310					315					320
Trp	Thr	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Ala	Leu
				325					330					335	
Val	Phe	Glu	Arg	Leu	Ala	Asp	Lys	Ser	Gly	Lys	Gln	Tyr	Val	Ser	Val
			340					345					350		
Ser	Met	Val	Tyr	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Leu	Arg	Ser	Gln	Thr	Pro	Leu
		355					360					365			

ES 2 586 819 T3

Ser Leu Asn Gln Pro Pro Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly Cys
370 375 380

Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr Arg
385 390 395 400

Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
405 410

<210> 6
<211> 419
<212> PRT
5 <213> Buttiauxella sp.

<400> 6

His His His His His His Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val
1 5 10 15

Glu Lys Val Val Ile Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys
20 25 30

Met Thr Gln Thr Met Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp
35 40 45

Pro Val Lys Leu Gly Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser
50 55 60

Leu Met Gly Gly Phe Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu
65 70 75 80

Ser Gln Gly Ser Cys Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Thr Asp
85 90 95

Val Asp Gln Arg Thr Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu
100 105 110

Ala Pro Gln Cys Gly Leu Thr Ile His His Gln Gln Asn Leu Glu Lys
115 120 125

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

Lys Thr Gln Val Gln Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile
145 150 155 160

Asp Asn Leu Asn Gln His Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr
165 170 175

Thr	Leu	Asn	Phe	Ser	Lys	Ser	Pro	Trp	Cys	Gln	Lys	His	Ser	Ala	Asp
			180					185					190		
Lys	Ser	Cys	Asp	Leu	Gly	Leu	Ser	Met	Pro	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Lys
		195					200					205			
Asp	Asn	Gly	Asn	Glu	Val	Ser	Leu	Asp	Gly	Ala	Ile	Gly	Leu	Ser	Ser
	210					215					220				
Thr	Leu	Ala	Glu	Ile	Phe	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Gln
225					230					235					240
Ala	Ala	Trp	Gly	Asn	Ile	His	Ser	Glu	Gln	Glu	Trp	Ala	Leu	Leu	Leu
				245					250					255	
Lys	Leu	His	Asn	Val	Tyr	Phe	Asp	Leu	Met	Glu	Arg	Thr	Pro	Tyr	Ile
			260					265					270		
Ala	Arg	His	Lys	Gly	Thr	Pro	Leu	Leu	Gln	Ala	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu
		275					280					285			
Asn	Pro	Asn	Ala	Thr	Glu	Ser	Lys	Leu	Pro	Asp	Ile	Ser	Pro	Asp	Asn
	290					295					300				
Lys	Ile	Leu	Phe	Ile	Ala	Gly	His	Asp	Thr	Asn	Ile	Ala	Asn	Ile	Ala
305					310					315					320
Gly	Met	Leu	Asn	Met	Arg	Trp	Thr	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr
				325					330					335	
Pro	Pro	Gly	Gly	Ala	Leu	Val	Phe	Glu	Arg	Leu	Ala	Asp	Lys	Ser	Gly
			340					345					350		
Lys	Gln	Tyr	Val	Ser	Val	Ser	Met	Val	Tyr	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Leu
		355					360					365			
Arg	Ser	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Asn	Gln	Pro	Ala	Gly	Ser	Val	Gln
	370					375					380				
Leu	Lys	Ile	Pro	Gly	Cys	Asn	Asp	Gln	Thr	Ala	Glu	Gly	Tyr	Cys	Pro
385					390					395					400
Leu	Ser	Thr	Phe	Thr	Arg	Val	Val	Ser	Gln	Ser	Val	Glu	Pro	Gly	Cys
				405					410					415	

Gln Leu Gln

<210> 7

<211> 297

<212> PRT

<213> Aspergillus tubingensis

<400> 7

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

His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro Met Asp Phe Gly Phe
225 230 235 240

Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Asn Gly Ala Ser
245 250 255

Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ala
260 265 270

Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Ser Val Val Ala His Leu Trp Tyr
275 280 285

Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu
290 295

<210> 8

<211> 270

<212> PRT

5 <213> Aspergillus tubingensis

<400> 8

Ser Val Ser Thr Ser Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ala Gln Trp
1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Lys Asp Ser Asn
20 25 30

Leu Thr Cys Thr Ala Asn Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr
35 40 45

Thr Met Leu Leu Glu Phe Asp Leu Thr Asn Asp Phe Gly Gly Thr Ala
50 55 60

Gly Phe Leu Ala Ala Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe
65 70 75 80

Arg Gly Ser Ser Thr Ile Glu Asn Trp Ile Ala Asn Leu Asp Phe Ile
85 90 95

Leu Glu Asp Asn Asp Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly
100 105 110

Phe Trp Lys Ala Trp Glu Ser Ala Ala Asp Glu Leu Thr Ser Lys Ile
115 120 125

Lys Ser Ala Met Ser Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly
130 135 140

His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg
145 150 155 160

Asn Asp Gly Tyr Ser Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Ile
165 170 175

Gly Asn Tyr Ala Leu Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala
180 185 190

Asn Phe Arg Val Thr His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro
195 200 205

Met Asp Phe Gly Phe Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser
210 215 220

Gly Asn Gly Ala Ser Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly
225 230 235 240

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

Ala His Leu Trp Tyr Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu
260 265 270

<210> 9
<211> 1045
<212> ADN
5 <213> Aspergillus tubingensis

<400> 9

atgttctctg gacggtttgg agtgcttttg acagcgcttg ctgcgctggg tgctgccgcg	60
cgggcaccgc ttgctgtgcg gagtagtgtt gcccgatgtg agatgggttg atagcactga	120
tgaaggggtga ataggtgtct cgacttccac gttggatgag ttgcaattgt tcgcgcaatg	180
gtctgccgca gcttattgct cgaataatat cgactcgaaa gactccaact tgacatgcac	240
ggccaacgcc tgtccatcag tcgaggaggc cagtaccacg atgctgctgg agttcgacct	300
gtatgtcact cagatcgag acatagagca cagctaattt gaacaggacg aacgactttg	360
gaggcacagc cggtttcctg gccgcggaca acaccaacaa gcggctcgtg gtcgccttcc	420
ggggaagcag cacgattgag aactggattg ctaatcttga cttcatcctg gaagataacg	480
acgacctctg caccggctgc aaggtccata ctggtttctg gaaggcatgg gagtccgctg	540
ccgacgaact gacgagcaag atcaagtctg cgatgagcac gtattcgggc tataccctat	600
acttcaccgg gcacagtttg ggcggcgcat tggctacgct gggagcgaca gttctgcgaa	660
atgacggata tagcgttgag ctggtgagtc cttcacaaag gtgatggagc gacaatcggg	720

ttctgacagt caatagtaca cctatggatg tcctcgaatc ggaaactatg cgctggctga 780
gcatatcacc agtcagggat ctggggccaa cttccgtgtt acacacttga acgacatcgt 840
cccccggtg ccacccatgg acttttgatt cagtcagcca agtccggaat actggatcac 900
cagtggcaat ggagccagtg tcacggcgtc ggatatcgaa gtcacgagg gaatcaattc 960
aacggcgga aatgcaggcg aagcaacggt gagcgttgtg gctcacttgt ggtacttttt 1020
tgcgatttcc gagtgcctgc tataa 1045

<210> 10
<211> 964
<212> ADN
5 <213> Aspergillus tubingensis

<400> 10
agtaggtgtg cccgatgtga gatggttga tagcactgat gaagggtgaa taggtgtctc 60
gacttccacg ttggatgagt tgcaattgtt cgcgcaatgg tctgccgcag cttattgtctc 120
gaataatatc gactcgaaag actccaactt gacatgcacg gccaacgcct gtccatcagt 180
cgaggaggcc agtaccacga tgctgctgga gttcgacctg tatgtcactc agatcgaga 240
catagagcac agctaatttg aacaggacga acgacttttg aggcacagcc ggtttcctgg 300
cgcgggacaa caccaacaag cggctcgtgg tcgccttccg gggaagcagc acgattgaga 360
actggattgc taatcttgac ttcattcctgg aagataacga cgacctctgc accggctgca 420
aggtccatac tggtttctgg aaggcatggg agtccgctgc cgacgaactg acgagcaaga 480
tcaagtctgc gatgagcacg tattcgggct ataccctata cttcacgggg cacagtttgg 540
gcgggcgatt ggctacgtg ggagcgacag ttctgcgaaa tgacggatat agcgttgagc 600
tggtgagtc ttcacaaagg tgatggagcg acaatcgggt tctgacagtc aatagtacac 660
ctatggatgt cctcgaatcg gaaactatgc gctggctgag catatcacca gtcagggatc 720
tggggccaac ttccgtgtta cacacttgaa cgacatcgtc ccccggtgc caccatgga 780
ctttggattc agtcagccaa gtccggaata ctggatcacc agtggcaatg gagccagtgt 840
cacggcgtcg gatatcgaag tcacgaggg aatcaattca acggcgggaa atgcaggcga 900
agcaacggtg agcgttgtgg ctcacttgtg gtactttttt gcgatttccg agtgcctgct 960
ataa 964

<210> 11
<211> 1242
<212> ADN
10 <213> Buttiauxella sp.

<220>
<221> característica nueva
<222> (1176)..(1176)
<223> n es a, c, g, o t

15 <220>
<221> característica nueva
<222> (1202)..(1202)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 11

```

aacgacactc ccgcttcagg ctaccagggt gagaaagtgg taatactcag ccgccacggg      60
gtgcgagcac caaccaaagt gacacagacc atgcgcgacg taacacctaa tacctggccc      120
gaatggccag taaaattggg ttatatcacg ccacgcgggtg agcatctgat tagcctgatg      180
ggcgggtttt atcgccagaa gtttcaacaa cagggcattt tatcgacagg cagttgcccc      240
acaccaaact caatttatgt ctgggcagac gttgatcagc gcacgcttaa aactggcgaa      300
gctttcctgg cagggcttgc tccggaatgt catttaacta ttcaccacca gcaggacatc      360
aaaaaagccg atccgctgtt ccatccggtg aaagcgggca cctgttcaat ggataaaact      420
caggtccaac aggccgttga aaaagaagct caaaccccca ttgataatct gaatcagcac      480
tatattccct ttctggcctt gatgaatacg accctcaact ttcgacgtc ggcctgggtg      540
cagaaacaca gcgcggataa aagctgtgat ttagggctat ccatgccgag caagctgtcg      600
ataaaagata atggcaacaa agtcgctctc gacggggcca ttggcctttc gtctacgctt      660
gctgaaattt tcctgctgga atatgcgcaa gggatgccgc aagcggcgtg ggggaatatt      720
cattcagagc aagagtgggc gtcgctactg aaactgcata acgtccagtt tgatttgatg      780
gcacgcacgc cttatatcgc cagacataac ggcacgcctt tattgcaggc catcagcaac      840
gcgctgaacc cgaatgccac cgaaagcaaa ctgcctgata tctcacctga caataagatc      900
ctgtttattg ccggacacga taccaatatt gccaatatcg caggcatgct caacatgcgc      960
tggaacgtac ctgggcaacc cgataaacac cctccggggc gcgctttagt ctttgagcgt     1020
ttggccgata agtcagggaa acaatatgtt agcgtgagca tgggtgatca gactctcgag     1080
cagttgcgct cccaaacacc acttagcctt aatcaacctg cggaagcgt acagctaaaa     1140
attcctggct gtaacgatca gacggctgaa ggatantgcc cgctgtcgac gttcactcgc     1200
gnggttagcc aaagcgtgga accaggctgc cagctacagt aa                          1242

```

<210> 12

<211> 432

5 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 12

```

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

```

```

Pro Gln Ser Ala Phe Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser

```

ES 2 586 819 T3

20					25					30					
Val	Val	Ile	Val	Ser	Arg	His	Gly	Val	Arg	Ala	Pro	Thr	Lys	Ala	Thr
		35					40					45			
Gln	Leu	Met	Gln	Asp	Val	Thr	Pro	Asp	Ala	Trp	Pro	Thr	Trp	Pro	Val
	50					55					60				
Lys	Leu	Gly	Trp	Leu	Thr	Pro	Arg	Gly	Gly	Glu	Leu	Ile	Ala	Tyr	Leu
65					70					75					80
Gly	His	Tyr	Gln	Arg	Gln	Arg	Leu	Val	Ala	Asp	Gly	Leu	Leu	Ala	Lys
				85					90					95	
Lys	Gly	Cys	Pro	Gln	Ser	Gly	Gln	Val	Ala	Ile	Ile	Ala	Asp	Val	Asp
			100					105					110		
Glu	Arg	Thr	Arg	Lys	Thr	Gly	Glu	Ala	Phe	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Pro
		115					120					125			
Asp	Cys	Ala	Ile	Thr	Val	His	Thr	Gln	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Pro	Asp
	130					135					140				
Pro	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Lys	Thr	Gly	Val	Cys	Gln	Leu	Asp	Asn	Ala
145					150					155					160
Asn	Val	Thr	Asp	Ala	Ile	Leu	Ser	Arg	Ala	Gly	Gly	Ser	Ile	Ala	Asp
				165					170					175	
Phe	Thr	Gly	His	Arg	Gln	Thr	Ala	Phe	Arg	Glu	Leu	Glu	Arg	Val	Leu
			180					185					190		
Asn	Phe	Pro	Gln	Ser	Asn	Leu	Cys	Leu	Lys	Arg	Glu	Lys	Gln	Asp	Glu
	195						200					205			
Ser	Cys	Ser	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	Pro	Ser	Glu	Leu	Lys	Val	Ser	Ala
	210					215					220				
Asp	Asn	Val	Ser	Leu	Thr	Gly	Ala	Val	Ser	Leu	Ala	Ser	Met	Leu	Thr
225					230					235					240
Glu	Ile	Phe	Leu	Leu	Gln	Gln	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Glu	Pro	Gly	Trp
				245					250					255	
Gly	Arg	Ile	Thr	Asp	Ser	His	Gln	Trp	Asn	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	His
			260					265					270		

ES 2 586 819 T3

Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser
275 280 285

Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His
290 295 300

Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu
305 310 315 320

Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu
325 330 335

Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly
340 345 350

Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln
355 360 365

Trp Ile Gln Val Ser Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp
370 375 380

Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr
385 390 395 400

Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala
405 410 415

Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
420 425 430

<210> 13

<211> 410

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 13

Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser Arg
1 5 10 15

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

Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Trp Leu Thr
35 40 45

Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Gln Arg Gln
50 55 60

ES 2 586 819 T3

Arg	Leu	Val	Ala	Asp	Gly	Leu	Leu	Ala	Lys	Lys	Gly	Cys	Pro	Gln	Ser	65	70	75	80
Gly	Gln	Val	Ala	Ile	Ile	Ala	Asp	Val	Asp	Glu	Arg	Thr	Arg	Lys	Thr	85	90	95	
Gly	Glu	Ala	Phe	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Pro	Asp	Cys	Ala	Ile	Thr	Val	100	105	110	
His	Thr	Gln	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Pro	Asp	Pro	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	115	120	125	
Lys	Thr	Gly	Val	Cys	Gln	Leu	Asp	Asn	Ala	Asn	Val	Thr	Asp	Ala	Ile	130	135	140	
Leu	Ser	Arg	Ala	Gly	Gly	Ser	Ile	Ala	Asp	Phe	Thr	Gly	His	Arg	Gln	145	150	155	160
Thr	Ala	Phe	Arg	Glu	Leu	Glu	Arg	Val	Leu	Asn	Phe	Pro	Gln	Ser	Asn	165	170	175	
Leu	Cys	Leu	Lys	Arg	Glu	Lys	Gln	Asp	Glu	Ser	Cys	Ser	Leu	Thr	Gln	180	185	190	
Ala	Leu	Pro	Ser	Glu	Leu	Lys	Val	Ser	Ala	Asp	Asn	Val	Ser	Leu	Thr	195	200	205	
Gly	Ala	Val	Ser	Leu	Ala	Ser	Met	Leu	Thr	Glu	Ile	Phe	Leu	Leu	Gln	210	215	220	
Gln	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Glu	Pro	Gly	Trp	Gly	Arg	Ile	Thr	Asp	Ser	225	230	235	240
His	Gln	Trp	Asn	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	His	Asn	Ala	Gln	Phe	Tyr	Leu	245	250	255	
Leu	Gln	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Ala	Arg	Ser	Arg	Ala	Thr	Pro	Leu	Leu	260	265	270	
Asp	Leu	Ile	Lys	Thr	Ala	Leu	Thr	Pro	His	Pro	Pro	Gln	Lys	Gln	Ala	275	280	285	
Tyr	Gly	Val	Thr	Leu	Pro	Thr	Ser	Val	Leu	Phe	Ile	Ala	Gly	His	Asp	290	295	300	
Thr	Asn	Leu	Ala	Asn	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Glu	Leu	Asn	Trp	Thr	Leu	305	310	315	320

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

Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser Leu
340 345 350

Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser Leu
355 360 365

Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu Glu
370 375 380

Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile Val
385 390 395 400

Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
405 410

<210> 14
<211> 1901
<212> ADN
5 <213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (16)..(108)

10 <220>
<221> CDS
<222> (188)..(1486)

<220>
<221> característica nueva
<222> (403)..(403)
15 <223> n e s a , c , g , o t

<400> 14

taaggagcag aaaca atg tgg tat tta ctt tgg ttc gtc ggc att ttg ttg 51
Met Trp Tyr Leu Leu Trp Phe Val Gly Ile Leu Leu
1 5 10

atg tgt tcg ctc tcc acc ctt gtg ttg gta tgg ctg gac ccg cgt ctg 99
Met Cys Ser Leu Ser Thr Leu Val Leu Val Trp Leu Asp Pro Arg Leu
15 20 25

aaa agt taa cgaacgtagg cctgatgcgg cgcattagca tcgcatcagg 148
Lys Ser
30

caatcaataa tgtcagatat gaaaagcgg aacatatcg atg aaa gcg atc tta 202
Met Lys Ala Ile Leu
35

atc cca ttt tta tct ctt ctg att ccg tta acc ccg caa tct gca ttc 250
Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr Pro Gln Ser Ala Phe

40										45										50										
gct	cag	agt	gag	ccg	gag	ctg	aag	ctg	gaa	agt	gtg	gtg	att	gtc	agt	298														
Ala	Gln	Ser	Glu	Pro	Glu	Leu	Lys	Leu	Glu	Ser	Val	Val	Ile	Val	Ser															
			55					60					65																	
cgt	cat	ggt	gtg	cgt	gct	cca	acc	aag	gcc	acg	caa	ctg	atg	cag	gat	346														
Arg	His	Gly	Val	Arg	Ala	Pro	Thr	Lys	Ala	Thr	Gln	Leu	Met	Gln	Asp															
		70					75					80																		
gtc	acc	cca	gac	gca	tgg	cca	acc	tgg	ccg	gta	aaa	ctg	ggt	tgg	ctg	394														
Val	Thr	Pro	Asp	Ala	Trp	Pro	Thr	Trp	Pro	Val	Lys	Leu	Gly	Trp	Leu															
	85					90					95																			
aca	ccg	cg	ggt	ggt	gag	cta	atc	gcc	tat	ctc	gga	cat	tac	caa	cgc	442														
Thr	Pro	Arg	Gly	Gly	Glu	Leu	Ile	Ala	Tyr	Leu	Gly	His	Tyr	Gln	Arg															
100					105					110					115															
cag	cgt	ctg	gta	gcc	gac	gga	ttg	ctg	gcg	aaa	aag	ggc	tgc	ccg	cag	490														
Gln	Arg	Leu	Val	Ala	Asp	Gly	Leu	Leu	Ala	Lys	Lys	Gly	Cys	Pro	Gln															
				120					125					130																
tct	ggt	cag	gtc	gcg	att	att	gct	gat	gtc	gac	gag	cgt	acc	cgt	aaa	538														
Ser	Gly	Gln	Val	Ala	Ile	Ile	Ala	Asp	Val	Asp	Glu	Arg	Thr	Arg	Lys															
			135					140					145																	
aca	ggc	gaa	gcc	ttc	gcc	gcc	ggg	ctg	gca	cct	gac	tgt	gca	ata	acc	586														
Thr	Gly	Glu	Ala	Phe	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Pro	Asp	Cys	Ala	Ile	Thr															
		150					155					160																		
gta	cat	acc	cag	gca	gat	acg	tcc	agt	ccc	gat	ccg	tta	ttt	aat	cct	634														
Val	His	Thr	Gln	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Pro	Asp	Pro	Leu	Phe	Asn	Pro															
	165					170					175																			
cta	aaa	act	ggc	gtt	tgc	caa	ctg	gat	aac	gcg	aac	gtg	act	gac	gcg	682														
Leu	Lys	Thr	Gly	Val	Cys	Gln	Leu	Asp	Asn	Ala	Asn	Val	Thr	Asp	Ala															
180					185				190						195															
atc	ctc	agc	agg	gca	gga	ggg	tca	att	gct	gac	ttt	acc	ggg	cat	cgg	730														
Ile	Leu	Ser	Arg	Ala	Gly	Gly	Ser	Ile	Ala	Asp	Phe	Thr	Gly	His	Arg															
				200					205				210																	
caa	acg	gcg	ttt	cg	gaa	ctg	gaa	cg	gtg	ctt	aat	ttt	ccg	caa	tca	778														
Gln	Thr	Ala	Phe	Arg	Glu	Leu	Glu	Arg	Val	Leu	Asn	Phe	Pro	Gln	Ser															
			215					220					225																	
aac	ttg	tgc	ctt	aaa	cgt	gag	aaa	cag	gac	gaa	agc	tgt	tca	tta	acg	826														
Asn	Leu	Cys	Leu	Lys	Arg	Glu	Lys	Gln	Asp	Glu	Ser	Cys	Ser	Leu	Thr															
		230					235					240																		
cag	gca	tta	cca	tcg	gaa	ctc	aag	gtg	agc	gcc	gac	aat	gtc	tca	tta	874														
Gln	Ala	Leu	Pro	Ser	Glu	Leu	Lys	Val	Ser	Ala	Asp	Asn	Val	Ser	Leu															
	245					250					255																			
acc	ggt	gcg	gta	agc	ctc	gca	tca	atg	ctg	acg	gag	ata	ttt	ctc	ctg	922														
Thr	Gly	Ala	Val	Ser	Leu	Ala	Ser	Met	Leu	Thr	Glu	Ile	Phe	Leu	Leu															
	260				265				270						275															
caa	caa	gca	cag	gga	atg	ccg	gag	ccg	ggg	tgg	gga	agg	atc	acc	gat	970														
Gln	Gln	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Glu	Pro	Gly	Trp	Gly	Arg	Ile	Thr	Asp															
				280					285					290																
tca	cac	cag	tgg	aac	acc	ttg	cta	agt	ttg	cat	aac	gcg	caa	ttt	tat	1018														

Ser	His	Gln	Trp	Asn	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	His	Asn	Ala	Gln	Phe	Tyr		
		295						300					305				
ttg	cta	caa	cgc	acg	cca	gag	gtt	gcc	cgc	agc	cgc	gcc	acc	ccg	tta	1066	
Leu	Leu	Gln	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Ala	Arg	Ser	Arg	Ala	Thr	Pro	Leu		
		310					315					320					
tta	gat	ttg	atc	aag	aca	gcg	ttg	acg	ccc	cat	cca	ccg	caa	aaa	cag	1114	
Leu	Asp	Leu	Ile	Lys	Thr	Ala	Leu	Thr	Pro	His	Pro	Pro	Gln	Lys	Gln		
	325					330				335							
gcg	tat	ggg	gtg	aca	tta	ccc	act	tca	gtg	ctg	ttt	atc	gcc	gga	cac	1162	
Ala	Tyr	Gly	Val	Thr	Leu	Pro	Thr	Ser	Val	Leu	Phe	Ile	Ala	Gly	His		
	340				345				350					355			
gat	act	aat	ctg	gca	aat	ctc	ggc	ggc	gca	ctg	gag	ctc	aac	tgg	acg	1210	
Asp	Thr	Asn	Leu	Ala	Asn	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Glu	Leu	Asn	Trp	Thr		
			360						365					370			
ctt	ccc	ggg	cag	ccg	gat	aac	acg	ccg	cca	ggg	ggg	gaa	ctg	gtg	ttt	1258	
Leu	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Glu	Leu	Val	Phe		
		375						380					385				
gaa	cgc	tgg	cgt	ccg	cta	agc	gat	aac	agc	cag	tgg	att	cag	gtt	tcg	1306	
Glu	Arg	Trp	Arg	Arg	Leu	Ser	Asp	Asn	Ser	Gln	Trp	Ile	Gln	Val	Ser		
		390					395					400					
ctg	gtc	ttc	cag	act	tta	cag	cag	atg	cgt	gat	aaa	acg	ccg	ctg	tca	1354	
Leu	Val	Phe	Gln	Thr	Leu	Gln	Gln	Met	Arg	Asp	Lys	Thr	Pro	Leu	Ser		
	405					410					415						
tta	aat	acg	ccg	ccc	gga	gag	gtg	aaa	ctg	acc	ctg	gca	gga	tgt	gaa	1402	
Leu	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Glu	Val	Lys	Leu	Thr	Leu	Ala	Gly	Cys	Glu		
	420				425				430					435			
gag	cga	aat	gcg	cag	ggc	atg	tgt	tcg	ttg	gca	ggg	ttt	acg	caa	atc	1450	
Glu	Arg	Asn	Ala	Gln	Gly	Met	Cys	Ser	Leu	Ala	Gly	Phe	Thr	Gln	Ile		
			440					445					450				
gtg	aat	gaa	gca	cgc	ata	ccg	gcg	tgc	agt	ttg	taa	tgcataaaaa				1496	
Val	Asn	Glu	Ala	Arg	Ile	Pro	Ala	Cys	Ser	Leu							
		455					460										
agagcattca	gttacctgaa	tgctctgagg	ctgatgacaa	acgaagaact	gtctaattgcg											1556	
tagaccggaa	aaggcggttca	cgccgcatcc	ggccactttc	agtttttcctc	tttctcggag											1616	
taactataac	cgtaatagtt	atagccgtaa	ctgtaagcgg	tgctggcgcg	tttaatacaca											1676	
ccattgagga	tagcgccttt	aatattgacg	cctgcctggt	ccagacgctg	cattgacaaa											1736	
ctcacctctt	tggcgggtgtt	caagccaaaa	cgcgcaacca	gcaggctggt	gccaacagaa											1796	
cgcgccacga	ccgcggcatc	actcaccgcc	agcatcgggc	gcgtatcgac	aatcaccaga											1856	
tcgtaatggt	cgttcgccca	ttccagtaat	tgacgcatcc	gatcg												1901	

<210> 15
 <211> 30
 <212> PRT
 5 <213> Escherichia coli

<400> 15

Met Trp Tyr Leu Leu Trp Phe Val Gly Ile Leu Leu Met Cys Ser Leu
1 5 10 15

Ser Thr Leu Val Leu Val Trp Leu Asp Pro Arg Leu Lys Ser
20 25 30

<210> 16

<211> 432

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 16

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

Pro Gln Ser Ala Phe Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser
20 25 30

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

Gln Leu Met Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val
50 55 60

Lys Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu
65 70 75 80

Gly His Tyr Gln Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys
85 90 95

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

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

Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp
130 135 140

Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala
145 150 155 160

Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp
165 170 175

Phe Thr Gly His Arg Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu
180 185 190

Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu
195 200 205

Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala
210 215 220

Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr
225 230 235 240

Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp
245 250 255

Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His
260 265 270

Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser
275 280 285

Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His
290 295 300

Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu
305 310 315 320

Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu
325 330 335

Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly
340 345 350

Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln
355 360 365

Trp Ile Gln Val Ser Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp
370 375 380

Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr
385 390 395 400

Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala
405 410 415

Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
420 425 430

<210> 17

<211> 398

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 17

ES 2 586 819 T3

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

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

<210> 18
 <211> 1197
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 18

atgtggctgc ttttaacaat ggcaagtttg atatctgtac tggggactac acatggtttg	60
tttgaaaaat tacatcctgg aagccctgaa gtgactatga acattagtca gatgattact	120
tattggggat acccaaataga agaataatgaa gttgtgactg aagatgggta tattcttgaa	180
gtcaatagaa ttccttatgg gaagaaaaat tcaggaata caggccagag acctgttgtg	240
tttttgcagc atgggttgct tgcacagacc aaaaactgga tttccaacct gccgaacaac	300
agccttgccct tcattctggc agatgctggg tatgatgtgt ggctgggcaa cagcagagga	360
aacacctggg ccagaagaaa cttgtactat tcaccagatt cagttgaatt ctgggctttc	420

agctttgatg aaatggctaa atatgacctt ccagccacaa tcgacttcat tgtaaagaaa 480
actggacaga agcagctaca ctatgttggc cattcccagg gcaccacat tggttttatt 540
gccttttcca ccaatcccag cctggctaaa agaatacaaa ccttctatgc tctagctcct 600
gttgccactg tgaagtatac aaaaagcctt ataaacaaac ttagatttgt tcctcaatcc 660
ctcttcaagt ttatatgttg tgacaaaata ttctaccac acaacttctt tgatcaattt 720
cttgctactg aagtgtgctc ccgtgagatg ctgaatctcc tttgcagcaa tgccttattt 780
ataatttgtg gatttgacag taagaacttt aacacgagtc gcttggatgt gtatctatca 840
cataatccag caggaacttc tgttcaaaac atgttcatt ggaccaggc tgttaagtct 900
gggaaattcc aagcttatga ctggggaagc ccagttcaga ataggatgca ctatgatcag 960
tcccaacctc cctactacaa tgtgacagcc atgaatgtac caattgcagt gtggaacggt 1020
ggcaaggacc tgttggctga cccccaagat gttggccttt tgcttccaaa actccccaat 1080
cttatttacc acaaggagat tcctttttac aatcacttgg actttatctg ggcaatggat 1140
gcccctcaag aagtttacia tgacattgtt tctatgatat cagaagataa aaagtag 1197

<210> 19
<211> 397
<212> PRT
5 <213> Bos taurus

<400> 19

Met Trp Trp Leu Leu Val Thr Val Cys Phe Ile His Met Ser Gly Asn
1 5 10 15

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

Asn Val Ser Gln Met Ile Ser Tyr Trp Gly Tyr Pro Ser Glu Met His
35 40 45

Lys Val Ile Thr Ala Asp Gly Tyr Ile Leu Gln Val Tyr Arg Ile Pro
50 55 60

His Gly Lys Asn Asn Ala Asn His Leu Gly Gln Arg Pro Val Val Phe
65 70 75 80

Leu Gln His Gly Leu Leu Gly Ser Ala Thr Asn Trp Ile Ser Asn Leu
85 90 95

Pro Lys Asn Ser Leu Gly Phe Leu Leu Ala Asp Ala Gly Tyr Asp Val
100 105 110

Trp Leu Gly Asn Ser Arg Gly Asn Thr Trp Ala Gln Glu His Leu Tyr

ES 2 586 819 T3

115					120					125					
Tyr	Ser	Pro	Asp	Ser	Pro	Glu	Phe	Trp	Ala	Phe	Ser	Phe	Asp	Glu	Met
130						135					140				
Ala	Glu	Tyr	Asp	Leu	Pro	Ser	Thr	Ile	Asp	Phe	Ile	Leu	Arg	Arg	Thr
145					150					155					160
Gly	Gln	Lys	Lys	Leu	His	Tyr	Val	Gly	His	Ser	Gln	Gly	Thr	Thr	Ile
				165					170					175	
Gly	Phe	Ile	Ala	Phe	Ser	Thr	Ser	Pro	Thr	Leu	Ala	Glu	Lys	Ile	Lys
			180					185					190		
Val	Phe	Tyr	Ala	Leu	Ala	Pro	Val	Ala	Thr	Val	Lys	Tyr	Thr	Lys	Ser
		195					200					205			
Leu	Phe	Asn	Lys	Leu	Ala	Leu	Ile	Pro	His	Phe	Leu	Phe	Lys	Ile	Ile
	210					215					220				
Phe	Gly	Asp	Lys	Met	Phe	Tyr	Pro	His	Thr	Phe	Leu	Glu	Gln	Phe	Leu
225					230					235					240
Gly	Val	Glu	Met	Cys	Ser	Arg	Glu	Thr	Leu	Asp	Val	Leu	Cys	Lys	Asn
				245					250					255	
Ala	Leu	Phe	Ala	Ile	Thr	Gly	Val	Asp	Asn	Lys	Asn	Phe	Asn	Met	Ser
			260					265					270		
Arg	Leu	Asp	Val	Tyr	Ile	Ala	His	Asn	Pro	Ala	Gly	Thr	Ser	Val	Gln
		275					280					285			
Asn	Thr	Leu	His	Trp	Arg	Gln	Ala	Val	Lys	Ser	Gly	Lys	Phe	Gln	Ala
	290					295					300				
Phe	Asp	Trp	Gly	Ala	Pro	Tyr	Gln	Asn	Leu	Met	His	Tyr	His	Gln	Pro
305					310					315					320
Thr	Pro	Pro	Ile	Tyr	Asn	Leu	Thr	Ala	Met	Asn	Val	Pro	Ile	Ala	Val
				325					330					335	
Trp	Ser	Ala	Asp	Asn	Asp	Leu	Leu	Ala	Asp	Pro	Gln	Asp	Val	Asp	Phe
			340					345					350		
Leu	Leu	Ser	Lys	Leu	Ser	Asn	Leu	Ile	Tyr	His	Lys	Glu	Ile	Pro	Asn
		355					360					365			

ES 2 586 819 T3

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

Tyr Asn Glu Ile Val Ser Leu Met Ala Glu Asp Lys Lys
385 390 395

<210> 20
<211> 1194
<212> ADN
<213> Bos taurus

<400> 20

```
atgtggtggc tacttgtaac agtgtgtttc atccacatgt ctggaaatgc attttgtttc      60
cttggaaaaa ttgctaagaa ccctgaagcc agtatgaatg ttagtcagat gatttcctac      120
tggggctacc caagtgagat gcataaagtt ataactgagg atggttatat ccttcaggtc      180
tatcggattc ctcatggaaa gaataatgct aatcatttag gtcagagacc tgttggtgtt      240
ctgcagcatg gtcttcttgg atcagccaca aactggattt ccaacctgcc caagaacagc      300
ctgggcttcc tcctggcaga tgctggttat gacgtgtggc tggggaacag cagaggaaac      360
acctgggccc aggaacattt atactattca ccagactccc cggaattctg ggctttcagc      420
tttgatgaaa tggcggaata tgaccttcca tctacaattg atttcatctt aaggagaaca      480
ggacagaaga agctacacta tgttggccat tcccaaggca ccaccattgg ttttatcgcc      540
ttttctacca gtcccacatt ggctgaaaaa atcaaagtct tctatgcatt agccccagtt      600
gccacagtga agtacaccaa gagcctgttt aacaaacttg cacttattcc tcacttcctc      660
ttcaagatta tatttgggtg caaaatgttc taccacaca cttttttgga acaatttctt      720
ggtgttgaaa tgtgctcccg tgagacactg gatgtccttt gtaagaatgc cttgtttgcc      780
attactggag ttgacaataa aaacttcaac atgagtcgct tagatgtgta tatagcacat      840
aatccagcag gaacttctgt tcaaacaccc ctccactgga gacaggctgt taagtctggg      900
aaattccaag cttttgactg gggagcccca tatcagaacc taatgcatta tcatcagccc      960
acacctccca tctacaattt aacagccatg aatgtcccaa ttgcagtatg gagtgtgac      1020
aatgacctgt tggctgacct tcaggatgtt gactttctgc tttcaaaact ctctaacttc      1080
atttaccaca aggaaattcc aaattacaat cacttggact ttatctgggc aatggatgca      1140
cctcaagaag ttacaatga aattgtttct ttgatggccg aagacaaaaa gtag      1194
```

<210> 21
<211> 395
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 21

Met Trp Leu Leu Leu Val Thr Ser Val Leu Ser Ala Phe Gly Gly Ala

ES 2 586 819 T3

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

Ala Leu Phe Ile Phe Cys Gly Phe Asp Lys Lys Asn Leu Asn Val Ser
260 265 270

Arg Phe Asp Val Tyr Leu Gly His Asn Pro Ala Gly Thr Ser Thr Gln
275 280 285

Asp Leu Phe His Trp Ala Gln Leu Ala Lys Ser Gly Lys Leu Gln Ala
290 295 300

Tyr Asn Trp Gly Ser Pro Leu Gln Asn Met Leu His Tyr Asn Gln Lys
305 310 315 320

Thr Pro Pro Tyr Tyr Asp Val Ser Ala Met Thr Val Pro Ile Ala Val
325 330 335

Trp Asn Gly Gly His Asp Ile Leu Ala Asp Pro Gln Asp Val Ala Met
340 345 350

Leu Leu Pro Lys Leu Pro Asn Leu Leu Tyr His Lys Glu Ile Leu Pro
355 360 365

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

Tyr Asn Glu Ile Val Thr Met Met Ala Glu Asp
385 390 395

<210> 22
<211> 1188
<212> ADN
<213> Mus musculus

5

<400> 22
atgtggctgc tattagtaac aagtgtgcta tctgcatttg gaggtgcaca tggcctattt 60
ggaaaactgg gtcccaaaaa ccctgaagca aacatgaatg ttagtcagat gataacttac 120
tggggatatc caagtgagga atatgaagtt gttactgaag atggctacat tctgggggtc 180
tatagaattc cttatgggaa gaaaaattct gagaatatcg gcaagagacc tgtggcatat 240
ttgcagcatg gtttgattgc atcagccaca aactggatta caaatctgcc aaacaacagc 300
ctggccttca ttctagcaga tgctggctat gatgtgtggc tggggaacag tcgaggggaat 360
acatggtccc ggaaaaatgt atactattca ccagactcag ttgaattctg ggctttcagc 420
tttgatgaaa tggctaaata tgaccttcca gccaccatag acttcattgt acagaaaact 480
ggacaagaga agatacacta tgttgggtcac tctcagggca ccactatcgg ttttattgcc 540
ttttctacca atcctgctct ggctaaaaaa atcaagaggt tttatgcatt agctccagtt 600
gctactgtga agtatacaga aagtcccttt aaaaagattt cacttattcc taagtttctt 660

ctcaaggtga tatttggtaa caaaatgttc atgccccaca actacttaga tcaatttctt 720
 ggtacggaag tgtgctcagc ggagctgcta gatcttctct gcagcaacgc ttatttcac 780
 ttctgtggat ttgacaagaa aaacttaa atgtgagtcgct ttgatgtgta tctagggcat 840
 aatccagcag gaacatctac tcaagacctt ttccactggg cacagcttgc taaatctggg 900
 aagcttcaag cctataactg gggaagtcca ttacagaaca tgttacacta caatcagaaa 960
 acgcctccct actatgatgt gtcagccatg accgtgccaa ttgcagtgtg gaacgggtggc 1020
 catgacatcc tggctgatcc ccaagatgtc gcaatgctgc ttcccaaact ccccaacctt 1080
 ctgtaccata aggagattct tccctacaat cacctggact tcatctgggc gatggatgcg 1140
 cctcaagagg ttacaaatga gatagttacc atgatggcag aagactaa 1188

<210> 23
 <211> 395
 <212> -PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 23

Met Trp Leu Leu Leu Ile Thr Ser Val Ile Ser Thr Phe Gly Gly Ala
 1 5 10 15

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

Asn Ile Ser Gln Met Ile Thr Tyr Trp Gly Tyr Pro Cys Gln Glu Tyr
 35 40 45

Glu Val Val Thr Glu Asp Gly Tyr Ile Leu Gly Val Tyr Arg Ile Pro
 50 55 60

His Gly Lys Asn Asn Ser Glu Asn Ile Gly Lys Arg Pro Val Val Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln His Gly Leu Ile Ala Ser Ala Thr Asn Trp Ile Ala Asn Leu
 85 90 95

Pro Asn Asn Ser Leu Ala Phe Met Leu Ala Asp Ala Gly Tyr Asp Val
 100 105 110

Trp Leu Gly Asn Ser Arg Gly Asn Thr Trp Ser Arg Lys Asn Val Tyr
 115 120 125

Tyr Ser Pro Asp Ser Val Glu Phe Trp Ala Phe Ser Phe Asp Glu Met
 130 135 140

Ala Lys Tyr Asp Leu Pro Ala Thr Ile Asn Phe Ile Val Gln Lys Thr
145 150 155 160

Gly Gln Glu Lys Ile His Tyr Val Gly His Ser Gln Gly Thr Thr Ile
165 170 175

Gly Phe Ile Ala Phe Ser Thr Asn Pro Thr Leu Ala Lys Lys Ile Lys
180 185 190

Thr Phe Tyr Ala Leu Ala Pro Val Ala Thr Val Lys Tyr Thr Gln Ser
195 200 205

Pro Leu Lys Lys Ile Ser Phe Ile Pro Thr Phe Leu Phe Lys Leu Met
210 215 220

Phe Gly Lys Lys Met Phe Leu Pro His Thr Tyr Phe Asp Asp Phe Leu
225 230 235 240

Gly Thr Glu Val Cys Ser Arg Glu Val Leu Asp Leu Leu Cys Ser Asn
245 250 255

Thr Leu Phe Ile Phe Cys Gly Phe Asp Lys Lys Asn Leu Asn Val Ser
260 265 270

Arg Phe Asp Val Tyr Leu Gly His Asn Pro Ala Gly Thr Ser Val Gln
275 280 285

Asp Phe Leu His Trp Ala Gln Leu Val Arg Ser Gly Lys Phe Gln Ala
290 295 300

Phe Asn Trp Gly Ser Pro Ser Gln Asn Met Leu His Tyr Asn Gln Lys
305 310 315 320

Thr Pro Pro Glu Tyr Asp Val Ser Ala Met Thr Val Pro Val Ala Val
325 330 335

Trp Asn Gly Gly Asn Asp Ile Leu Ala Asp Pro Gln Asp Val Ala Met
340 345 350

Leu Leu Pro Lys Leu Ser Asn Leu Leu Phe His Lys Glu Ile Leu Ala
355 360 365

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

Tyr Asn Glu Met Ile Ser Met Met Ala Glu Asp
385 390 395

<210> 24
<211> 1188
<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 24

```

atgtggctgt tattaataac aagtgtgata tcaacattcg gaggtgcaca tggcctatTT 60
ggaaaactgg gtcctggaaa ccctgaagca aatatgaata ttagtcagat gataacttac 120
tggggatatc catgtcaaga atatgaagtt gttactgaag atggctacat tctgggggtc 180
tacagaattc ctcatgggaa gaataattct gaaaatatag gcaagagacc tgtggtgtat 240
ttgcagcatg gtttgatcgc atcagccaca aactggattg caaatctacc aaacaacagc 300
ctggccttta tgctagcaga cgctggctat gatgtgtggc tggggaacag tcgaggaaat 360
acatggtcca ggaaaaatgt atactactca ccagactcag ttgaattctg ggctttcagc 420
tttgatgaaa tggctaaata tgaccttccc gccacaataa acttcattgt acagaaaact 480
ggacaagaga agatacacta tgttgggtcat tctcagggca ccactattgg tttcattgcc 540
ttttctacca atcctacact ggccaaaaaa atcaagacgt tttatgcatt agctccagtt 600
gctaccgtga agtatacaca aagtcccttg aaaaagattt catttattcc tacatttctt 660
ttcaagctta tgtttggcaa gaaaatgttc ctgccccaca cctacttga tgactttctt 720
ggtaccgaag tgtgtcacg ggaggttcta gatcttctct gcagcaacac tttattcatc 780
ttctgtggat ttgacaagaa aaacttaa atgtgagtcgtt ttgatgtgta tctagggcat 840
aatccagcag ggacatctgt tcaagacttt ctccactggg cacagcttgt tagatctggg 900
aaatttcaag cettcaactg gggaagccca tcccagaaca tgttacacta caaccagaaa 960
acgcctcctg aatatgatgt gtcagccatg actgtgccag ttgcagtgtg gaacggtggc 1020
aatgacatcc tggctgatcc ccaagatgtc gccatgctgc ttcccaaact ctccaacctc 1080
ctgttccata aggagattct tgcctacaat cacctggact tcatctgggc aatggatgcc 1140
cctcaagagg ttacaatga gatgatttcc atgatggcag aagactaa 1188

```

<210> 25

<211> 398

<212> PRT

<213> Canis lupus familiaris

<400> 25

Met Trp Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ser Val Ile Ser Thr Leu Gly Thr
1 5 10 15

Thr His Gly Leu Phe Gly Lys Leu His Pro Thr Asn Pro Glu Val Thr
20 25 30

5

Met	Asn	Ile	Ser	Gln	Met	Ile	Thr	Tyr	Trp	Gly	Tyr	Pro	Ala	Glu	Glu
	35					40						45			
Tyr	Glu	Val	Val	Thr	Glu	Asp	Gly	Tyr	Ile	Leu	Gly	Ile	Asp	Arg	Ile
	50					55					60				
Pro	Tyr	Gly	Arg	Lys	Asn	Ser	Glu	Asn	Ile	Gly	Arg	Arg	Pro	Val	Ala
	65				70					75					80
Phe	Leu	Gln	His	Gly	Leu	Leu	Ala	Ser	Ala	Thr	Asn	Trp	Ile	Ser	Asn
				85					90					95	
Leu	Pro	Asn	Asn	Ser	Leu	Ala	Phe	Ile	Leu	Ala	Asp	Ala	Gly	Tyr	Asp
			100					105					110		
Val	Trp	Leu	Gly	Asn	Ser	Arg	Gly	Asn	Thr	Trp	Ala	Arg	Arg	Asn	Leu
		115					120					125			
Tyr	Tyr	Ser	Pro	Asp	Ser	Val	Glu	Phe	Trp	Ala	Phe	Ser	Phe	Asp	Glu
	130					135					140				
Met	Ala	Lys	Tyr	Asp	Leu	Pro	Ala	Thr	Ile	Asp	Phe	Ile	Leu	Lys	Lys
	145				150					155					160
Thr	Gly	Gln	Asp	Lys	Leu	His	Tyr	Val	Gly	His	Ser	Gln	Gly	Thr	Thr
				165					170					175	
Ile	Gly	Phe	Ile	Ala	Phe	Ser	Thr	Asn	Pro	Lys	Leu	Ala	Lys	Arg	Ile
			180					185					190		
Lys	Thr	Phe	Tyr	Ala	Leu	Ala	Pro	Val	Ala	Thr	Val	Lys	Tyr	Thr	Glu
		195					200					205			
Thr	Leu	Leu	Asn	Lys	Leu	Met	Leu	Val	Pro	Ser	Phe	Leu	Phe	Lys	Leu
	210					215					220				
Ile	Phe	Gly	Asn	Lys	Ile	Phe	Tyr	Pro	His	His	Phe	Phe	Asp	Gln	Phe
	225				230					235					240
Leu	Ala	Thr	Glu	Val	Cys	Ser	Arg	Glu	Thr	Val	Asp	Leu	Leu	Cys	Ser
				245					250					255	
Asn	Ala	Leu	Phe	Ile	Ile	Cys	Gly	Phe	Asp	Thr	Met	Asn	Leu	Asn	Met
			260					265					270		
Ser	Arg	Leu	Asp	Val	Tyr	Leu	Ser	His	Asn	Pro	Ala	Gly	Thr	Ser	Val
		275					280					285			

Gln Asn Val Leu His Trp Ser Gln Ala Val Lys Ser Gly Lys Phe Gln
290 295 300

Ala Phe Asp Trp Gly Ser Pro Val Gln Asn Met Met His Tyr His Gln
305 310 315 320

Ser Met Pro Pro Tyr Tyr Asn Leu Thr Asp Met His Val Pro Ile Ala
325 330 335

Val Trp Asn Gly Gly Asn Asp Leu Leu Ala Asp Pro His Asp Val Asp
340 345 350

Leu Leu Leu Ser Lys Leu Pro Asn Leu Ile Tyr His Arg Lys Ile Pro
355 360 365

Pro Tyr Asn His Leu Asp Phe Ile Trp Ala Met Asp Ala Pro Gln Ala
370 375 380

Val Tyr Asn Glu Ile Val Ser Met Met Gly Thr Asp Asn Lys
385 390 395

<210> 26
<211> 1197
<212> ADN
<213> Canis lupus familiaris

5

<400> 26
atgtggctgc tattaacagc ggcgagtgtg atatctacac ttggaaccac acatggttta 60
tttgaaaat tacatccac aaaccctgaa gtgaccatga atataagtca gatgatcacc 120
tactgggat acccagctga ggaatatgaa gttgtgaccg aagacgggta tacccttggg 180
atcgacagaa ttccttatgg gaggaataa tcagagaata taggccggag acctgttgca 240
tttttgcaac acggtttgct cgcacagcc acaaactgga tctccaacct gcccaacaac 300
agcctggcct tcacctggc cgacgccggg tacgacgtgt ggctggggaa cagcaggggc 360
aacacctggg ccaggaggaa tctgtactac tcgcccgaact ccgtcgaatt ctgggctttc 420
agctttgacg agatggctaa atatgacctt cccgccacca ttgacttcat cttgaagaaa 480
acgggacagg acaagctaca ctacgttggc cattcccagg gcaccaccat tggtttcac 540
gccttttcca ccaatcccaa gctggcgaaa cggatcaaaa ctttctatgc attagctccc 600
gttgccaccg tgaagtacac cgaaaccctg ttaaacaac tcatgctcgt cccttcgttc 660
ctcttcaagc ttatatattg aaacaaaata ttctaccac accacttctt tgatcaattt 720
ctcgccaccg aggtatgctc ccgcgagacg gtggatctcc tctgcagcaa cgccctgttt 780
atcatttgtg gatttgacac tatgaacttg aacatgagtc gcttggatgt gtatctgtca 840

cataatccag caggaacatc ggttcagaac gtgctccact ggtcccaggc tgttaagtct 900
 gggaagttcc aagcttttga ctggggaagc ccagttcaga acatgatgca ctatcatcag 960
 agcatgcctc cctactacaa cctgacagac atgcatgtgc caatcgcagt gtggaacggt 1020
 ggcaacgact tgctggccga ccctcacgat gttgaccttt tgctttccaa gctccccaat 1080
 ctcatttacc acaggaagat tcctccttac aatcacttgg actttatctg ggccatggat 1140
 gcccctcaag cggtttacaa tgaaattggt tccatgatgg gaacagataa taagtag 1197

<210> 27
 <211> 297
 <212> PRT
 5 <213> Aspergillus niger

<400> 27

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

ES 2 586 819 T3

Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg Asn Asp Gly Tyr Ser
180 185 190

Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Val Gly Asn Tyr Ala Leu
195 200 205

Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala Asn Phe Arg Val Thr
210 215 220

His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro Met Asp Phe Gly Phe
225 230 235 240

Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Thr Gly Ala Ser
245 250 255

Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Leu Ile Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ala
260 265 270

Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Asp Val Leu Ala His Leu Trp Tyr
275 280 285

Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu
290 295

<210> 28

<211> 526

<212> PRT

5 <213> Ricinus communis

<400> 28

Met Asp Asp Ala Gly Lys Ile Thr Ser Thr Ser His Leu Ile Val Ser
1 5 10 15

Pro Asp Glu Gly Thr Phe Leu Asp Leu Phe Lys His Ile Val Leu Ser
20 25 30

Asp Leu Gly Ser Gly Ala Lys Phe Phe Arg Ala Ser Asp Gln Arg Val
35 40 45

Pro Ala Thr Ala Ala Tyr Tyr Ser Arg Trp Pro Val Ser Val Phe Ile
50 55 60

Cys Lys Ile Leu Gln Leu Phe Gln Met Pro Ala Ala Met Leu Gly His
65 70 75 80

Leu Thr Asp Phe Leu Leu Asn Phe Tyr Tyr Gln Asn His Gly Phe Leu
85 90 95

Gly Ile Leu Arg Asn Ile Phe Leu Ile Arg Leu Lys Ile Pro Lys Arg
 100 105 110

Gly Glu Ala Asp Phe Ile Ser Thr Ile Gly Tyr Leu Asp Ser Arg Met
 115 120 125

Asp Leu His Gly Thr Pro Met Val Ser His Gln Ala Asp Glu Val Ile
 130 135 140

Ser Asn Ala Asp Asn Pro Ser Leu Lys Glu Gly His Asn Ser Lys Ile
 145 150 155 160

Lys Gly Ala Leu Gly Asn Arg Ser Leu Met Asp Leu Cys Ile Met Ala
 165 170 175

Ser Lys Leu Ala Tyr Glu Asn Thr Lys Val Val Glu Arg Val Val Ala
 180 185 190

Glu His Trp Lys Met His Phe Val Ala Asp Tyr Gly Gly Met Asn Tyr
 195 200 205

Phe Gln Asp Ala Arg Asn Thr His Ala Phe Ile Phe Cys Asp Lys Pro
 210 215 220

Lys Asp Ala Asn Leu Ile Val Ile Ser Phe Arg Gly Thr Gly Pro Phe
 225 230 235 240

Ser Ile Pro Asn Trp Cys Thr Asp Phe Asp Phe Ser Leu Val Gly Leu
 245 250 255

Gly Asp Ala Gly Ser Val His Val Gly Phe Leu Glu Ala Met Gly Leu
 260 265 270

Gly His Arg Asn Ser Ile Ser Ser Phe Glu Thr Ser Ile Asn Thr Lys
 275 280 285

Ser Pro Gly Ser Ile Thr Glu Leu Arg Lys Glu Ser Glu Met Ala Pro
 290 295 300

Asp His Leu Val Trp Ala Tyr Asp Gly Val Tyr Phe Leu Ala Ala Ser
 305 310 315 320

Thr Leu Lys Gly Leu Leu Lys Asp His Lys Asn Ala Lys Phe Val Val
 325 330 335

Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Ile Leu Phe Thr Cys Ile
 340 345 350

Leu Glu Ile Gln Gln Glu Thr Glu Val Leu Asp Arg Leu Leu Asn Val
355 360 365

Tyr Thr Phe Gly Gln Pro Arg Ile Gly Asn Tyr Asn Leu Gly Tyr Phe
370 375 380

Met Gln Asn Arg Leu Asn Phe Pro Glu Arg Arg Tyr Phe Arg Val Val
385 390 395 400

Tyr Cys Asn Asp Met Val Pro Arg Val Pro Phe Asp Asp Val Phe Phe
405 410 415

Thr Phe Glu His Phe Gly Thr Cys Ile Tyr Tyr Asp Ser Arg Phe Phe
420 425 430

Gly Tyr Phe Thr Lys Glu Glu Pro Ser Arg Asn Pro Phe Gly Ile Glu
435 440 445

Asn Ala Ile Ser Ala His Ile Thr Ala Trp Trp Glu Leu Trp Arg Ser
450 455 460

Phe Ile Leu Asn His Val Tyr Gly Ala Glu Tyr Lys Glu Thr Trp Glu
465 470 475 480

Ser Arg Met Phe Arg Ile Leu Gly Leu Phe Leu Pro Gly Val Ala Ala
485 490 495

His Ser Pro Val Asn Tyr Val Asn Ser Val Arg Leu Gly Arg Glu Leu
500 505 510

Ala Ile Pro Leu Met Ser Leu Lys Met Met Ala Gln Gly Tyr
515 520 525

<210> 29
<211> 1870
<212> ADN
<213> Ricinus communis

5

<400> 29

ctaaagccat ggatgatgct ggtaaaatca cttccacaag ccatctcata gtgagcccag	60
atgaaggaac ctttttggac ctgttcaagc acattgtgct gaggatgttg ggcagtggag	120
ccaaattctt tagggcttca gatcagagag tgcctgctac ggcagcatat tatagcaggt	180
ggcctgtttc agttttcatt tgcaaaatac ttcaactttt ccagatgccca gccgcgatgc	240
ttggtcatct tactgatttc ttgctcaact tctattatca gaatcatggc ttccttggca	300
tactcagaaa catcttctta ataagactga agataccaaa aagaggtgaa gccgacttta	360

```

taagcacgat aggggtattta gattcacgaa tggaccttca cgggacgcca atgggtgtcgc      420
accaggcgaga cgaagtgatt tcaaatgcag ataatccaag cctgaaagaa gggcacaatt      480
caaagataaa aggagccctt gggaaccgat ctctcatgga tctttgtatc atggcgtcaa      540
agcttgctta tgaaaatacc aaagttgttg aaagagtagt tgccgaacat tgggaagatgc      600
atttcgtggc tgactatggg ggcatagaatt atttccaaga tgcaaggaac actcatgcgt      660
tcatcttttg tgacaagcca aaagatgcaa acttgatagt gatcagcttc agaggcacag      720
gaccttttag tataccaaat tgggtgtactg attttgattt ctcttagttt ggggtgggag      780
acgcaggaag tgtccatggt ggattcttag aagcaatggg tttgggtcac agaaattcta      840
tttccagctt tgagactagc attaacacaa agtcgccagg aagcataacc gaattaagga      900
aagagtccga gatggctccg gaccacttgg tatgggcata tgatgggtgtt tactttcttg      960
cggcatcgac gctcaaggga ttactaaaag accacaagaa cgcaaaattt gtagtcactg     1020
ggcatagctt aggtgggtgca cttgctatac tgttcacatg cattcttgag atacagcagg     1080
agacagaggt gcttgacaga ctgctaaatg tatacacatt cggacagcct aggattggga     1140
actataatct tggttacttc atgcagaacc gtctcaattt tccagaacgt aggtatttca     1200
gggtgggttta ctgcaatgac atgggttcta gggtgccttt cgatgatgtc ttcttcactt     1260
tcgagcattt cggaacctgc atttactatg atagccgctt ctttggctac tttaccaaaag     1320
aggagcccag cagaaaccct ttccggaatag aaaatgccat cagtgcgcac atcaccgcct     1380
ggtgggagct ctggagaagt ttcatattaa atcacgtata tggcgagaaa tacaaggaga     1440
cctgggaatc cagaatgttc aggatattgg gactgtttct ccctgggtgtt gcagctcata     1500
gtcctgtgaa ttatgtcaat tctgtcaggc ttggaaggga gcttgcaatt cccttgatgt     1560
ctctgaaaat gatggcacia gggtactaga attatcggtt taaagtctaa gagatgatca     1620
ttaatgataa atgggttact ctttgccaaa aaaagaaaaa taatcaaaag gcttacgcta     1680
ttgtaataaa aggatagctg tttcatgaac aggtcgccta gggttgtggg gtggagcttt     1740
gatatgcata tatgcatata tggcctgttt gtttgtcagt ttgtttttct ctttaacaaa     1800
aatgaaatgc ggtagttcaa taaaaggaa cgttgagtag tttttgggtt gccaaaaaaa     1860
aaaaaaaaaa                                     1870

```

<210> 30
 <211> 334
 <212> PRT
 5 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 30

Met Lys Leu Ser Thr Ile Leu Phe Thr Ala Cys Ala Thr Leu Ala Ala
 1 5 10 15

ES 2 586 819 T3

Ala Leu Pro Ser Pro Ile Thr Pro Ser Glu Ala Ala Val Leu Gln Lys
20 25 30

Arg Val Tyr Thr Ser Thr Glu Thr Ser His Ile Asp Gln Glu Ser Tyr
35 40 45

Asn Phe Phe Glu Lys Tyr Ala Arg Leu Ala Asn Ile Gly Tyr Cys Val
50 55 60

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

Ala His Phe Pro Asn Val Glu Leu Ile Glu Glu Phe His Asp Pro Arg
85 90 95

Leu Ile Phe Asp Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val Asp His Ala Ser Lys
100 105 110

Gln Ile Tyr Leu Val Ile Arg Gly Thr His Ser Leu Glu Asp Val Ile
115 120 125

Thr Asp Ile Arg Ile Met Gln Ala Pro Leu Thr Asn Phe Asp Leu Ala
130 135 140

Ala Asn Ile Ser Ser Thr Ala Thr Cys Asp Asp Cys Leu Val His Asn
145 150 155 160

Gly Phe Ile Gln Ser Tyr Asn Asn Thr Tyr Asn Gln Ile Gly Pro Lys
165 170 175

Leu Asp Ser Val Ile Glu Gln Tyr Pro Asp Tyr Gln Ile Ala Val Thr
180 185 190

Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Ala Ala Leu Leu Phe Gly Ile Asn Leu
195 200 205

Lys Val Asn Asp His Asp Pro Leu Val Val Thr Leu Gly Gln Pro Ile
210 215 220

Val Gly Asn Ala Gly Phe Ala Asn Trp Val Asp Lys Leu Phe Phe Gly
225 230 235 240

Gln Glu Asn Pro Asp Val Ser Lys Val Ser Lys Asp Arg Lys Leu Tyr
245 250 255

Arg Ile Thr His Arg Gly Asp Ile Val Pro Gln Val Pro Phe Trp Asp

260 265 270

Gly Tyr Gln His Cys Ser Gly Glu Val Phe Ile Asp Trp Pro Leu Ile
275 280 285

His Pro Pro Leu Ser Asn Val Val Met Cys Gln Gly Gln Ser Asn Lys
290 295 300

Gln Cys Ser Ala Gly Asn Thr Leu Leu Gln Gln Val Asn Val Ile Gly
305 310 315 320

Asn His Leu Gln Tyr Phe Val Thr Glu Gly Val Cys Gly Ile
325 330

<210> 31
<211> 1005
<212> ADN
<213> Yarrowia lipolytica

5

<400> 31

atgaagcttt ccaccatcct tttcacagcc tgcgctaccc tggctgccgc cctcccttcc 60

cccatcactc cttctgaggc cgcagttctc cagaagcgag tgtacacctc taccgagacc 120

tctcacattg accaggagtc ctacaacttc tttgagaagt acgcccgact cgcaaacatt 180

ggatattgtg ttgggtcccg cactaagatc ttcaagccct tcaactgtgg cctgcaatgt 240

gcccacttcc ccaacgttga gctcatcgag gagttccaag acccccgtct catctttgat 300

gtttctggtt acctcgctgt tgatcatgcc tccaagcaga tctaccttgt tattcgagga 360

accactctc tggaggacgt cataaccgac atccgaatca tgcaggctcc tctgacgaac 420

tttgatcttg ctgctaacat ctcttctact gctacttgtg atgactgtct tgtccacaat 480

ggcttcatcc agtcctacaa caacacctac aatcagatcg gcccgaagct cgactctgtg 540

attgagcagt atcccgacta ccagattgct gtcaccggtc actctctcgg aggagctgca 600

gcccttctgt tcggaatcaa cctcaagggtt aacggccacg atcccctcgt tgttactctt 660

ggtcagccca ttgtcggtaa cgtggcttt gctaactggg tcgataaact cttctttggc 720

caggagaacc ccgatgtctc caaggtgtcc aaagaccgaa agctctaccg aatcacccac 780

cgaggagata tcgtccctca agtgcccttc tgggacgggt accagcactg ctctggtgag 840

gtctttattg actggcccct gatccaccct cctctctcca acgttgtcat gtgccagggc 900

cagagcaata aacagtgtc tgccggtaac actctgtctc agcaggtcaa tgtgattgga 960

aaccatctgc agtacttcgt caccgagggt gtctgtggta tctaa 1005

<210> 32
<211> 366
<212> PRT
<213> Rhizopus arrhizus

10

<220>
<221> característica nueva
<223> Rhizopus arrhizus = Rhizopus oryzae

<400> 32

Val Pro Val Ser Gly Lys Ser Gly Ser Ser Asn Thr Ala Val Ser Ala
1 5 10 15

Ser Asp Asn Ala Ala Leu Pro Pro Leu Ile Ser Ser Arg Cys Ala Pro
20 25 30

Pro Ser Asn Lys Gly Ser Lys Ser Asp Leu Gln Ala Glu Pro Tyr Asn
35 40 45

Met Gln Lys Asn Thr Glu Trp Tyr Lys Ser His Gly Gly Asn Leu Thr
50 55 60

Ser Ile Gly Lys Arg Asp Asp Asn Leu Val Gly Gly Met Thr Leu Asp
65 70 75 80

Leu Pro Ser Gly Ala Pro Pro Ile Ser Leu Ser Ser Ser Thr Asn Ser
85 90 95

Ala Ser Asp Gly Gly Lys Val Val Ala Ala Thr Thr Ala Gln Ile Gln
100 105 110

Glu Phe Thr Lys Tyr Ala Gly Ile Ala Ala Thr Ala Tyr Cys Arg Ser
115 120 125

Val Val Pro Gly Asn Lys Trp Asp Cys Val Gln Cys Gln Lys Trp Val
130 135 140

Pro Asp Gly Lys Ile Ile Thr Thr Phe Thr Ser Leu Leu Ser Asp Thr
145 150 155 160

Asn Gly Tyr Val Leu Arg Ser Asp Lys Gln Lys Thr Ile Tyr Leu Val
165 170 175

Phe Arg Gly Thr Asn Ser Phe Arg Ser Ala Ile Thr Asp Ile Val Phe
180 185 190

Asn Phe Ser Asp Tyr Lys Pro Val Lys Gly Ala Lys Val His Ala Gly
195 200 205

Phe Leu Ser Ser Tyr Glu Gln Val Val Asn Asp Tyr Phe Pro Val Val
210 215 220

Gln Glu Gln Leu Thr Ala His Pro Thr Tyr Lys Val Ile Val Thr Gly
225 230 235 240

His Ser Leu Gly Gly Ala Gln Ala Leu Leu Ala Gly Met Asp Leu Tyr
245 250 255

Gln Arg Glu Pro Gly Leu Ser Pro Lys Asn Leu Ser Ile Phe Thr Val
260 265 270

Gly Gly Pro Arg Val Gly Asn Pro Thr Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ser
275 280 285

Thr Gly Ile Pro Phe Gln Arg Thr Val His Lys Arg Asp Ile Val Pro
290 295 300

His Val Pro Pro Gln Ser Phe Gly Phe Leu His Pro Gly Val Glu Ser
305 310 315 320

Trp Met Lys Ser Gly Thr Ser Asn Val Gln Ile Cys Thr Ser Glu Ile
325 330 335

Glu Thr Lys Asp Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Ile Leu
340 345 350

Asp His Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Asn Glu Gly Ser Cys Leu
355 360 365

<210> 33

<211> 1101

<212> ADN

5 <213> Rhizopus arrhizus

<220>

<221> característica nueva

<223> Rhizopus arrhizus = Rhizopus oryzae

<400> 33

gttctctgttt ctggtaaatc tggatcttcc aacacgcgcg tctctgcatc tgacaatgct 60

gccctccctc ctctcatctc cagccgttgt gctcctcctt ctaacaaggg aagtaaaagc 120

gatctccaag ctgaacctta caacatgcaa aagaatacag aatggtataa gtcccatggt 180

ggcaacctga catccatcgg aaagcgtgat gacaacttgg ttggtggcat gactttggac 240

ttaccacagcg gtgctcctcc tatcagcctc tctagctcta ccaacagcgc ctctgatggt 300

ggtaagggtt ttgctgctac tactgctcag atccaagagt tcaccaagta tgctggtatc 360

10 gctgccactg cctactgtcg ttctgttgtc cctggtaaca agtgggattg tgtccaatgt 420

ES 2 586 819 T3

caaaagtggg ttctgatgg caagatcatc actaccttta cctccttgct ttccgataca	480
aatgggttacg tcttgagaag tgataaacia aagaccattt atcttgtttt ccgtgggtacc	540
aactccttca gaagtgccat cactgatata gtcttcaact tttctgacta caagcctgtc	600
aagggcgcca aagttcatgc tggtttcctt tctcttatg agcaagttgt caatgactat	660
ttccctgtcg ttcaagaaca attgaccgcc caccctactt ataaggtcat cgttaccggt	720
cactcactcg gtgggtgcaca agctttgctt gccgggatgg atctctacca acgtgaacca	780
gggttgctc ccaagaattt gagcatcttc actgtcgggtg gtcctcgtgt tggtaacccc	840
acctttgctt actatggtga atccaccggt atccctttcc aacgtaccgt tcacaagaga	900
gatatcgctt ctcacgttcc tctcaatcc ttcggattcc ttcattcccg tgttgaaatct	960
tggatgaagt ctggtacttc caacgttcaa atctgtactt ctgaaattga aaccaaggat	1020
tgcagtaact ctatcggtcc tttcacctct atccttgacc acttgagtta ctttgatata	1080
aacgaaggaa gctgtttgta a	1101

REIVINDICACIONES

1. Un complemento para piensos que comprende una fitasa y una enzima lipolítica, en el que dicha enzima lipolítica tiene actividad de lipasa a un pH en el intervalo de alrededor de pH 1,5 a alrededor de pH 3,5.
- 5 2. El complemento para piensos según la reivindicación 1, en el que dicha enzima lipolítica comprende un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID N°: 7 o SEQ ID N°: 8 o un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad con la misma; o un polipéptido que se produce mediante la expresión de una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de SEQ ID N°: 9 o 10; o una secuencia que difiere de SEQ ID N°: 9 o 10 debido a la degeneración del código genético; o una secuencia que tiene al menos 70% de identidad con SEQ ID N°: 9 o 10.
- 10 3. El complemento para piensos según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la enzima lipolítica se produce en una célula de *Trichoderma reesei*.
- 15 4. El complemento para piensos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la fitasa comprende una fitasa de *E. coli* que tiene la secuencia de SEQ ID N°: 13 y/o una fitasa de *Buttiauxella* que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N° 1-6 o un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad con la misma o un polipéptido producido mediante la expresión de una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de SEQ ID N°: 11; o los nucleótidos 253 a 1.483 de SEQ ID N°: 14 o una secuencia que difiere de SEQ ID N°: 11 o los nucleótidos 253 a 1.483 de SEQ ID N°: 14 debido a la degeneración del código genético; o una secuencia que tiene al menos 70% de identidad con SEQ ID N°: 11 o los nucleótidos 253 a 1.483 of SEQ ID N°: 14.
- 20 5. El complemento para piensos según cualquier reivindicación precedente, en el que dicha fitasa tiene actividad de fitasa a un pH en el intervalo de alrededor de pH 2,5 a alrededor de pH 5,5.
6. El complemento para piensos según cualquier reivindicación precedente, en el que la fitasa tiene un nivel de actividad específica de al menos 100 unidades de fitasa FTU/mg; 1 FTU es la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de ortofosfato inorgánico de un sustrato en un minuto a pH 5,5 y 37°C.
- 25 7. El complemento para piensos según cualquier reivindicación precedente, en el que la enzima lipolítica tiene un nivel de actividad específica de al menos 100 unidades de lipasa LIPU/mg; en el que 1 LIPU es la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de H⁺ por minuto a pH 5,5 y 30°C.
8. El complemento para piensos según cualquier reivindicación precedente, en el que la relación de enzima lipolítica a fitasa está en el intervalo de alrededor de 1:3 a alrededor de 12:1.
- 30 9. El complemento para piensos según cualquier reivindicación precedente, que comprende además al menos un portador fisiológicamente aceptable, preferiblemente en el que el portador fisiológicamente aceptable se selecciona de al menos uno de maltodextrina, piedra caliza (carbonato cálcico), ciclodextrina, trigo o un componente del trigo, sacarosa, almidón, un antiespumante, Na₂SO₄, talco y PVA y mezclas de los mismos.
- 35 10. El complemento para piensos según cualquier reivindicación precedente, en el que el complemento para piensos comprende al menos una enzima adicional, preferiblemente en el que la al menos una enzima para piensos adicional se selecciona del grupo que consiste en las implicadas en el metabolismo del almidón, la degradación de fibras, el metabolismo de los lípidos, proteínas o enzimas implicadas en el metabolismo de glucógeno, acetilsterasas, aminopeptidasas, amilasas, arabinasas, arabinofuranosidasas, carboxipeptidasas, catalasas, celulasas, quitinasas, quimosina, cutinasa, desoxirribonucleasas, epimerasas, esterasas, galactosidasas, glucanasas, glucano liasas, endoglucanasas, glucoamilasas, glucosa oxidasas, glucosidasas, incluyendo β glucosidasa, glucuronidasas, hemicelulasas, hexosa oxidasas, hidrolasas, invertasas, isomerasas, lacasas, liasas, manosidasas, oxidasas, oxidorreductasas, pectato liasas, pectina acetilsterasas, pectina despolimerasas, pectina metilsterasas, enzimas pectinolíticas, peroxidasas, fenoloxidasas, poligalacturonasas, proteasas, ramnogalacturonasas, ribonucleasas, taumatina, transferasas, proteínas de transporte, transglutaminasas, xilasas, hexosa oxidasa (D-hexosa: O₂-oxidorreductasa, EC 1.1.3.5), β -glucanasa, α -amilasa, pectinasa, celobiohidrolasa, fosfatasas ácidas y/u otras o combinaciones de las mismas.
- 40 11. El complemento para piensos según la reivindicación 10, que comprende al menos una xilanasa y/o al menos una amilasa
- 45 12. El complemento para piensos según cualquier reivindicación precedente, que comprende al menos 1% en peso, al menos 5%; al menos 10%; al menos 15%; al menos 20%; o al menos 25% en peso de enzima lipolítica y fitasa.
- 50 13. Una comida para animales que comprende el complemento para piensos según cualquier reivindicación precedente o al menos una enzima lipolítica y al menos una fitasa según se definen en cualquier reivindicación precedente.
14. La comida para animales según la reivindicación 13, que comprende uno o más materiales para piensos seleccionados del grupo que comprende a) cereales, tales como granos pequeños (p. ej., trigo, cebada, centeno, avena y combinaciones de los mismos) y/o granos grandes tales como maíz o sorgo; b) subproductos de cereales,

- tales como harina de gluten de maíz, granos secos de destilería con solubles (DDGS), salvado de trigo, moyuelo de trigo, granza de trigo, salvado de arroz, cáscaras de arroz, cáscaras de avena, almendra de palma y pulpa de cítricos; c) proteína obtenida de fuentes tales como soja, girasol, cacahuete, altramuza, guisantes, habas, algodón, colza, harina de pescado, proteína plasmática secada, harina de carne y huesos, proteína de patata, trigo, copra, sésamo; d) aceites y grasas obtenidos de fuentes vegetales y animales; e) minerales y vitaminas.
- 5 15. La comida para animales según la reivindicación 13 o la reivindicación 14, que comprende al menos un material para piensos bajo en fibra, seleccionado del grupo que consiste en maíz, trigo, una harina de subproducto animal, o soja, y/o al menos un subproducto del al menos un material para piensos bajo en fibra para proporcionar una comida para animales baja en fibra.
- 10 16. La comida para animales según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, que comprende una comida para animales que contiene al menos 30%, al menos 40%, al menos 50% o al menos 60% en peso de harina de maíz y soja o maíz y soja con toda la grasa.
- 15 17. La comida para animales según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, que comprende fitasa en un nivel de alrededor de 200 FT U/kg a alrededor de 15.000 FT U/kg (p. ej. de 300 a 10.000 FT U/kg, 400-7.500 FT U/kg y también 500-5.000 FT U/kg).
18. La comida para animales según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, que comprende enzima lipolítica en un nivel de alrededor de 125 LIP U/kg a alrededor de 45.000 LIP U/kg (p. ej. de 125 a 30.000 LIP U/kg, 1.000-20.000 LIP U/kg y también 3.000-10.000 LIP U/kg).
- 20 19. La comida para animales según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, que comprende al menos 0,0001%; al menos 0,0005%; al menos 0,0010%; al menos 0,0020%; al menos 0,0025%; al menos 0,0050%; al menos 0,0100%; al menos 0,020%; al menos 0,100% al menos 0,200%; al menos 0,250%; al menos 0,500% en peso del complemento para piensos.
20. La comida para animales según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, para consumo por un animal monogástrico, seleccionado del grupo que consiste en aves de corral, cerdos, mascotas o peces.
- 25 21. La comida para animales según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, que comprende al menos un aditivo adicional.
22. Un método para elaborar una comida para animales según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 21, que comprende añadir a un material para piensos un complemento para piensos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 30 23. Un método para elaborar un complemento para piensos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende mezclar al menos una enzima lipolítica y al menos una fitasa.
- 35 24. El método según la reivindicación 23, que comprende además la adición de al menos un portador fisiológicamente aceptable seleccionado de al menos uno de maltodextrina, piedra caliza (carbonato cálcico), ciclodextrina, trigo o un componente del trigo, sacarosa, almidón, un antiespumante, Na₂SO₄, talco, PVA y mezclas de los mismos.
25. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 24, que comprende la etapa adicional de homogeneizar el complemento para piensos.
26. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, que comprende la etapa adicional de nodulizar el complemento para piensos.
- 40 27. Un método para incrementar la disponibilidad de al menos un nutriente dietético y/o incrementar la energía metabolizable aparente (AME) de un material para piensos, que comprende añadir al material para piensos un complemento para piensos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
28. Un método para incrementar la velocidad de crecimiento de un animal, que comprende alimentar al animal con una cantidad eficaz de una comida para animales según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 21.
- 45 29. Uso de un complemento para piensos que comprende una fitasa y una enzima lipolítica en la fabricación de una comida para animales para incrementar la disponibilidad de al menos un nutriente y/o incrementar la energía metabólica disponible de un material para piensos, en el que dicha enzima lipolítica tiene actividad de lipasa a un pH en el intervalo de alrededor de pH 1,5 a alrededor de pH 3,5.
- 50 30. El uso según la reivindicación 29, en el que el al menos un nutriente se selecciona de fósforo; calcio; aminoácidos; grasa y/o almidón.

FIGURA 1

Secuencia de aminoácidos de fitasa de *Buttiauxella* sp. P1-29 silvestre (SEQ ID N°: 1)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLG YITPRGEHLISLMGGFYRQKF
 QQQGILSQGSCPTPNSIYVWADVQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGTCS
 MDKTQVQQAVEKEAQTPI DNLNQHYI PFLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDN
 GNKVALDGAIGLSSTLAEI FLLEYAQGMPQAAWGNIHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIARHNGT
 PLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFER
 LADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEP
 GCQLQ

FIGURA 2

Secuencia de aminoácidos de una variante de fitasa de *Buttiauxella* sp. P1-29 (SEQ ID N°: 2)

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPYTWPEWPVKLG YITPRGEHLISLMGGFYRQKF
 QQQGILPQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGICS
 MDKTQVQQAVEKEAQTPI DNLNQRYI PELALMNTVLNFSKSPWCQKHSADKPCDLALSMP SRLSIKDN
 GNEVSLDGAIGLSSTLAEI FLLEYAQGMPQAAWGNIHSEQEWALLKLHNVYFDLMERTPYIARHKGT
 PLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFER
 LADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPPGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEP
 GCQLQ

FIGURA 3

		1	50
(SEQ ID:4) BP-110	(1)	NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPYTWPPEWPVKLGYYIT	
(SEQ ID:2) BP-112	(1)	NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPYTWPPEWPVKLGYYIT	
(SEQ ID:5) BP-111	(1)	NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPYTWPPEWPVKLGYYIT	
(SEQ ID:3) BP-17	(1)	NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPPEWPVKLGYYIT	
(SEQ ID:1)	(1)	NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPPEWPVKLGYYIT	
<i>Buttiauxella</i> -WT			
		51	100
BP-110	(51)	PRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILSQSSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGE	
BP-112	(51)	PRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILPQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGE	
BP-111	(51)	PRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILPRGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGE	
BP-17	(51)	PRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGE	
<i>Buttiauxella</i> -WT	(51)	PRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWADVDQRTLKTGE	
		101	150
BP-110	(101)	AFLAGLAPQCGLTIHHQONLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEA	
BP-112	(101)	AFLAGLAPQCGLTIHHQONLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEA	
BP-111	(101)	AFLAGLAPQCGLTIHHQONLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEA	
BP-17	(101)	AFLAGLAPQCGLTIHHQONLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEA	
<i>Buttiauxella</i> -WT	(101)	AFLAGLAPQCGLTIHHQONLEKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVEKEA	
		151	200
BP-110	(151)	QTPIDNLNQRYIPELALMNTVLNFSKSPWCQKHSADKPCDLALSMP SRLS	
BP-112	(151)	QTPIDNLNQRYIPELALMNTVLNFSKSPWCQKHSADKPCDLALSMP SRLS	
BP-111	(151)	QTPIDNLNQRYIPELALMNTILNFSKSPWCQKHSADKPCDLALSMP SKLS	
BP-17	(151)	QTPIDNLNQHYIPLSALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKSCDLGLSMP SKLS	
<i>Buttiauxella</i> -WT	(151)	QTPIDNLNQHYIPELALMNTTLNFS TSAWCQKHSADKSCDLGLSMP SKLS	
		201	250
BP-110	(201)	IKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLL	
BP-112	(201)	IKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLL	
BP-111	(201)	IKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQVWGNHSEQEWALLL	
BP-17	(201)	IKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLL	
<i>Buttiauxella</i> -WT	(201)	IKDNGNKVALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWASLL	
		251	300
BP-110	(251)	KLHNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKI	
BP-112	(251)	KLHNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKI	
BP-111	(251)	KLHNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKI	
BP-17	(251)	KLHNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKI	
<i>Buttiauxella</i> -WT	(251)	KLHNVQFDLMARTPYIARHNGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKI	
		301	350
BP-110	(301)	LFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYV	
BP-112	(301)	LFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYV	
BP-111	(301)	LFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYV	
BP-17	(301)	LFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYV	
<i>Buttiauxella</i> -WT	(301)	LFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYV	
		351	400
BP-110	(351)	SVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPPGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTR	
BP-112	(351)	SVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPPGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTR	
BP-111	(351)	SVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPPGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTR	
BP-17	(351)	SVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTR	
<i>Buttiauxella</i> -WT	(351)	SVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTR	
		401	413
BP-110	(401)	VVSQSVEPGCQLQ	
BP-112	(401)	VVSQSVEPGCQLQ	
BP-111	(401)	VVSQSVEPGCQLQ	
BP-17	(401)	VVSQSVEPGCQLQ	
<i>Buttiauxella</i> -WT	(401)	VVSQSVEPGCQLQ	

FIGURA 4

BP-11 (SEQ ID NO:6)

HHHHHHNDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLG YITPRGEHLISLMGG
FYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVDQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPV
KAGICSM DKTQVQQA VEKEAQTPI DNLNQHYI PSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKSCDLGLSMPSK
LSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLKLHN VYFDLMERTPYI
ARHKGTPLLQAISNALNP NATESKL PDISP DNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGG
ALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVV
SQSVEPGCQLQ

FIGURA 5

SEQ ID NO: 7

1 **MFSGRFGVLL TALAALGAAA PAPLAVRSVS** TSTLDELQLF AQWSAAAYCS
51 NNIDSKDSNL TCTANACPSV EEASTTMLLE FDLTNDFGGT AGFLAADNTN
101 KRLVVAFRGS STIENWIANL DFILEDNDDL CTGCKVHTGF WKAWESA ADE
151 LTSKIKSAMS TYSGYTLYFT GHSLGGALAT LGATVLRNDG YSVELYTYGC
201 PRIGNYALAE HITSQSGGAN FRVTHLNDIV PRVPPMDFGF SQPSPEYWIT
251 SGN GASVTAS DIEVIEGINS TAGNAGEATV SVVAHLWYFF AISECLL

Secuencia de aminoácidos de la Lipasa 3 (secuencia de señal en **negrita**, propéptido subrayado en **negrita**)

FIGURA 6

SEQ ID NO: 8

1 SVSTSTLDEL QLFAQWSAAA YCSNNIDSKD SNLTCTANAC PSVEEASTTM
51 LLEFDLTNDF GGTAGFLAAD NTNKRLV VAF RGSSTIENWI ANLDFILEDN
101 DDLCTGCKVH TGFWKAWESA ADELTSKIKS AMSTYSGYTL YFTGHSLGGA
151 LATLGATVLR NDGYSVELYT YGCPRIGNYA LAEHITSQGS GANFRVTHLN
201 DIVPRVPPMD FGFSQPSPEY WITSGNGASV TASDIEVIEG INSTAGNAGE
251 ATVSVAHLW YFFAISECLL

Secuencia de aminoácidos de la Lipasa 3 (sin secuencia de señal o propéptido)

FIGURA 7

SEQ ID N°: 9

Con secuencia de señal

ATGTTCTCTGGACGGGTTGGAGTGTCTTTTGACAGCGCTTGCTGCGCTGGGTGC
TGCCGCCCGGCAACCGCTTGCTGTGCGGAGtagtgcccgatgagagtggtgatagcact
gatgaagggtgaatagGTGTCGACTTCGACTTCACGTTGGATGAGTTGCAATTGTTCCGCCA
ATGGTCTGCCGCACTTATTGCTCGAATAATATCGACTCGAAAGACTCCAACTTG
ACATGCAAGGCAACGCTGTCCATCAGTCGAGGAGGCCAGTACCACGATGCT
GCTGGAGTTCGACCTgtagtcactcagatcgagacatagacacagtaattgaaacgGACGAAC
GACTTGGAGGCACAGCCGTTTCTGGCCGGACAACACCAACAAGCGGCT
CGTGGTCGCTTCGGGGGAAGCAGCAGATTGAGAACTGGATTGCTTAATCTTGA
CTTCATCCTGGAAGATAACGACGACCTCTGCACCGGCTGCAAGGTCCTACACTGG
TTTCTGGAAGGCATGGAGTCCGCTCCGACGAACTGACGAGCAAGATCAAGT
CTGCGATGAGCACGTAATCGGGCTATACCTATACTTCACCGGGCACAGTTTGG
GCGGCGCATTGGCTACGCTGGGAGCGACAGTTCTGCGAAATGACGGATATAGC
GTTGAGCTGgtgagtcctcacaaagtgatgagcgacaalcgggtctgacagtcacatagTACACCTAT
GGATGTCTCTGAATCGGAAACTATCGCTGGCTGAGCATATCACCAAGTCAGGGA
TCTGGGGCCAACTTCCGTGTACACACTTGAACGACATCGTCCCGGGTGCCCA
CCCATGGACTTGGATTGAGTCAGTCAGCCAAAGTCCGGAATACTGGATCACCAAGTGGC
AATGGAGCCAGTGTACGGCGTCCGGATATCGAAGTCATCGAGGGAATCAATTCA
ACGGCGGGAAATGCAGGCGAAGCAACGGTGAGCGTTGTGGCTCACTTGTGGTA
CTTTTTGCGAATTCGGAGTGCCTGTATAA

Secuencia de señal (negrita)
Intrones (minúsculas)

FIGURA 8

SEQ ID N°: 10

Sin secuencia de señal

AgtagggtgcccgatgtgagatgggttgatagcactgatgaagggtgaatagGTGTCTCGACT
 TCCACGTTGGATGAGTTGCAATTGTTCCGCGCAATGGTCTGCCGACGCT
 TATTGCTCGAATAATATCGACTCGAAGACTCCAACTTGACATGCACGG
 CC AACGCCCTGTCCATCAGTCGAGGAGGCCAGTACCACGATGCTGCTG
 GAGTTCGACCTgtatgtcactcagatcgagacatagacacagtaatttgaacagGACGA
 ACGACTTTGGAGGCAACAGCCGGTTTCTGCGCGCGGACAACACCAAC
 AAGCGGCTCGTGGTCGCCCTTCCGGGAGCAGCACGATTGAGAACTG
 GATTGCTAATCTTGACTTCACTCCTGGAAGATAACGACGACCTCTGCAC
 CGGCTGCAAGGTCCATACTGTTTCTGGAAGGCATGGGAGTCCGCTG
 CCGACGAACTGACGAGCAAGATCAAGTCTGCGATGAGCACGTATTCTG
 GGCTATACCCATATCTCACCGGGCACAGTTTGGCGGCGCATTTGGCT
 ACGCTGGGAGCGACAGTTCTGCGAAATGACGGATATAGCGTTGAGCT
 GgtgagtccttcacaagggtgagggagcgacaatcggttctgacagtcaatagTACACCTATG
 GATGTCCTCGAATCGGAACCTATGCGCTGGCTGAGCATATCACCCAGTC
 AGGGATCTGGGGCCAACTTCCGTGTTACACACTTGAACGACATCGTCC
 CCCGGGTGCCACCCATGGACTTTGGATTTCAGTCAGCCCAAGTCCGGAA
 TACTGGATCACCCAGTGGCAATGGAGCCAGTGTACGCGGCTCGGATAT
 CGAAGTCATCGAGGGAATCAATTCAACGGCGGGAATGCAGGCGAAG
 CAACGGTGAGCGTTGTGGCTCACTTGTGGTACTTTTTTTGCGATTTCGG
 AGTGCCTGCTATAA

FIGURA 9

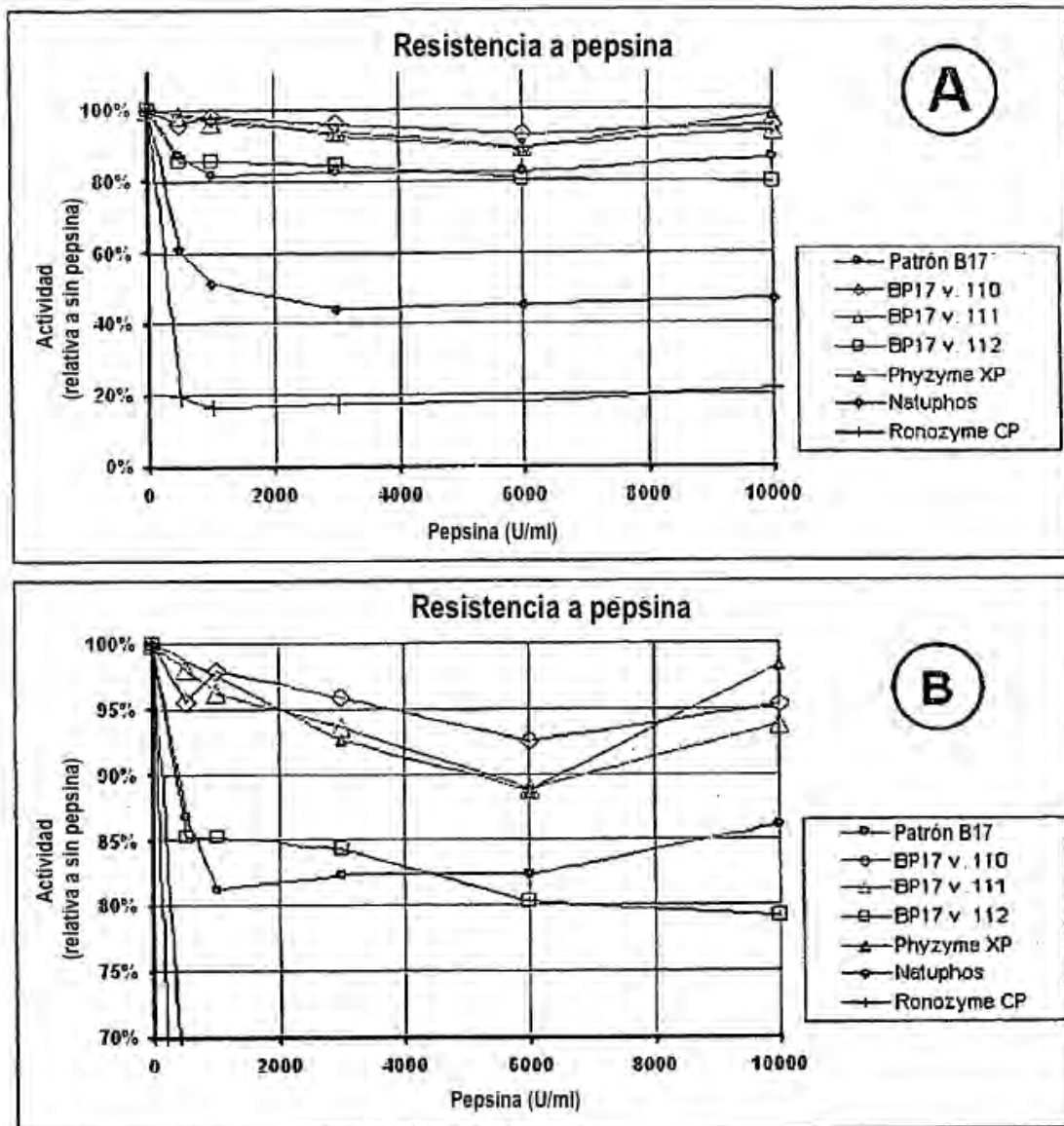


FIGURA 10

Foderstofanlæg

Planta de Fabricación de Pienso

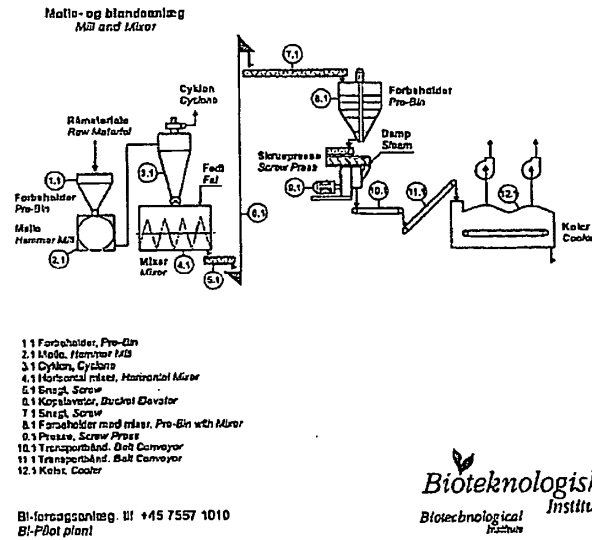


FIGURA 11

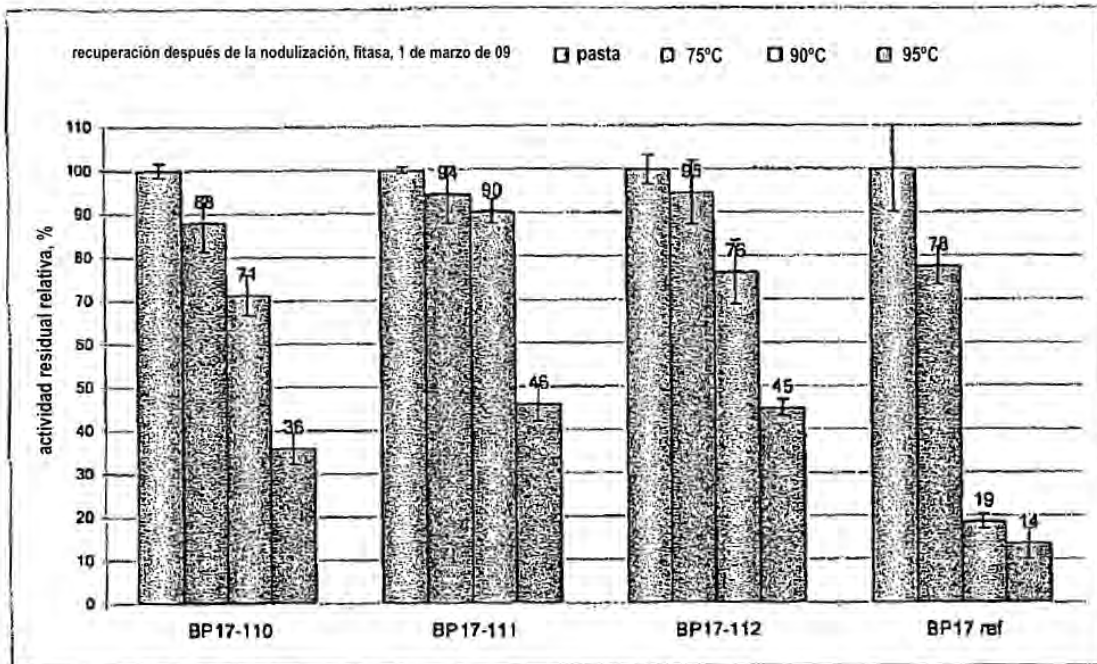


FIGURA 12

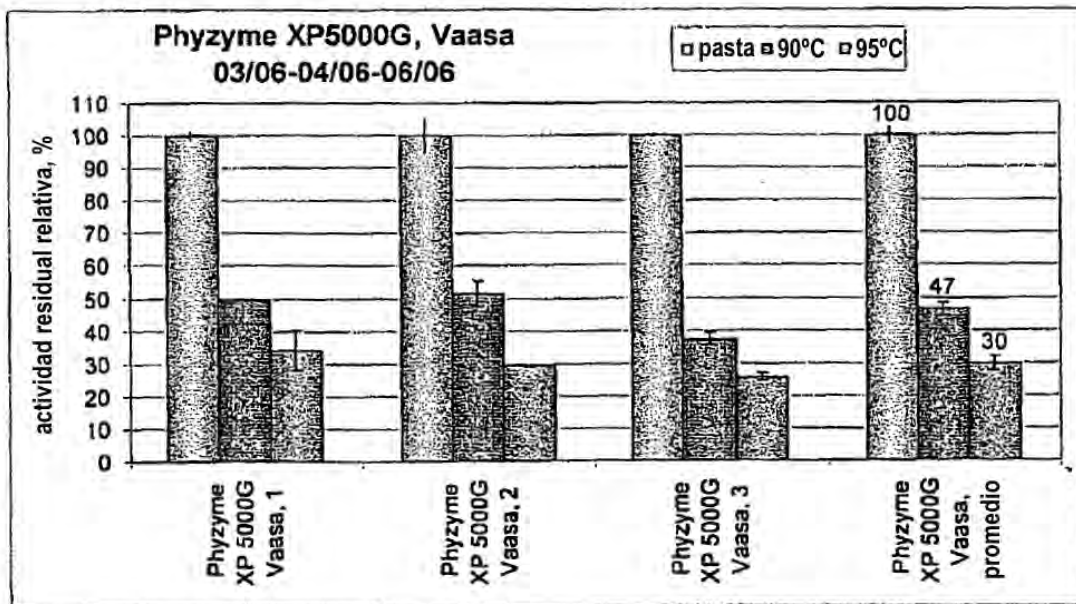


FIGURA 13

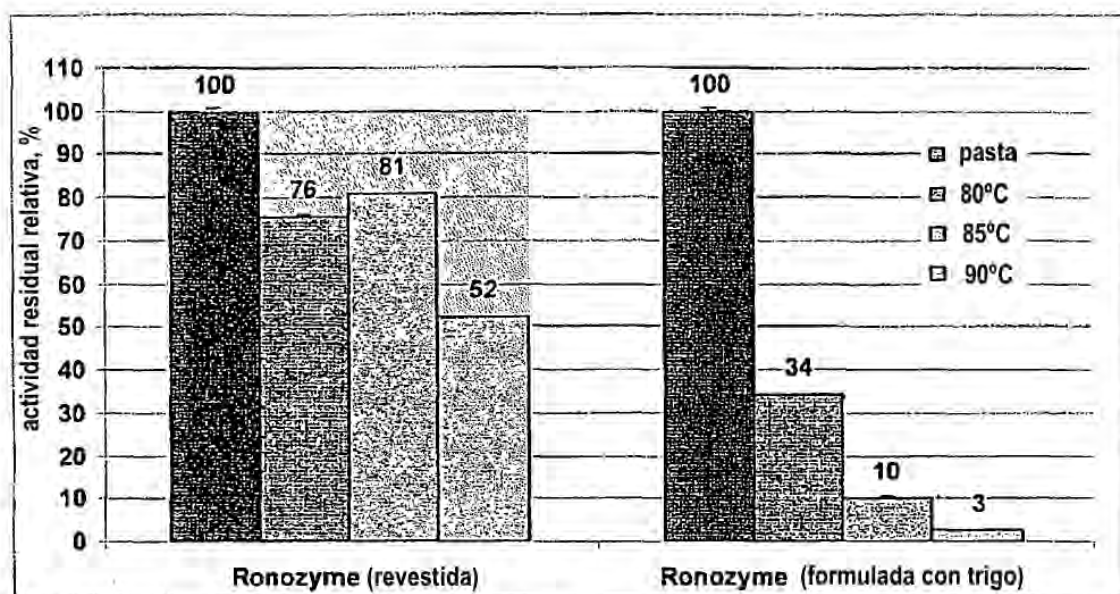


FIGURA 14

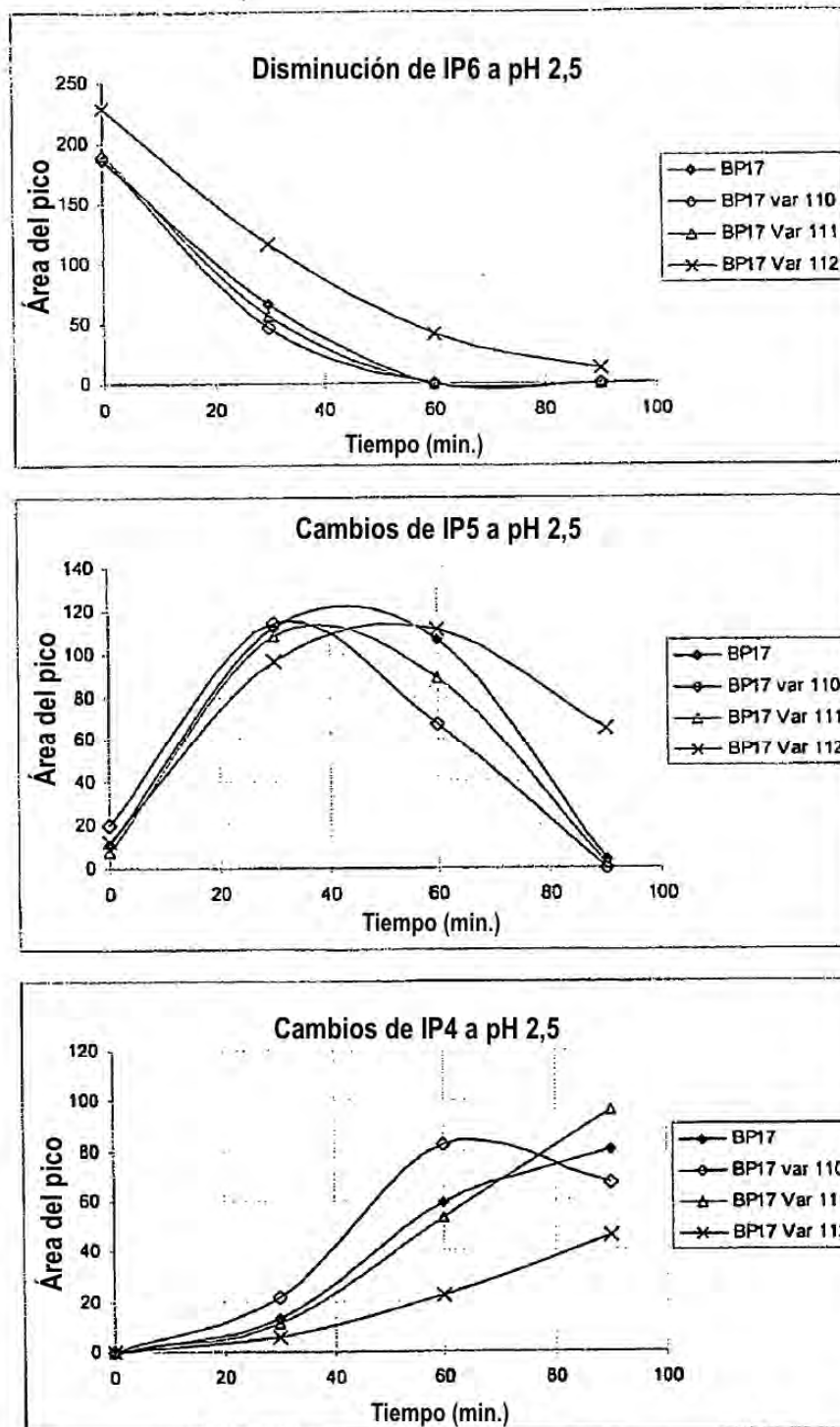


FIGURA 15

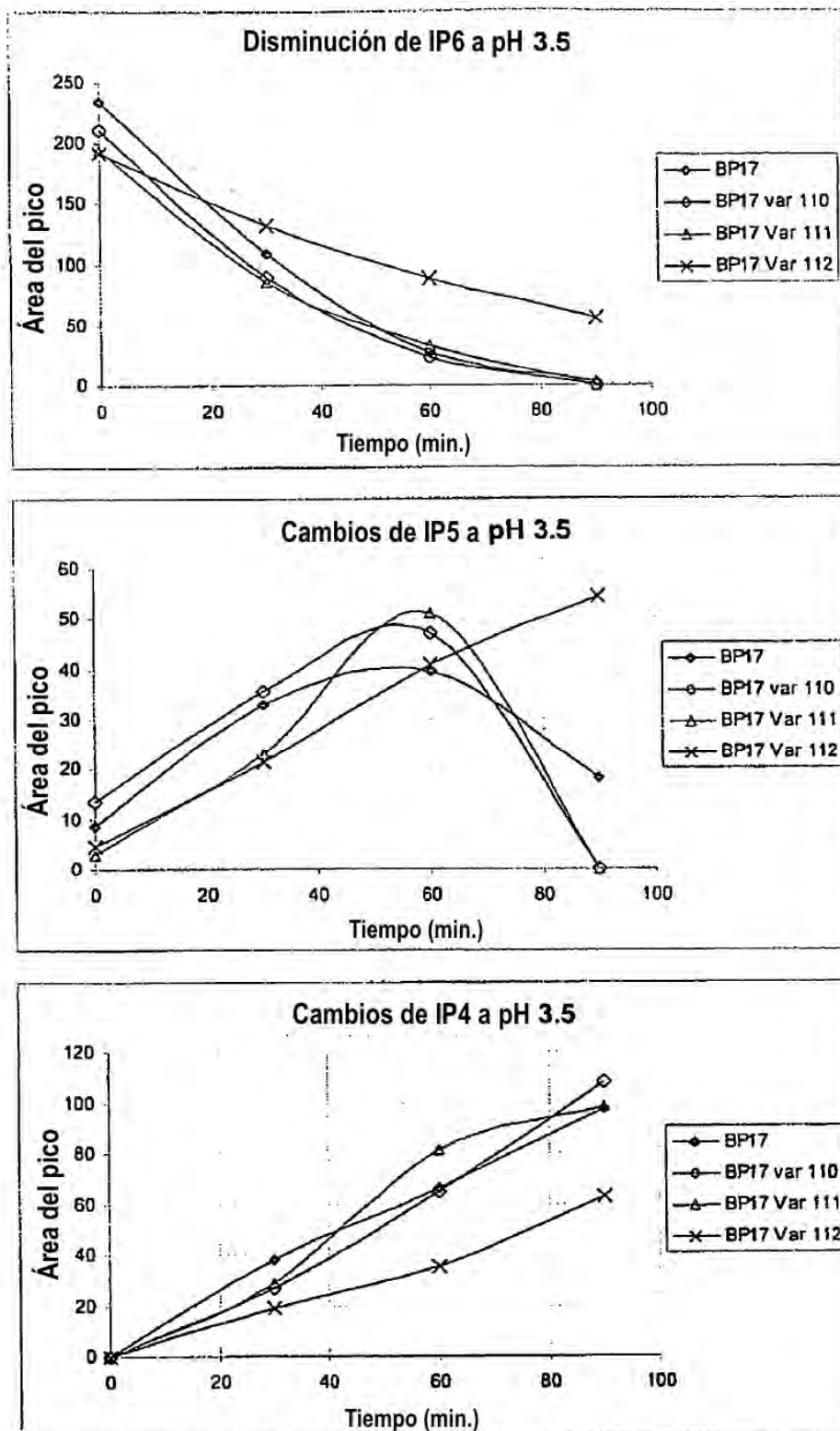


FIGURA 16

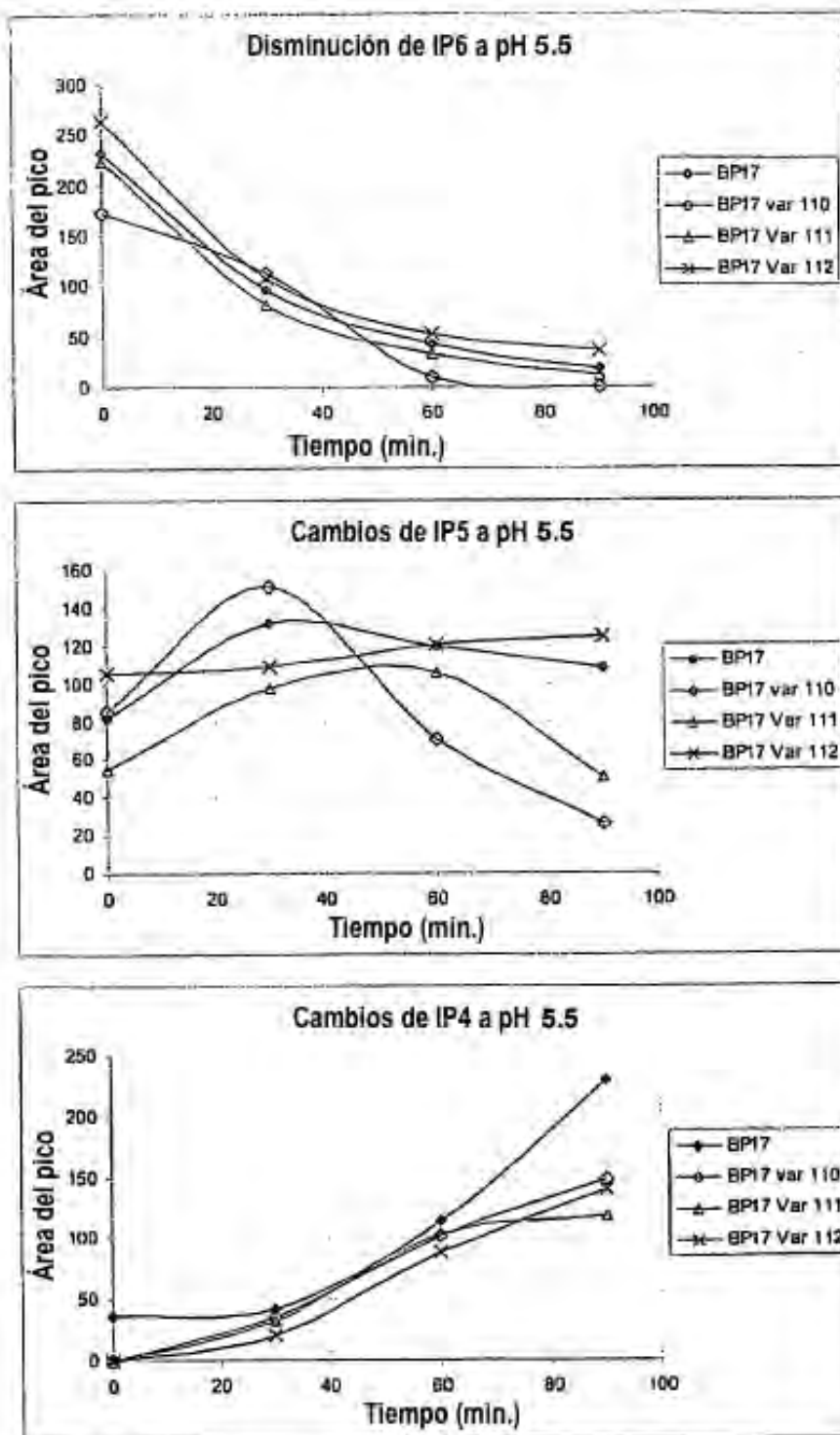


FIGURA 17

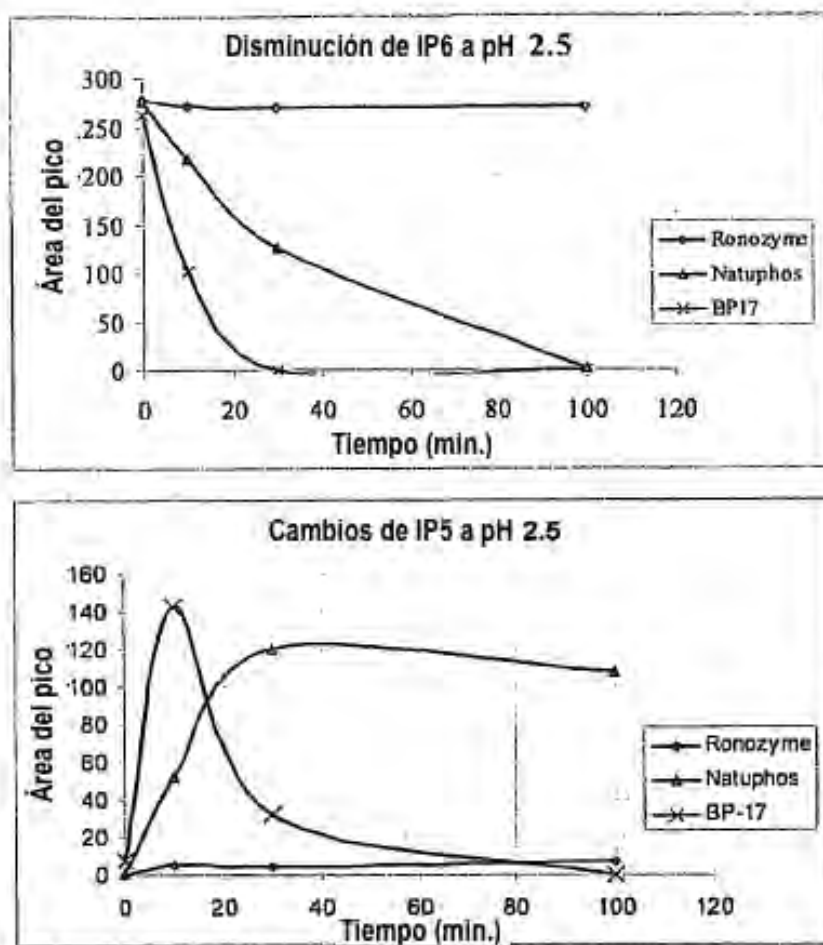


FIGURA 18

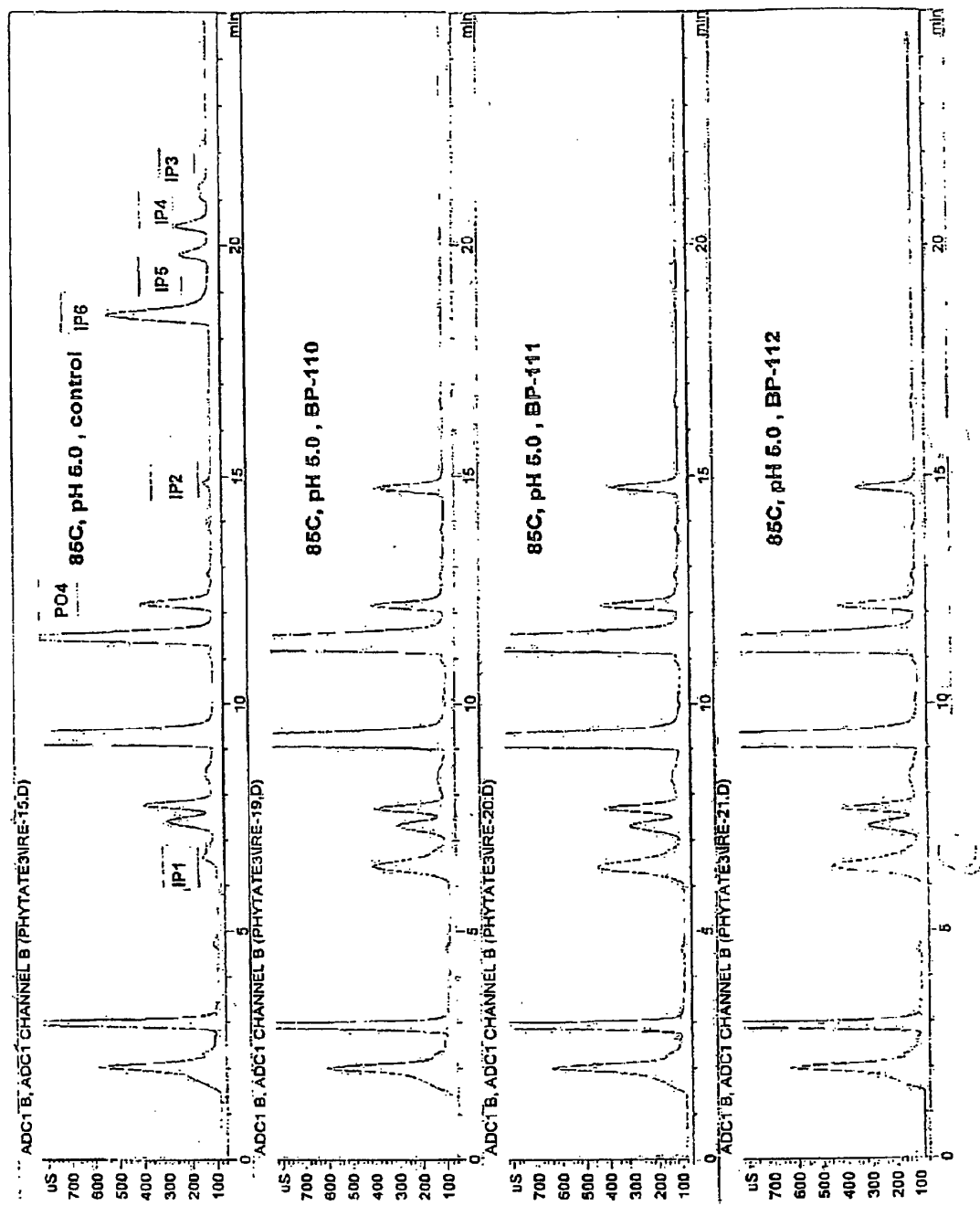


FIGURA 19

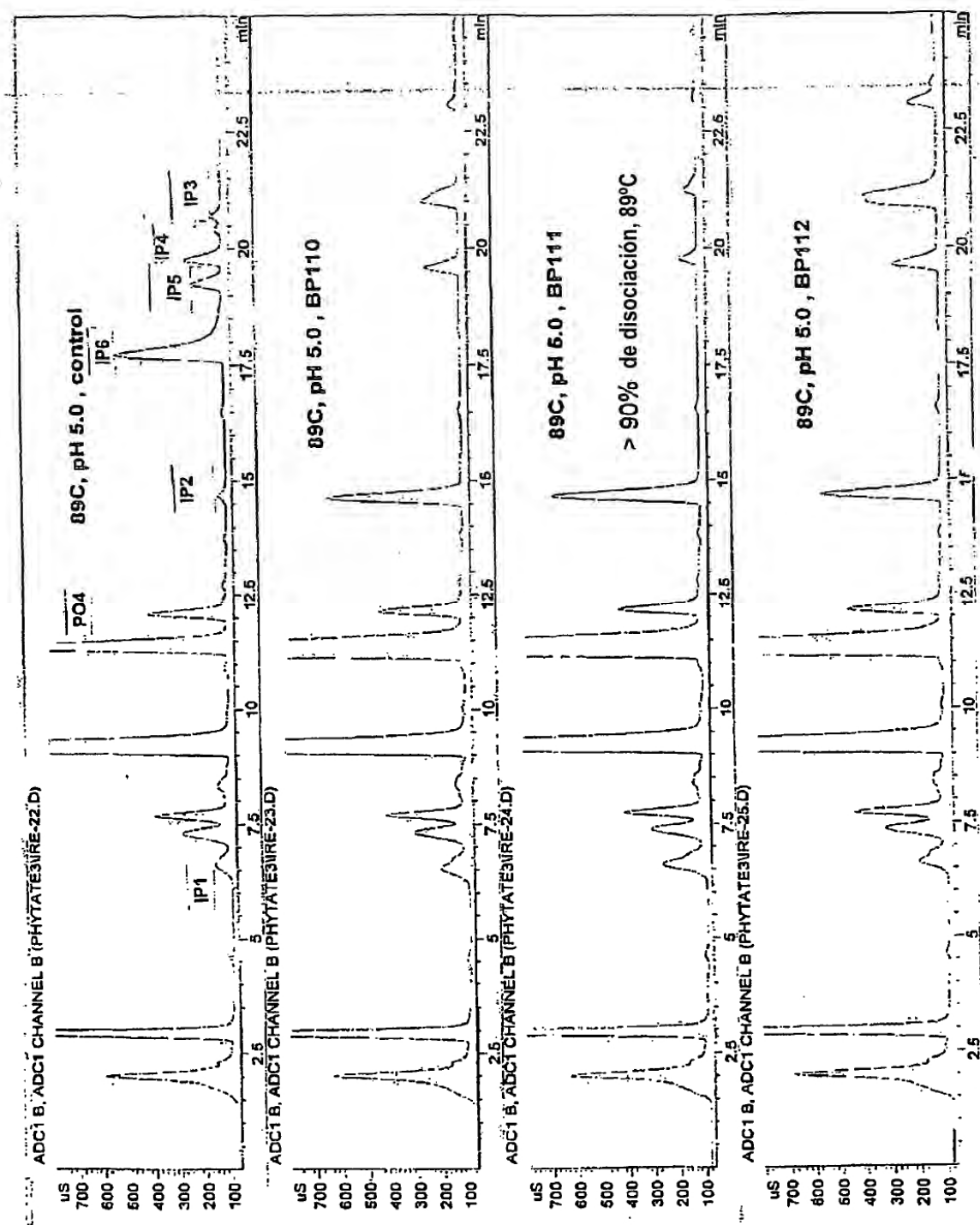


FIGURA 20

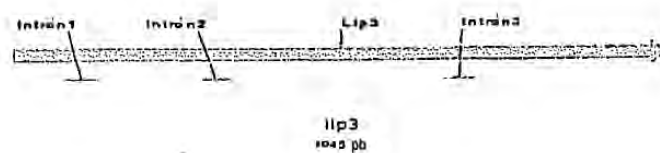


FIGURA 21

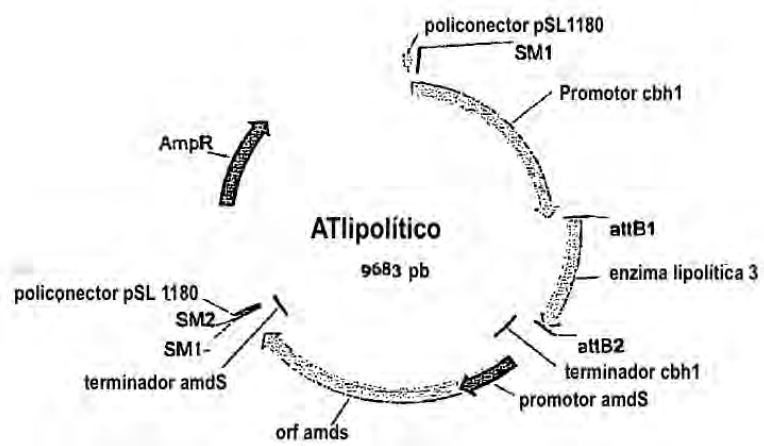


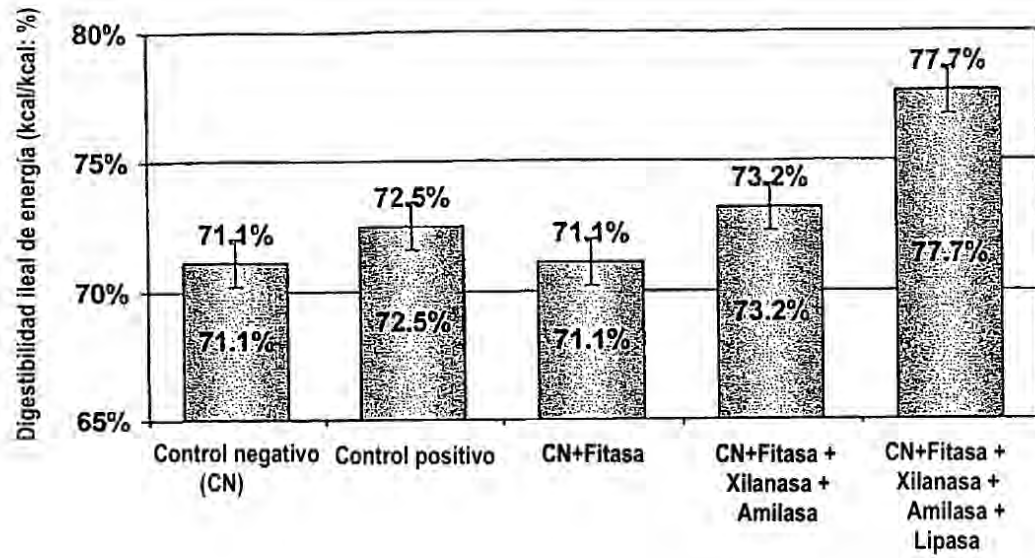
FIGURA 22

Secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de una *Buttiauxella* sp. P1-29 silvestre (SEQ ID N°: 11)

AACGACACTCCCGCTTCAGGCTACCAGGTTGAGAAAGTGGTAATACTCAGCCGCCACGGGGTGCGAGC
 ACCAACCAAAATGACACAGACCATGCGCGACGTAACACCTAATACCTGGCCCGAATGGCCAGTAAAT
 TGGGTTATATCACGCCACGCGGTGAGCATCTGATTAGCCTGATGGGCGGGTTTTATCGCCAGAAGTTT
 CAACAACAGGGCATTTTATCGCAGGGCAGTTGCCCCACACCAAACCTCAATTTATGTCTGGGCAGACGT
 TGATCAGCGCACGCTTAAAACTGGCGAAGCTTTCTGGCAGGGCTTGCTCCGGAATGTCATTTAACTA
 TTCACCACCAGCAGGACATCAAAAAAGCCGATCCGCTGTTCCATCCGGTGAAAGCGGGCACCTGTTCA
 ATGGATAAACTCAGGTCCAACAGGCCGTTGAAAAAGAAAGCTCAAACCCCATTTGATAATCTGAATCA
 GCACTATATTCCCTTTCTGGCCTTGATGAATACGACCCTCAACTTTTCGACGTCGGCCTGGTGTGAGA
 AACACAGCGCGGATAAAAGCTGTGATTTAGGGCTATCCATGCCGAGCAAGCTGTGATAAAAGATAAT
 GGCAACAAAGTCGCTCTCGACGGGGCCATTGGCCTTTCTGTCTACGCTTGCTGAAATTTTCCTGCTGGA
 ATATGCGCAAGGGATGCCGCAAGCGGCGTGGGGGAATATTCATTCAGAGCAAGAGTGGGCGTCGCTAC
 TGAAACTGCATAACGTCCAGTTTGATTTGATGGCACGCACGCCTTATATCGCCAGACATAACGGCACG
 CCTTTATTGCAGGCCATCAGCAACGCGCTGAACCCGAATGCCACCGAAAGCAAACCTGCCTGATATCTC
 ACCTGACAATAAGATCCTGTTTATTGCCGGACACGATACCAATATTGCCAATATCGCAGGCATGCTCA
 ACATGCGCTGGACGCTACCTGGGCAACCCGATAACACCCCTCCGGGCGGCGCTTTAGTCTTTGAGCGT
 TTGGCCGATAAGTCAGGGAAACAATATGTTAGCGTGAGCATGGTGTATCAGACTCTCGAGCAGTTGCG
 CTCCCAAACACCACTTAGCCTTAATCAACCTGCGGGAAGCGTACAGCTAAAAATTCCTGGCTGTAACG
 ATCAGACGGCTGAAGGATANTGCCGCTGTGACGTTCACTCGCGNGGTTAGCCAAAGCGTGGAACCA
 GGCTGCCAGCTACAGTAA

FIGURA 23

A



B

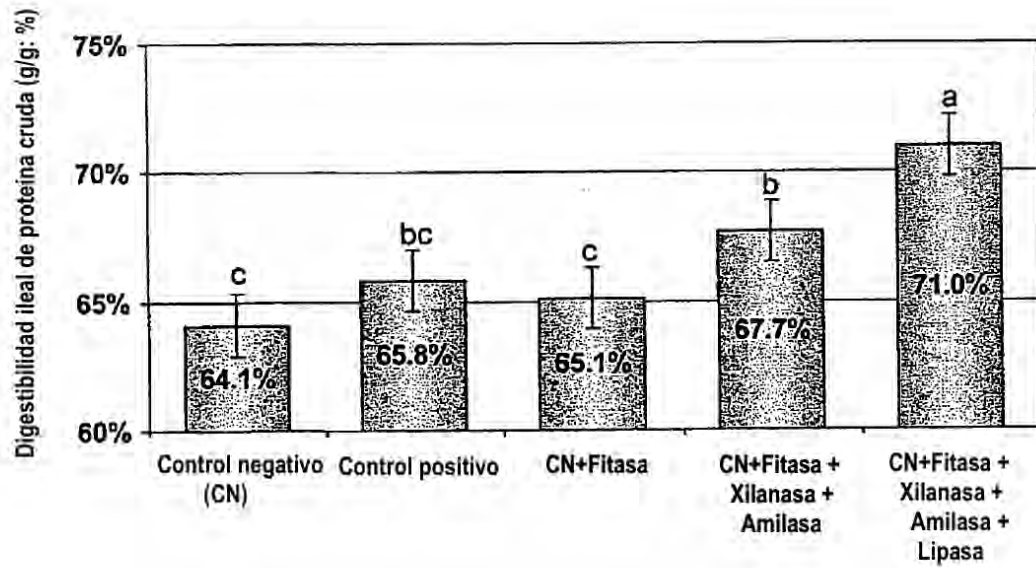


FIGURA 24

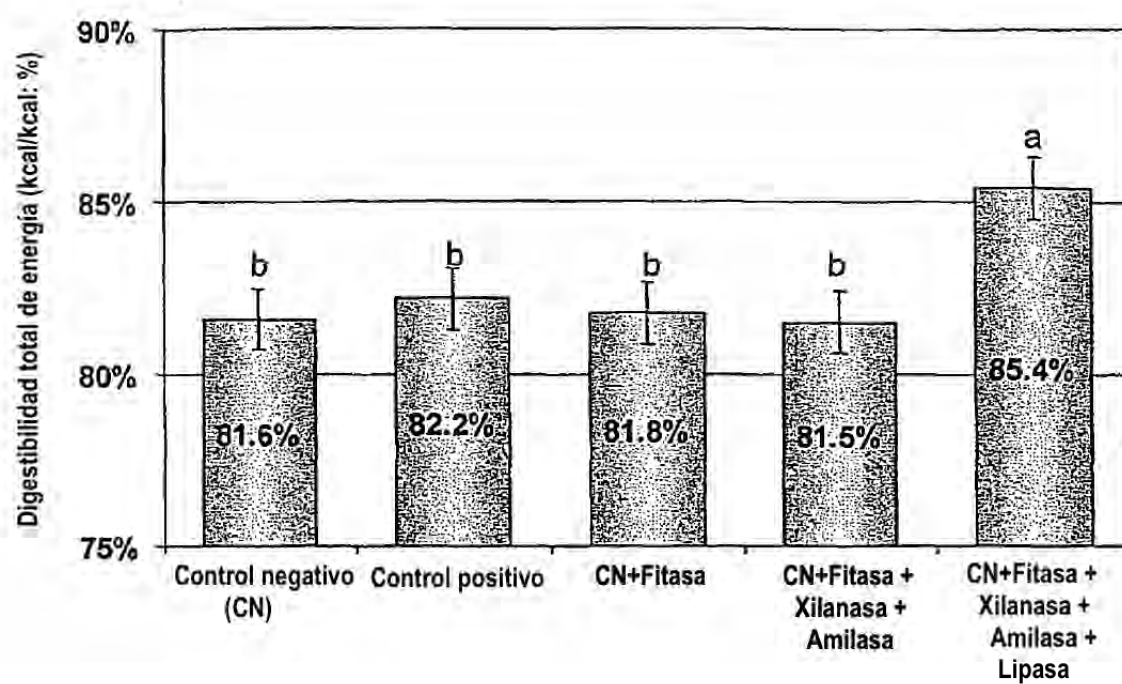
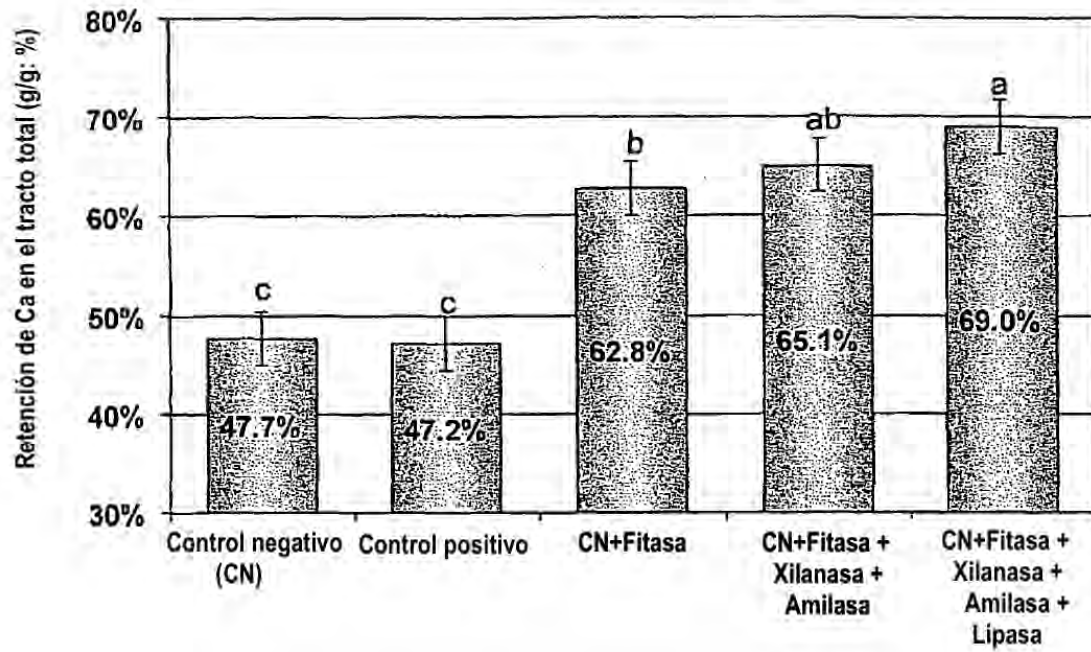


FIGURA 25

A



B

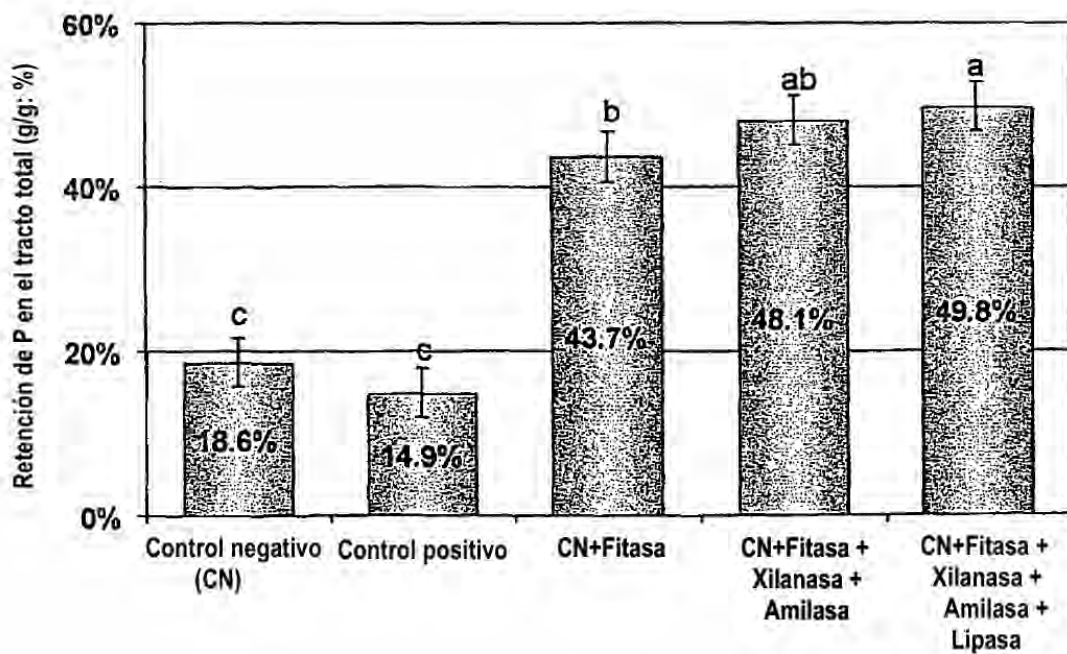


FIGURA 26

SEQ ID N° 12

```

1  MKAILIPFLS  LLIPLTPQSA  FAQSEPELKL  ESVVIVSRHG  VRAPTKATQL
51  MQDVTPDAWP  TWPVKLGWLT  PRGGELIAYL  GHYQRQRLVA  DGLLAKKGCP
101 QSGQVAIIAD  VDERTRKTGE  AFAAGLAPDC  AITVHTQADT  SSPDPLFNPL
151 KTGVCQLDNA  NVTDAILSRA  GGSIAFTGH  RQTAFRELER  VLNFPQSNLC
201 LKREKQDESC  SLTQALPSEL  KVSADNVSLT  GAVSLASMLT  EIFLLQQAQG
251 MPEPGWGRIT  DSHQWNTLLS  LHNAQFYLLQ  RTPEVARSR  TPLLDLIKTA
301 LTPHPPQKQA  YGVTLPSTVL  FIAGHDTNLA  NLGGALELNW  TLPGQPDNTP
351 PGGELVFERW  RRLSDNSQWI  QVSLVFQTLQ  QMRDKTPLSL  NTPPGEVKLT
401 LAGCEERNAQGMCSLAGFTQIVNEARIPACSL

```

Fitasa de *E. coli* silvestre (Secuencia de señal en negrita)

FIGURA 27

ID SEQ N° 13

```

1  QSEPELKLES  VVIVSRHGVR  APTKATQLMQ  DVTPDAWPTW  PVKLGWLTPT
51  GGELIAYLGH  YQRQRLVADG  LLAKKGCPQS  GQVAIIADVD  ERTRKTGEAF
101 AAGLAPDCAI  TVHTQADTSS  PDPLFNPLKT  GVCQLDNANV  TDAILSRAGG
151 SIADFTGHRQ  TAFRELERVL  NFPQSNLCLK  REKQDESCSL  TQALPSELKV
201 SADNVSLTGA  VSLASMLTEI  FLLQQAQGMP  EPGWGRITDS  HQWNTLLSLH
251 NAQFYLLQRT  PEVARSRATP  LLDLIKALT  PHPPQKQAYG  VTLPTSVLFI
301 AGHDTNLANL  GGALELNWTL  PGQPDNTPPG  GELVFERWRR  LSDNSQWIQV
351 SLVFQTLQOM  RDKTPLSLNT  PPGEVKLTLA  GCEERNAQGM  CSLAGFTQIV
401 NEARIPACSL

```

Fitasa de *E. coli* madura

FIGURA 28

SEQ ID N° 14

```

1 *      H N Y L L H F V G I L L H C S L S Y L V L V H L D P R L K S *      ---
1 TAAggagcagaaacaATGCGGTATTTACTTTGGTTGGTCCGCAATTTGTGTATGTGTTCGCTCCACACCTTGTGTGTGTATGGCTGGACCCGCGCTCTGAAAGTTAAcgaacgttaggce 120

1 ----- -35 ----- -10      SD      H K A I L I P F L S L L I P L T P Q      18
121 tgatgcgycgcattagcatcgcatcgycgaatcaataatgtcagatgtgaaagcgggaacatctatcgATGAAGCGATCTTAATCCCATTTTATCTCTTCTGATTCCGTTAAACCCCA 240

19 S A F A O S E P E L K L E S V V I V S R H G V R A P T K A T Q L W O D V T P D A      38
241 ATCTGCATTCGCTCAGAGTGAACCGAGCTGAAGCTGGAAGTGTGGTGTATGTCTAGTGTCTATGGTGTGGTGTCTCCACCAAGGCCACGCAACTGATGCAAGATGTCAACCCAGAGCG 360

59 W P T W P V K L G H L T P R G G E L I A Y L G H Y Q R Q R L V A D G L L A K K G      98
361 ATGGCAACCTGGCGGTAAAGCTGGCTTGGCTGACACCGCG GGTGGTGAAGTAATCGCTATCTCGGACATTACCAACGCCAGCTGTCTGGTAGCCGACGATTTGCTGGCAAAAGGG 480

99 C P Q S G Q V A I I A D V D E R T R K Y G E A F A A G L A P D C A I T V H T Q A      138
481 CTGCCCGAGTCTGGTCAGTCCGATTTATTTCTGTATGTTCAGAGCGTACCGGTAAACACAGGCGAAGCTTGGCGCGCGGCGTGGCACTGACTGTGCAATAAACGCTACATACCCAGGC 600

139 D T S S P D P L P H P L K T G V C Q L D N A H V T D A I L S R A G G S I A D F T      178
601 AGATACGTCCAGTCCGATGCGTTATTTAATCTCTAAJAJCTGGCGTTTGGCACTGGATTAACCGAAAGCTGACCGGATCTCTACGAGGCGAGGCGTCAATTCCTGACTTTAC 720

179 G H R Q T A F R E L Z R V L H P P Q S H L C L K R E K O D Z S C S L Y Q A L P S      218
721 CGGCACTCGGCAACCGCGTTTCGGAACTGAAACGGGTGCTTAATTTCCGCAATCAAGCTTGTCTTAACGTGAJAJAACAGAGCAAGCGTGTTCATTAAAGCAGGCAATACCATC 840

219 E L K V S A D H V S L T G A V S L A S H L T E I F L L Q Q A Q Q H P E P G W G R      258
841 GGAATCAAGGTGAGCGCCGACAAATGTCTCATTAACCGGTGCGTAAACCTCGCAATCAATGTCTGACGAGATATTTCTCTGCAACAAACACAGGCAATGCGGAGCGCGCGTGGGAAJ 960

259 I T D S H Q W N T L L S L H N A Q F Y L L Q R T P E V A R S R A T P L L D L I K      298
961 GATCACGATTTCAACAGAGTGAJAJACCTTGTCTAAGTTTGCATAACCGCAATTTTATTTGTCTACAAACCGAGCGAGGTTCGCCGAGCGCGCGCACCGCTTATTAGATTTGATCA 1080

299 T A L T P H P P Q K Q A Y G V T L P T S V L F I A G H D T N L A H L G Q A L E L      338
1081 GACAGCTTGAACCGCCATCCACCGCAAAACAGCGGTATGGTGTGACAATACCCACTTCACTGTCTTTATCGCGGACACGATACTAATCTGGCAATCTCGCGCGGCACTGCAAGCT 1200

339 N M T L P G Q P D N T P P G G E L V F E R W R R L S D N S Q H I Q V S L V F Q T      378
1201 CAATCGACGCTTCCCGTCAACCGCATTAACACCGCCGAGGTGGTGAJCTGGTGTTCGAACGCTGGCGTGGCTAAGCATTAACAGCCAGTGGATTCAAGTTTGGCTGTCTTCCAGAC 1320

379 L Q Q M R D K T P L S L H T P P G E V K L T L A G C E E R N A Q G M C S L A G F      418
1321 TTACAGCAGTGGGTGATTAJAJACCGCTGTCTTAATTAACCGCGCGGAGAGGTGAJCTGACCTGGCAGGATGTAAGACCGAAATGCGCAGGCGATGTGTCTGTGGCAGGTTT 1440

419 T Q I V N E A R I P A C S L *      -----
1441 TAACGAAATCGTGAATGAJAJACGATACCGCGGTGCAATTTGTAAATgcaataaaanagacattcagttacctgaatgctctgaggetgatgacaanagaaactgtctaatgctaga 1560

1561 ccggaaaggcggttcacgcccgtccggccacttccagttttttctttctcggagttactataaccgttaagtatatagcgttaactgtacggcggtgctgcygcygttttaaccacacat 1680

1681 tgaggatagcgcctttaaattatgacgctgctgttccagcgtgcatggacaactcaactcttttggcggtgttcnagccannaecgcgaanccagcaggtggtgccaacagacgce 1800
Pvu I
1801 ccagacccgcggtcactcaccgccagcatcggcgcygtatcgacactcaccagatcgttaattggtcgttcgccattccagtaattgacgcacatcgatcg

```

Secuencia de nucleótidos que codifica fitasa de E. coli.

(secuencia codificante mostrada en mayúsculas como nucleótidos 188-1.483. La secuencia madura empieza en el nt 253)

FIGURA 29

Incubación in vitro en pienso de maíz-soja en condiciones ácidas

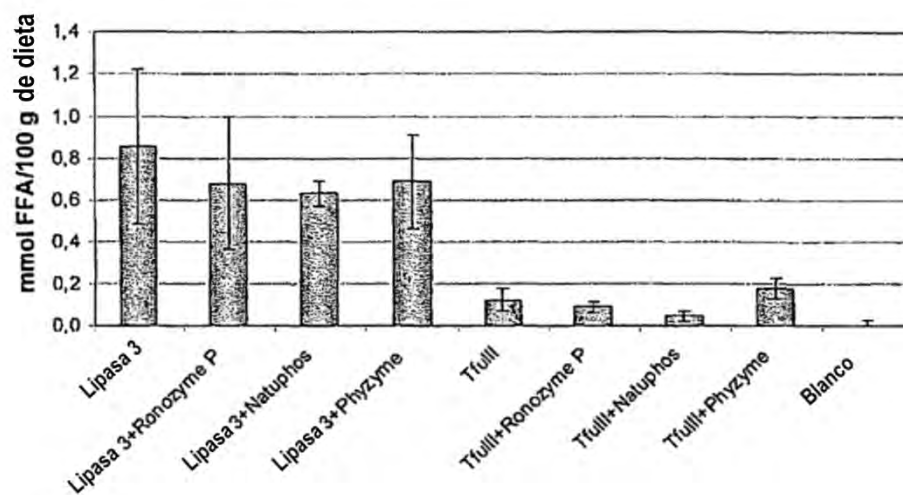
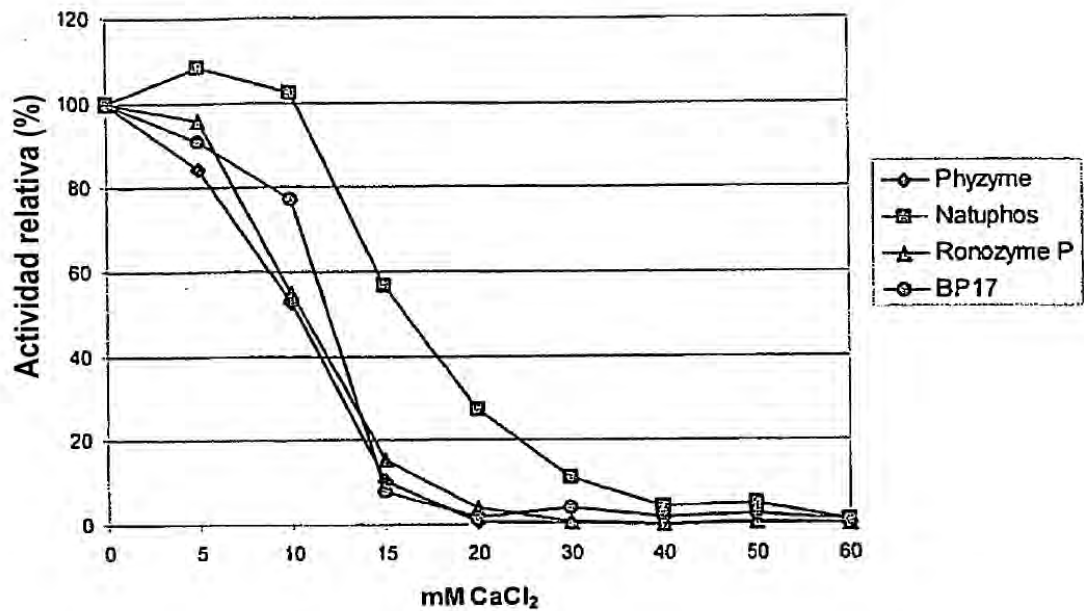


FIGURA 30

A



B

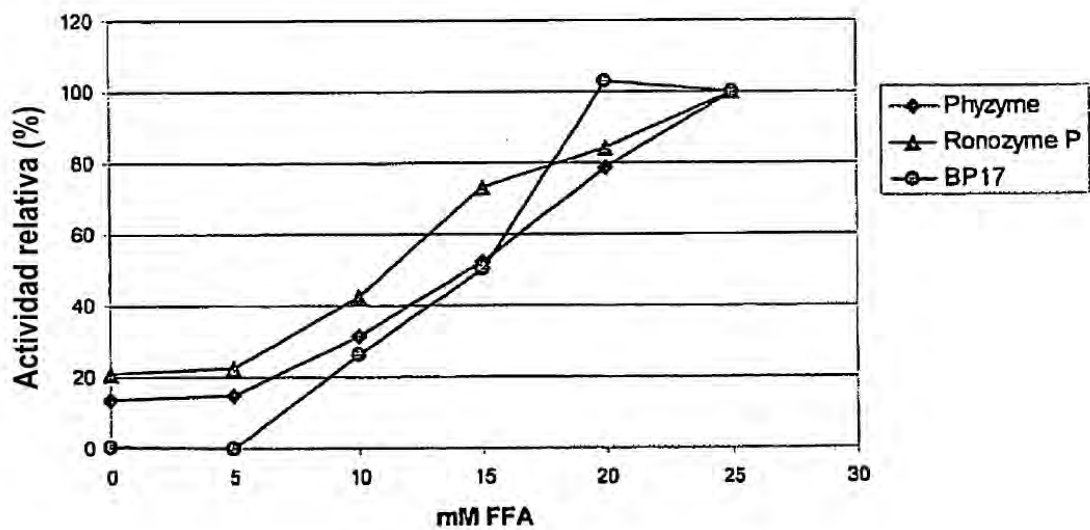
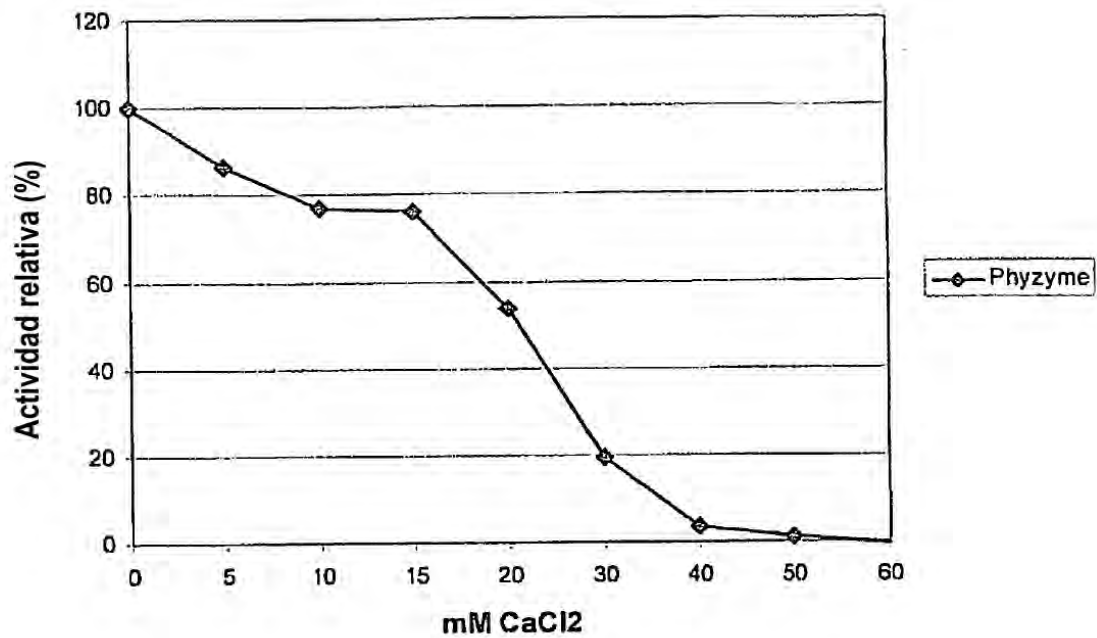


FIGURA 31

A



B

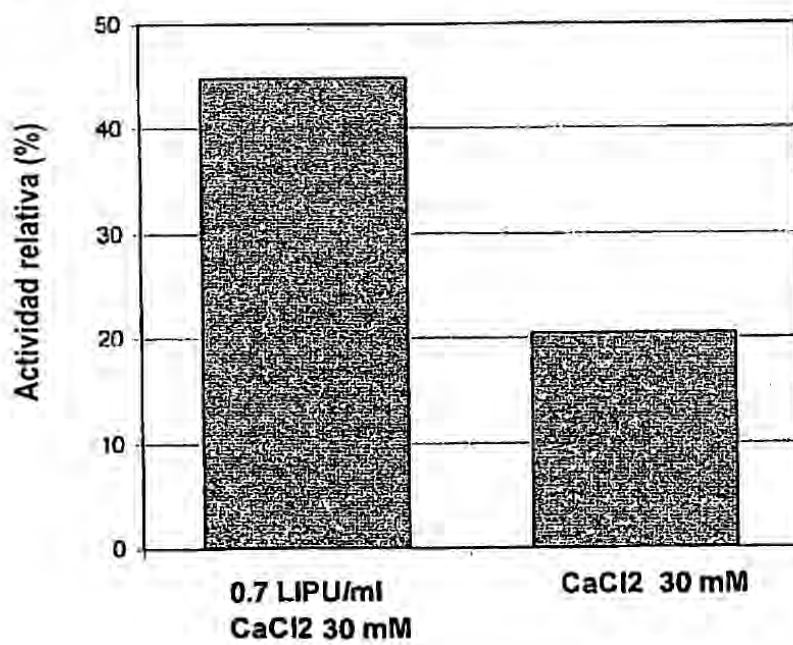


FIGURA 32

Perfil de pH en pienso de maíz-soja

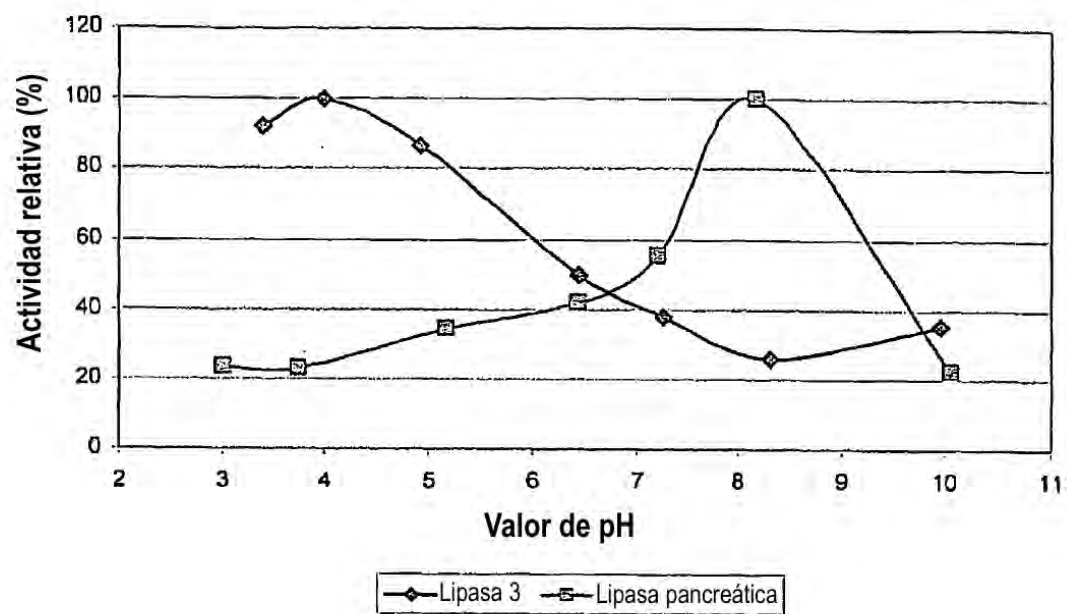


FIGURA 33

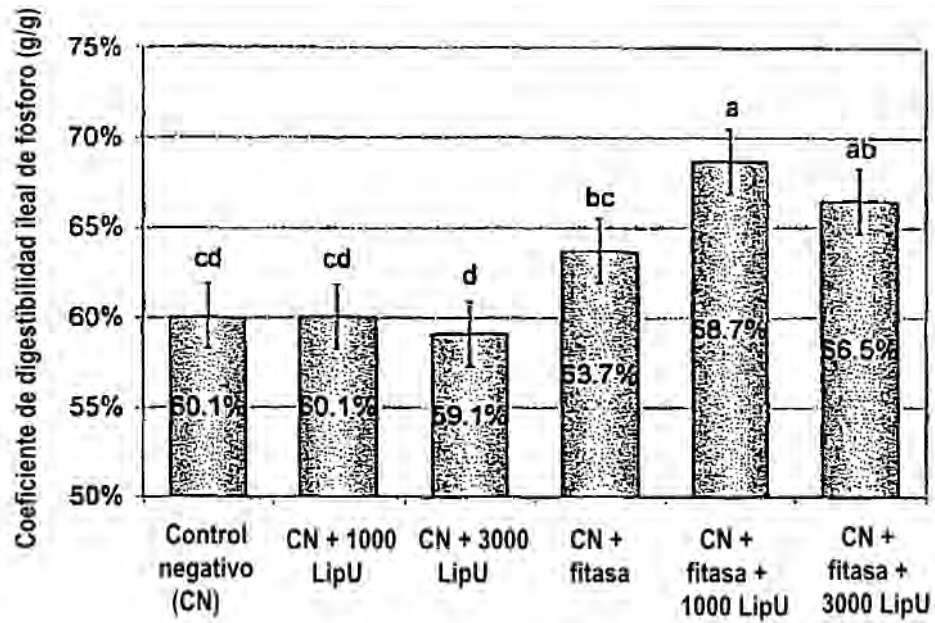


FIGURA 34

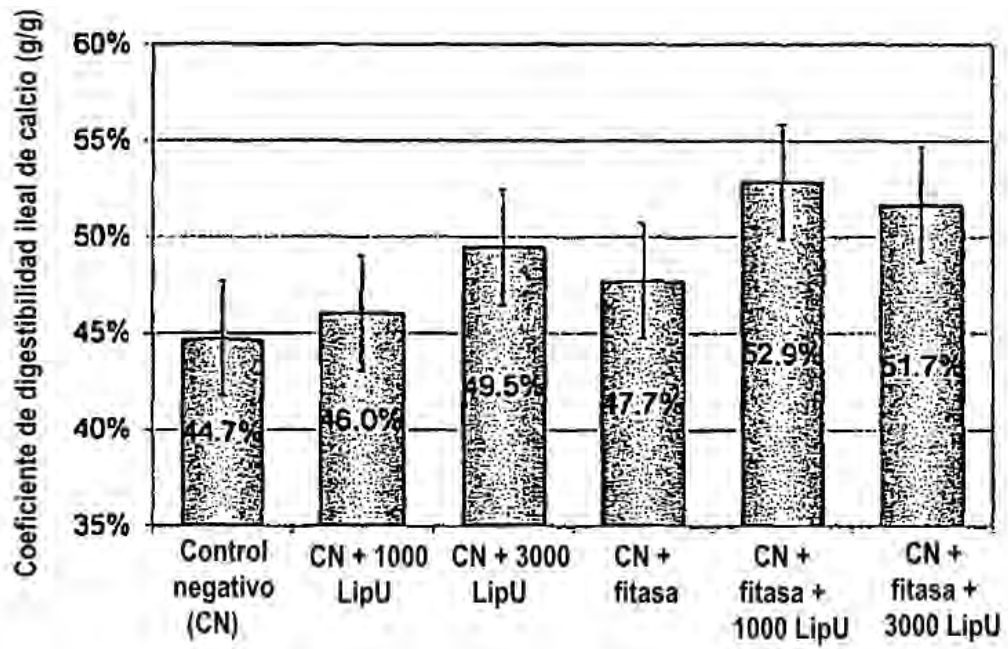


FIGURA 35

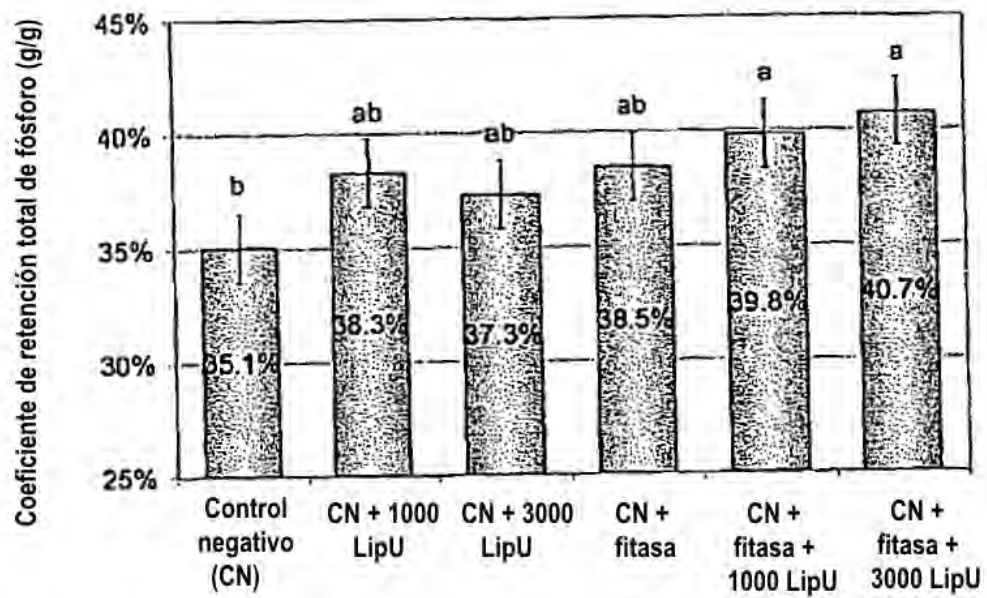


FIGURA 36

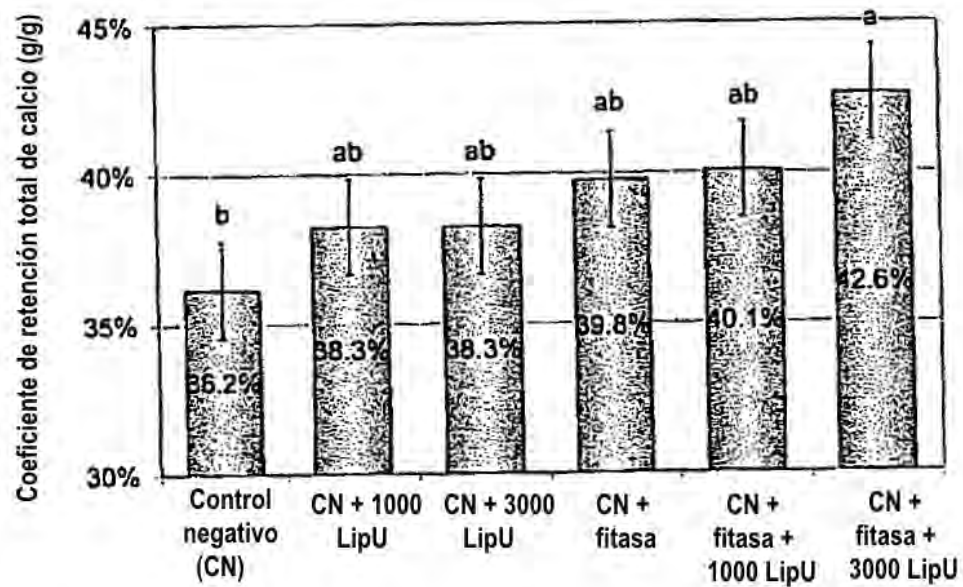


FIGURA 37

