

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 359**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/16** (2006.01)

**C12P 7/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2011 PCT/EP2011/054640**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO11117397**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2011 E 11711843 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2552232**

54 Título: **Variantes de fitasa termoestables**

30 Prioridad:

**26.03.2010 EP 10158026**

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

**19.12.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DE MARIA, LEONARDO;  
SKOV, LARS KOBBEROEE y  
SKJOET, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 594 359 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Variantes de fitasa termoestables

5 Referencia al listado de secuencias

[0001] Esta aplicación contiene un listado de secuencias en un formato legible por ordenador. El formato legible por ordenador se incorpora en este documento mediante referencia.

10 Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a un método para producir una variante de fitasa a partir de una fitasa progenitora que tiene al menos un 85 % de identidad con los aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 2, los aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 4 y/o los aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 6 cuando se alinean con la secuencia de aminoácidos respectiva utilizando el programa Needle con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización de apertura de gap de 10,0, y una penalización de extensión de gap de 0,5, y comprende establecer al menos un puente disulfuro que no está entre los cuatro puentes disulfuro de origen natural en comparación con estos y otras fitasas estrechamente relacionadas (es decir, es una variante de las mismas).

15 La invención también se refiere a las variantes producidas y al ADN que las codifica, así como su uso, por ejemplo, en piensos para animales y aditivos de pienso.

Antecedentes de la invención

Estado de la técnica

25 [0003] Las fitasas son enzimas bien conocidas, igual que lo son las ventajas de añadirlas a productos alimenticios para animales, incluyendo seres humanos. Las fitasas han sido aisladas de varias fuentes, incluyendo una multitud de cepas bacterianas y fúngicas.

30 [0004] Es un objetivo de la presente invención proporcionar polipéptidos alternativos con actividad de fitasa (fitasas) y polinucleótidos que codifican los polipéptidos. Las variantes de fitasa de la invención exhiben propiedades modificadas o alteradas, preferiblemente mejoradas, en comparación con la fitasa progenitora.

35 Ejemplos no limitantes de tales propiedades son: la estabilidad (como la estabilidad frente a ácidos, la estabilidad térmica, la estabilidad de vapor, la estabilidad frente a la granulación y/o la estabilidad de proteasa, en particular estabilidad de pepsina), el perfil de temperatura, el perfil de pH, la actividad específica, la especificidad del sustrato, el rendimiento en piensos para animales (como una liberación y/o degradación de fitato mejoradas), la susceptibilidad a la glicación y/o el patrón de glicosilación.

40 [0005] Tal y como se describe en este documento, la mutagénesis de un polinucleótido progenitor que codifica una fitasa se emplea para preparar variantes de ADN (sintético) que codifican una fitasa con propiedades mejoradas respecto a la fitasa codificada por el polinucleótido progenitor.

45 [0006] Se conocen varias estructuras tridimensionales de fitasas del tipo fosfato ácido de histidina (HAP). (por ejemplo, Lim et al. Nature struct. biol. 7,108-113 (2000)). A partir de estas se ha descubierto que todas ellas tienen cuatro puentes disulfuro ubicados en los pares de posiciones 77/108, 133/407, 178/187 y 381/390 (según la numeración usada aquí). Típicamente estos ocupan todas las cisteínas presentes en la molécula.

50 *Buttiauxiella*

[0007] WO 2006/043178 describe una fitasa de *Buttiauxella* P1-29 (depositada como NCIMB 41248) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3 de WO 2006/043178, así como ciertas variantes de la misma.

55 La secuencia de una fitasa de tipo salvaje de *Buttiauxella* y diversas variantes de la misma han sido introducidas en la base de datos GENESEQP con los siguientes números de acceso: AEH25051, AEH25056, AEH25057, AEH25058, AEH25059, AEH25060, AEH25061, AEH25062, AEH25063, AEH25064, AEH25065, AEH25066, AEH25067, AEH25068, AEH25069, AEH25070, AEH25071, AEH25072, AEH25073, AEH25074, AEH25075 y AEH25076.

60 Todas estas fitasas tienen un porcentaje de identidad con cualquiera de las SEC ID N° 2, 4 y 6 por encima del 70 %,

[0008] La secuencia de una fitasa de *Obesumbacterium proteus* se ha introducido en la base de datos UNIPROT con número de acceso Q6U677.

65 Esta fitasa, que también es descrita por Zinin et al. en FEMS Microbiology Letters, vol. 236, págs. 283-290, 2004, tiene un porcentaje de identidad con las SEC ID N° 2, 4 y 6 por encima del 70 %,

[0009] WO 2008/192901 describe fitasas de *Buttiauxella gaviniae* DSM18930, *Buttiauxella agrestis* DSM18931 y

Buttiauxella agrestis DSM18932 y diversas variantes de las mismas.

Estas fitasas se proporcionan en la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y la SEC ID N° 6 en este documento.

[0010] WO2008097619 describe también variantes de fitasa derivadas de la cepa P 1-29 de Buttiauxella sp especialmente la variante denominada BP-11 y algunas variantes de la misma.

[0011] WO 20091100183 describe otras variantes derivadas de la fitasa P1-29 de Buttiauxella sp o la variante BP-11.

Breve descripción de los dibujos y listado de secuencias

[0012]

La figura 1 muestra un alineamiento múltiple de las partes maduras esperadas de la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y la SEC ID N° 6 con las secuencias que tienen los siguientes números de acceso de GENESEQP: AEH25051, AEH25056, AEH25057, AEH25058, AEH25059, AEH25060, AEH25061, AEH25062, AEH25063, AEH25064, AEH25065, AEH25066, AEH25067, AEH25068, AEH25069, AEH25070, AEH25071, AEH25072, AEH25073, AEH25074, AEH25075 y AEH25076.

El alineamiento se hizo utilizando el método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) usando el software MEGALIGN™ de LASERGENE™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización de gap de 10 y penalización de longitud de gap de 10.

Los parámetros de alineamiento por parejas son Ktuple=1, penalización de gap=3, ventanas=5 y diagonales=5.

La figura 2 muestra un alineamiento del número de acceso Q6U677 de UNIPROT con los aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 2.

El alineamiento se hizo utilizando el programa Needle con la matriz BLOSUM62, una penalización de iniciación de gap de 10,0 y una penalización de extensión de gap de 0,5.

[0013] En el listado de secuencias las secuencias se aplican de la siguiente manera:

SEC ID N° 1	Buttiauxella gaviniae DSM18930
SEC ID N° 2	Buttiauxella gaviniae DSM18930
SEC ID N° 3	Buttiauxella agrestis DSM18931
SEC ID N° 4	Buttiauxella agrestis DSM18931
SEC ID N° 5	Buttiauxella agrestis DSM18932
SEC ID N° 6	Buttiauxella agrestis DSM18932

Resumen de ejemplos

[0014] En la especificación se proporcionan los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1: preparación de variantes y determinación de la actividad

Ejemplo 2: actividad específica

Ejemplo 3: termoestabilidad mediante DSC

Ejemplo 4: perfil de temperatura

Ejemplo 5: rendimiento en pienso para animales en un modelo in vitro

Ejemplo 6: rendimiento en un ensayo en cerdos in vivo

Descripción de la invención

[0015] La presente invención se refiere a un método para producir una variante de fitasa a partir de una fitasa progenitora que

a) tiene al menos un 85 % identidad con los aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 2, los aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 4 y/o los aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 6 cuando se alinean con la secuencia de aminoácidos respectiva utilizando el programa Needle con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización de abertura de gap de 10,0, y una penalización de extensión de gap de 0,5; y

b) comprende establecer al menos dos puentes disulfuro en comparación con la SEC ID N° 2, donde dichos puentes disulfuro no están entre los cuatro de origen natural en las posiciones 79/110,135/410,180/189 y 384/393

[0016] El porcentaje de identidad se determina tal y como se describe en la sección "Polipéptidos de fitasa, porcentaje de identidad".

[0017] Los números de posición se refieren a la numeración de posición de la SEC ID N° 2, tal y como se describe en la sección "Numeración de posición". Las posiciones que corresponden a estos números de posición de la SEC ID N° 2 en otras fitasas se determinan tal y como se describe en la sección "Identificación de los números de posición correspondientes".

5 [0018] Al menos dos puentes disulfuro se establecen en una o varias posiciones seleccionadas del grupo que consiste en los pares de posiciones: A) 143C/201 C, B) 33C/179C y C) 54C/101C.

10 [0019] Según la invención un primer puente disulfuro se establece preferiblemente en el par de posiciones A entre los residuos en las posiciones 143 y 201, y un segundo puente disulfuro se establece en el par de posiciones B entre los residuos en las posiciones 33 y 179.

[0020] En ciertas formas de realización el número de puentes disulfuro establecidos es 2, 3, 4, 5, 6 y/o 7.

15 [0021] Cuando el número de puentes disulfuro establecidos es dos, se crean las siguientes combinaciones de pares de posiciones: A+B, A+C y B+C.

[0022] Cuando el número de puentes disulfuro establecidos es tres, se pueden crear las siguientes combinaciones de pares de posiciones:  
 20 A+B+C, A+B+D, A+B+E, A+B+F, A+B+G, A+C+D, A+C+E, A+C+F, A+C+G, A+D+E, A+D+F, A+D+G, A+E+F, A+E+G, A+F+G, B+C+D, B+C+E, B+C+F, B+C+G, B+D+E, B+D+F, B+D+G, B+E+F, B+E+G, B+F+G, C+D+E, C+D+F, C+D+G, C+E+F, C+E+G, C+F+G, D+E+F, D+E+G, D+F+G y E+F+G.

25 [0023] Cuando el número de puentes disulfuro establecidos es cuatro, se pueden crear las siguientes combinaciones de pares de posiciones: A+B+C+D, A+B+C+E, A+B+C+F, A+B+C+G, A+B+D+E, A+B+D+F, A+B+D+G, A+B+E+F, A+B+E+G, A+B+F+G, A+C+D+E, A+C+D+F, A+C+D+G, A+C+E+F, A+C+E+G, A+C+E+H, A+C+F+G, A+D+E+F, A+D+E+G, A+D+F+G, A+E+F+G, B+C+D+E, B+C+D+F, B+C+D+G, B+C+E+F, B+C+E+G, B+C+F+G, B+D+E+F, B+D+E+G, B+D+F+G, B+E+F+G, C+D+E+F, C+D+E+G, C+D+F+G, C+E+F+G, C+E+F+H, y D+E+F+G.

30 [0024] Cuando el número de puentes disulfuro establecidos es cinco, se pueden crear las siguientes combinaciones de pares de posiciones: 'A+B+C+D+E, A+B+C+D+F, A+B+C+D+G, A+B+C+E+F, A+B+C+E+G, A+B+C+F+G, A+B+D+E+F, A+B+D+E+G, A+B+D+F+G, A+B+E+F+G, A+B+F+G+H, A+C+D+E+F, A+C+D+E+G, A+C+D+F+G, A+C+E+F+G, A+D+E+F+G, B+C+D+E+F, B+C+D+E+G, B+C+D+F+G, B+C+E+F+G, B+D+E+F+G, y C+D+E+F+G.

35 [0025] Cuando el número de puentes disulfuro establecidos es seis, se pueden crear las siguientes combinaciones de pares de posiciones: A+B+C+D+E+F, A+B+C+D+E+G, A+B+C+D+F+G, A+B+C+E+F+G, A+B+D+E+F+G, A+C+D+E+F+G, y B+C+D+E+F+G.

40 [0026] Cuando el número de puentes disulfuro establecidos es siete, se puede crear la siguiente combinación de pares de posiciones: A+B+C+D+E+F+G.

[0027] En todas las combinaciones anteriores A significa 143C/201C, B significa 33C/179C, C significa 54C/101C, D significa 93C/48C, E significa 33C/178C, F significa 61C/102C y G significa 164C/251C

45 [0028] Según el método de la invención, la variante de fitasa puede además comprender al menos una modificación en al menos una posición seleccionada de las siguientes: 1, 9, 10, 18, 22, 25, 26, 37, 38, 66, 71, 81, 89, 92, 94, 109, 111, 119, 120, 121, 131, 134, 141, 142, 144, 152, 155, 160, 164, 171, 176, 178, 188, 190, 192, 193, 206, 207, 209, 211, 214, 215, 219, 222, 239, 235, 243, 245, 248, 253, 255, 256, 257, 260, 261, 268, 270, 277, 283, 285, 287, 288, 293, 296, 303, 306, 307, 308, 314, 318, 328, 337, 345, 350, 364, 371, 372, 396, 399, 406 y/o 413.

50 [0029] La invención además estipula que las modificaciones anteriores son elegidas específicamente de las modificaciones siguientes: 1S, 9I, 10I, R18, R22, T25, 26E, 37Y, 38S, 66E, 71 K, 81A, 89T, 92E, R94, 109Q, 111G, 119N, 120L, 121E, K131, 134I, 134V, 141R, 142L, T144, 152M, 155E, 160R, 164F, 171I, 176K, 178P, 188N, 190E, 192G, 193Q, N206, 207E, 207T, 209S, 211 C, 214V, G215, T219, E222, 239K, 235V, E243, 245D, 248E, 248L, 248S, H253, 255A, 255T, 256H, 256Y, F257; M260, 261E, 268A, 268T, 270K, 277T, 283E, 283D, 285K, 287D, 288V, 288A, 293G, 296S, 303L, 303F, H306, D307, T308, 314A, 314S, 318D, D328, 337I, 345A, 350I, 364A, 371 K, 372E, 396P, 399K, 406E y/o 413P.

60 [0030] En realizaciones específicas de la invención los puentes disulfuro adicionales son seleccionados del grupo que comprende: Q143C/I201C, D33C/W179C, E54C/A101C, Q93C/Y48C, D33C/A178C, G61C/F102C y F164C/K251C.

65 [0031] En otras realizaciones específicas del método de la invención otras modificaciones específicas son: N1S, S1N, I9V, V9I, V10I, K26E, N37Y, T38S, S38T, E66Q, Q66E, K71Q, Q71K, T81A, A81T, A89T, D92E, E109Q, H111G, D119N, I120L, K121E, T134I, T134V, R141Q, Q141R, V142L, L142V, T144I, T152M, M152T, E155D,

D155E, H160R, S164F, F164S, T171I, T176K, A178P, S188N, D190E, A192G, G192A, L193Q, K207E, K207T, A209S, D211C, I214V, V214I, A235V, K239N, N239K, E245D, D245E, E248S, E248L, S248L, S248E, A255T, T255A, V255A, V255T, Q256H, Q256Y, A261 E, R268A, R268T, A268R, A268T, T268A, T268R, N270K, A277T, T277A, D283N, D283E, E283N, E283D, N283D, N283E, N285K, K285N, D287T, T287D, A288E, A288V, V288E, V288A, E288A, E288V, D293G, P296S, S296P, I303L, I303F, L303F, F303L, L303I, S314A, A314S, N318D, I337V, V337I, S345A, A345S, V350I, I350V, A364S, A364S, S364A, K371 N, N371K, E372Q, E372Q, Q372E, P396S, S396P, T399K, K399T, E406V, V406E, P413Q y/o Q413P y/o de las siguientes combinaciones D92E/H160R, A261E/N270K, T134I/K207T, D190E/K207E/N318D, T134I/K207T/A261 E/N270K, T134I/K207E/A209S/A261 E/N270K, A89T/T134I/F164S/T176K/A178P/K207E/A261 E/N270K, A89T/T134I/F164S/T176K/A178P/K207E/A209S/S248L/Q256Y/A261 E/N270K, A89T/D92E/H160R/F164S/T176K/A178P/S188N/G192A/K207E/A261 E/N270K, D92E/T134I/H160R/F164S/T170I/T176K/A188P/K207E/A235V/Q256H/A261 E/N270K, A89T/T134I/H160R/F164S/T170I/T176K/A188P/K207E/A235V/Q256H/A261 E/N270K/I303F y/o N37Y/D92E/T134I/H160R/F164S/T171I/T176K/A188P/K207E/A235V/Q256H/A261 E/N270K.

[0032] El método de la invención se puede utilizar para crear una variante de cualquier tipo salvaje o variante de fitasa. En realizaciones particulares, produce una variante de la parte madura de la fitasa de la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 o la SEC ID N° 6, o una parte madura de cualquiera las siguientes secuencias de GENESEQP: AEH25051, AEH25056, AEH25057, AEH25058, AEH25059, AEH25060, AEH25061, AEH25062, AEH25063, AEH25064, AEH25065, AEH25066, AEH25067, AEH25068, AEH25069, AEH25070, AEH25071, AEH25072, AEH25073, AEH25074, AEH25075 o AEH25076 que se usa como un progenitor/esqueleto para producir una variante de fitasa.

[0033] El método de la invención puede proporcionar una variante de fitasa con propiedades mejoradas, tales como termoestabilidad, estabilidad calorífica, estabilidad de vapor, perfil de temperatura, estabilidad frente a la granulación, estabilidad frente a ácidos, perfil de pH y/o estabilidad de proteasa, en particular estabilidad de pepsina, actividad específica, especificidad de sustrato, rendimiento en piensos para animales (como una liberación y/o degradación de fitato mejoradas), susceptibilidad a la glicación y/o patrón de glicosilación. Las variantes proporcionadas por la invención exhiben propiedades térmicas especialmente mejoradas tales como termoestabilidad, estabilidad térmica, estabilidad de vapor, perfil de temperatura, estabilidad frente a la granulación o rendimiento mejorado en piensos para animales.

[0034] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con propiedades térmicas mejoradas, tales como termoestabilidad, estabilidad calorífica, estabilidad de vapor, perfil de temperatura y/o estabilidad frente a la granulación.

[0035] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con termoestabilidad mejorada.

[0036] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con estabilidad calorífica mejorada.

[0037] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con estabilidad de vapor mejorada.

[0038] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con perfil de temperatura mejorado.

[0039] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con estabilidad frente a la granulación mejorada.

[0040] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con estabilidad frente a ácidos mejorada.

[0041] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con perfil de pH mejorado.

[0042] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con estabilidad de proteasa mejorada, en particular estabilidad de pepsina.

[0043] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con actividad específica mejorada.

[0044] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con especificidad de sustrato mejorada.

[0045] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con rendimiento mejorado en piensos para animales (como una liberación y/o degradación de fitato mejoradas).

[0046] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con susceptibilidad a la glicación mejorada.

[0047] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con patrón mejorado y/o de

glicosilación.

- 5 [0048] La invención se refiere además a polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican las variantes de fitasa producidas por el método; constructos de ácidos nucleicos que comprenden los polinucleótidos operativamente enlazados a una o varias secuencias de control, que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión; vectores de expresión recombinantes que comprenden tales constructos de ácidos nucleicos; y células huésped recombinantes que comprenden un constructo de ácidos nucleicos y/o un vector de expresión.
- 10 [0049] La invención se refiere además a métodos para producir variantes de fitasa tal como se proporciona que comprenden  
 (a) cultivar una célula huésped para producir un sobrenadante que comprenda la fitasa; y  
 (b) recuperar la fitasa.
- 15 [0050] La invención se refiere además a plantas o partes de planta transgénicas capaces de expresar las variantes de fitasa, composiciones que comprenden al menos una variante de fitasa, y (a) al menos una vitamina liposoluble; (b) al menos una vitamina hidrosoluble; y/o (c) al menos un oligoelemento.  
 Tales composiciones pueden además comprender al menos una enzima seleccionada del siguiente grupo de enzimas: amilasa, fitasa, fosfatasa, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasa, fosfolipasa y/o beta-glucanasa. Las composiciones pueden ser aditivos de piensos para animales que pueden tener un contenido bruto de proteína de 50 a 800 g/kg y que comprenden una variante de fitasa de la invención.
- 20 [0051] La invención se refiere además a métodos para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, añadiendo una variante de fitasa de la invención al pienso, procesos para reducir los niveles de fitato en abono animal alimentando un animal con una cantidad eficaz de pienso, métodos para el tratamiento de proteínas vegetales, que comprenden el paso de añadir una variante de fitasa por lo menos a una proteína vegetal, y el uso de una variante de fitasa de una composición de la invención.
- 25 [0052] La invención también proporciona un método para producir un producto de fermentación tal como, por ejemplo, etanol, cerveza y vino, que comprende fermentar un material de carbohidratos en presencia de una variante de fitasa, un método para producir etanol que comprende fermentar un material de carbohidratos en presencia de una variante de fitasa, y producir etanol.
- 30 Polipéptidos de fitasa, porcentaje de identidad
- 35 [0053] En el presente contexto una fitasa es un polipéptido con actividad de fitasa, es decir una enzima que cataliza la hidrólisis de fitato (mioinositol hexaquisfosfato) hacia (1) mioinositol y/o (2) mono-, di-, tri-, tetra- y/o pentafosfatos del mismo y (3) fosfato inorgánico.
- 40 [0054] En el presente contexto, el término "sustrato de fitasa" abarca, entre otros, ácido fítico y cualquier fitato (sal de ácido fítico), así como los fosfatos enumerados en (2) anteriormente.
- 45 [0055] La página ENZYME en internet (<http://www.expasy.ch/enzyme/>) es un repositorio de información relativa a la nomenclatura de enzimas.  
 Está basado principalmente en las recomendaciones del Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUB-MB) y describe cada tipo de enzima caracterizada para el que se haya proporcionado un número EC (comisión enzimática) (Bairoch A. The ENZYME database, 2000, Nucleic Acids Res 28:304-305).  
 Ver también el manual Enzyme Nomenclature de NC-IUBBM, 1992).
- 50 [0056] Según la página ENZYME, se conocen tres tipos diferentes de fitasas: la llamada 3-fitasa (nombre alternativo 1-fitasa; una mioinositol hexafosfato 3-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.8), la llamada 4-fitasa (nombre alternativo 6-fitasa, nombre basado en sistema de numeración 1L y no en el 1D, EC 3.1.3.26) y la llamada 5-fitasa (EC 3.1.3.72).  
 A efectos de la presente invención, los tres tipos se incluyen en la definición de fitasa.
- 55 [0057] En una realización particular, las fitasas de la invención pertenecen a la familia de las fosfatasas ácidas de histidina, que incluyen la fosfatasa ácida pH 2,5 de *Escherichia coli* (gen *appA*) así como fitasas fúngicas tales como fitasas A y B de *Aspergillus awamorii* (EC: 3.1.3.8) (genes *phyA* y *phyB*).  
 Las fosfatasas ácidas de histidina comparten dos regiones de similitud de secuencia, cada una centrada alrededor de un residuo conservado de histidina.  
 Estas dos histidinas parecen estar involucradas en el mecanismo catalítico de las enzimas.  
 La primera histidina se ubica en la sección N-terminal y forma un intermedio de fosfo-histidina mientras que la segunda se ubica en la sección C-terminal y posiblemente actúa como donante de protones.
- 60 [0058] En otra realización particular, las fitasas de la invención tienen un motivo de sitio activo conservado, a saber, R-H-G-X-R-X-P, donde X designa cualquier aminoácido (ver los aminoácidos 16 a 22 de las SEC ID N° 2, 3, 4, 6 y

los aminoácidos 38-44 de la SEC ID N° 9).

En una realización preferida, el motivo de sitio activo conservado es R-H-G-V-R-A-P, es decir, los aminoácidos 16-22 (en referencia a la SEC ID N° 2) son RHGVRAP.

5 [0059] Para los fines de la presente invención la actividad de fitasa se determina en unidades FYT, siendo un FYT la cantidad de enzima que libera 1 micromol de ortofosfato inorgánico por minuto bajo las condiciones siguientes: pH 5,5; temperatura 37°C; sustrato: fitato de sodio (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>24</sub>P<sub>6</sub>Na<sub>12</sub>) en una concentración de 0,0050 mol/l. Ensayos de fitasa adecuados son los ensayos FYT y FTU descritos en ejemplo 1 de WO 00/20569. FTU es para determinar la actividad de fitasa en piensos y premezclas.

10 La actividad de fitasa también se puede determinar utilizando los ensayos del ejemplo 1 ("Determinación de la actividad de fosfatasa" o "Determinación de la actividad de fitasa").

[0060] En una realización particular la fitasa de la invención está aislada.

15 El término "aislada" tal y como se utiliza en este documento se refiere a un polipéptido que es al menos un 20 % puro, preferiblemente al menos un 40 % puro, más preferiblemente al menos un 60 % puro, aún más preferiblemente al menos un 80 % puro, de la forma más preferible al menos un 90 % puro, e incluso de la forma más preferible al menos un 95% puro, según se determina mediante SDS-PAGE. En particular, se prefiere que los polipéptidos estén en "forma esencialmente pura", es decir, que el preparado polipeptídico está esencialmente libre de otro material polipeptídico con el cual está originalmente asociado.

20 Esto se puede conseguir, por ejemplo, preparando el polipéptido mediante métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación tradicionales.

[0061] La relación entre dos secuencias de aminoácidos se describe mediante el parámetro "identidad". Para los fines de la presente invención, el alineamiento de dos secuencias de aminoácidos se determina usando el programa Needle del paquete EMBOSS (<http://emboss.org>) versión 2.8.0.

25 El programa Needle implementa el algoritmo de alineamiento global descrito en Needleman, S. B. Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48,443-453.

La matriz de sustitución usada es BLOSUM62, la penalización de abertura de gap es 10 y la penalización de extensión de gap es 0,5.

30 [0062] El grado de identidad entre una secuencia de aminoácidos de la presente invención ("secuencia de la invención") y la secuencia de aminoácidos referida en las reivindicaciones (SEC ID N° 2) se calcula como el número de coincidencias exactas en un alineamiento de las dos secuencias, dividido por la longitud de la "secuencia de la invención" o por la longitud de la SEC ID N° 2, la que sea más corta.

35 El resultado se expresa en porcentaje de identidad.

[0063] Una correspondencia exacta ocurre cuando la "secuencia de la invención" y la SEC ID N° 2 tienen residuos de aminoácidos idénticos en las mismas posiciones del solapamiento (en el ejemplo de alineamiento siguiente esto se representa mediante "I"). La longitud de una secuencia es el número de residuos de aminoácidos en la secuencia (por ejemplo, la longitud de los aminoácidos 1-411 de la SEC ID N° 2 es 411).

40

[0064] En el siguiente ejemplo de alineamiento puramente hipotético, el solapamiento es la secuencia de aminoácidos "HTWGER-NL" de la secuencia 1; o la secuencia de aminoácidos "HGWGEDANL" de la secuencia 2. En el ejemplo se indica un espacio mediante un "-".

45 [0065] Ejemplo de alineamiento hipotético:

```

Secuencia 1:      ACMSHTWGER-NL
                   |  | |  | |
Secuencia 2:      HGWGEDANLAMNPS
    
```

50

[0066] En una realización particular, el porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido con la SEC ID N° 2 se determina, i) alineando las dos secuencias de aminoácidos utilizando el programa Needle, con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización de abertura de gap de 10 y una penalización de extensión de gap de 0,5; ii) contando el número de coincidencias exactas en el alineamiento; iii) dividiendo el número de coincidencias exactas por la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos; y iv) convirtiendo el resultado de la división iii) a porcentaje.

60

[0067] En el ejemplo hipotético anterior, el número de coincidencias exactas es 6, la longitud más corta de una de las dos secuencias de aminoácidos es 12; por consiguiente, el porcentaje de identidad es 50 %.

[0068] En realizaciones particulares de la fitasa de la invención, el grado de identidad para la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 es al menos un 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %.

65

98 % o al menos un 99 %.

En otras realizaciones particulares, el grado de identidad es al menos un 98,0 %, 98,2 %, 98,4 %, 98,6 %, 98,8 %, 99,0 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o al menos un 99,9 %.

En realizaciones alternativas, el grado de identidad es al menos un 70 %, 71 %, 72 %, o al menos un 73 %.

5 [0069] En otras realizaciones particulares, la fitasa no tiene más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o no más de 10 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o no más de 20 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2; no más de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o no más de 30 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2; no más de 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o no más de 40 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o no más de 50 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o no más de 60 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 o no más de 70 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 o no más de 80 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 o no más de 90 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o no más de 100 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109 o no más de 110 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 o no más de 120 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; o no más de 121, 122, 123 o 124 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora.

#### Numeración de posición

30 [0070] La nomenclatura que se usa en este documento para definir las posiciones de los aminoácidos se basa en la secuencia de aminoácidos de la fitasa madura de *Buttiauxella gaviniae* DSM 18930 que se da en el listado de secuencias como SEC ID N° 2 (aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 2).  
Por consiguiente, en el presente contexto, la base para numerar las posiciones es la SEC ID N° 2 empezando con N1 y terminando con Q413. (SEC ID N° 2) como estándar para la numeración de posición y, así, también para la nomenclatura.

35 [0071] Cuando se usa en este documento, el término parte (o secuencia) "madura" se refiere a esa parte del polipéptido que es segregada por una célula que contiene, como parte de su equipamiento genético, un polinucleótido que codifica el polipéptido.  
En otras palabras, la parte de polipéptido maduro se refiere a la parte del polipéptido que permanece después de que la parte de péptido señal, así como una parte de propéptido, si lo hay, haya sido dividida.  
La parte de péptido señal puede ser predicha por programas conocidos en la técnica (por ejemplo, SignalP).  
Generalmente, el primer aminoácido de la parte madura de una enzima se puede determinar mediante secuenciación del N-terminal de la enzima purificada.  
Cualquier diferencia entre la parte de péptido señal y la parte madura debe ser debida entonces a la presencia de un propéptido.

#### Modificaciones tales como sustituciones, deleciones e inserciones

50 [0072] Una variante de fitasa puede comprender varios tipos de modificaciones con respecto a una plantilla (es decir, una secuencia de aminoácidos de referencia o de comparación tal como la SEC ID N° 2): un aminoácido puede ser sustituido por otro aminoácido; un aminoácido puede ser eliminado; un aminoácido puede ser insertado; así como cualquier combinación de cualquier número de tales modificaciones.  
En el presente contexto el término "inserción" pretende incluir también las extensiones N- y/o C-terminal.

55 [0073] La nomenclatura general que se usa en este documento para una única modificación es la siguiente: XDcY, donde "X" e "Y" designan de manera independiente un código de aminoácido de una sola letra, o un "\*" (delección de un aminoácido), "D" designa un número y "c" designa un contador alfabético (a, b, c, etcétera), que está solo presente en inserciones.  
Se hace referencia a Tabla 1 a continuación que describe ejemplos puramente hipotéticos de la aplicación de esta nomenclatura a varios tipos de modificaciones.

Tabla 1

Tipo	Descripción	Ejemplo
Sustitución	X = Aminoácido en la plantilla D = Posición vacía en la	G80A



	plantilla c Y = Aminoácido en variante	80 AALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSG        :        AALNNSIAVLGVAPSAELYAVKVLGASGSG
Inserción	X="*" D = Posición en la plantilla antes de la inserción c="a" para la primera inserción en esta posición, "b" para la siguiente, etc.	*80aT *80bY *85aS 80 85 AALNNSIG..VLGVA.PSAELYAVKVLGASG               AALNNSIGTYVLGVASPSAELYAVKVLGASG
Delección	X = Aminoácido en la plantilla D = Posición vacía en la plantilla c Y = "*"	V81* 80 AALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSG                 AALNNSIG.LGVAPSAELYAVKVLGASGSG
Extensión N-terminal	Inserción en la posición "0".	*0aA*0bT*0cG 1 ...AQSVPWGISRVQ         ATGAQSVPWGISRVQ
Extensión C-terminal	Inserción después del aminoácido del N-terminal	*275aS *275bT 270 275 ATSLGSTNLYGSLVNAEAAATR..         ATSLGSTNLYGSLVNAEAAATRST

[0074] Como se explica anteriormente, el número de posición ("D") se cuenta desde el primer residuo de aminoácido de la SEC ID N° 2.

5 [0075] Diferentes modificaciones en la misma secuencia están separadas por "/" (barra oblicua), por ejemplo, la designación "1\*/2\*/3\*" significa que los aminoácidos en las posiciones número 1, 2, y 3 se eliminan todos, y la designación "104A/105F" significa que el aminoácido en la posición número 104 se sustituye por A, y el aminoácido en la posición número 105 se sustituye por F.

10 [0076] Las modificaciones alternativas están separadas por "," (coma), por ejemplo, la designación "119R,K" significa que el aminoácido en la posición 119 se sustituye por R o K.

[0077] Las comas usadas en este documento en otras enumeraciones de posibilidades significan lo que habitualmente significan gramáticamente, a saber, frecuentemente y/o.

15 Por ejemplo, la primera coma en el listado "53V,Q, 121 D, y/o 167Q" denota una alternativa (V o Q), mientras que las dos comas siguientes deberían ser interpretadas como y/o: 53 V o Q, y/o 121 D, y/o 167Q.

[0078] En el presente contexto, "al menos una" (por ejemplo, modificación) significa una o varias, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones; o 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 25, 28 o 30 modificaciones; y así sucesivamente, hasta un número máximo de modificaciones de 125, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o de 200.

20 Las variantes de fitasa de la invención, sin embargo, todavía tienen que ser al menos un 85 % idénticas a la SEC ID N° 2. Este porcentaje se determina como se ha descrito anteriormente.

25 [0079] Una sustitución o extensión sin alguna indicación de qué sustituir o extender se refiere a la inserción de cualquier aminoácido natural o no natural, excepto el que ocupa esta posición en la plantilla.

Identificación de los números de posición correspondientes

30 [0080] Como se ha explicado anteriormente, la secuencia madura de aminoácidos de la fitasa madura de *Buttiauxella gaviniae* DSM 18930 (SEC ID N° 2) se usa como estándar para la numeración de posición y, de este modo, también para la nomenclatura.

35 [0081] Para otra fitasa, en particular una variante de fitasa de la invención, la posición que corresponde a la posición D en la SEC ID N° 2 se encuentra mediante el alineamiento de las dos secuencias tal y como se especifica anteriormente en la sección titulada "Polipéptidos de fitasa, porcentaje de identidad". A partir del alineamiento, la posición en la secuencia de la invención que corresponde a la posición D de la SEC ID N° 2 se puede identificar claramente y sin ambigüedad (las dos posiciones una encima de la otra en el alineamiento).

40 [0082] Más adelante se incluyen ejemplos adicionales, puramente hipotéticos, que se derivan de la tabla 1 anterior en cuya tercera columna incluye varios alineamientos de dos secuencias:

Considerar la tercera celda de la primera fila de la tabla 1: la secuencia superior es la plantilla, la inferior la variante.

La posición número 80 se refiere al residuo de aminoácido G en la plantilla. El aminoácido A ocupa la posición correspondiente en la variante. Por consiguiente, esta sustitución se designa G80A.

5 [0083] Considerar ahora la tercera celda de la segunda fila de la tabla 1: la secuencia superior es otra vez la plantilla y la inferior la variante.

La posición número 80 nuevamente se refiere al residuo de aminoácido G en la plantilla.

La variante tiene dos inserciones, a saber, TY después de G80 y antes de V81 en la plantilla.

10 Mientras que el T y el Y por supuesto tendrían su propio número de posición "real" en la variante de la secuencia de aminoácidos, para los fines presentes nos referimos siempre a los números de posición de la plantilla, y por consiguiente se dice que el T y el Y están en las posiciones número 80a y 80b, respectivamente.

15 [0084] Finalmente, considerar la tercera celda de la última fila de la tabla 1: la posición número 275 se refiere al último aminoácido de la plantilla.

Se dice que una extensión del C-terminal de ST está en las posiciones número 275a y 275b, respectivamente, aunque, nuevamente, por supuesto tienen su propio número de posición "real" en la variante de la secuencia de aminoácidos.

20 Propiedades modificadas, fitasa de referencia

[0085] En una realización particular, la fitasa de la invención ha modificado, preferiblemente mejorado, propiedades. Los términos "modificado" y "mejorado" implican una comparación con otra fitasa.

Ejemplos de tales otras fitasas de referencia o de comparación son: la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6.

25 Ejemplos adicionales de fitasas de referencia pueden ser las secuencias de GENESEQP: AEH25051, AEH25056, AEH25057, AEH25058, AEH25059, AEH25060, AEH25061, AEH25062, AEH25063, AEH25064, AEH25065, AEH25066, AEH25067, AEH25068, AEH25069, AEH25070, AEH25071, AEH25072, AEH25073, AEH25074, AEH25075 o AEH25076 descritos en la Fig. 1.

30 [0086] Ejemplos no limitantes de propiedades que son modificadas, preferiblemente mejoradas, son los siguientes: termoestabilidad, perfil de pH, actividad específica, rendimiento en piensos para animales, estabilidad frente a la granulación, sensibilidad de proteasa y/o patrón de glicosilación.

Las variantes de fitasa producidas por el método de la invención exhiben termoestabilidad mejorada y pueden tener también un perfil de temperatura modificado, preferiblemente mejorado, y/o pueden incorporar un cambio de un sitio potencial de división de proteasa.

35

Rendimiento térmico

Termoestabilidad

40 [0087] La termoestabilidad se puede determinar como se describe en el ejemplo 3, es decir, usando mediciones de DSC para determinar la temperatura de desnaturalización, T<sub>d</sub>, de la proteína fitasa purificada.

La T<sub>d</sub> es indicativa de la termoestabilidad de la proteína: cuanto mayor es la T<sub>d</sub>, mayor es la termoestabilidad.

45 Por consiguiente, en una realización preferida, la fitasa de la invención tiene una T<sub>d</sub> que es superior a la T<sub>d</sub> de una fitasa de referencia, donde la T<sub>d</sub> se determina en muestras de fitasa purificadas (preferiblemente con una pureza de al menos un 90 % o 95 %, determinada mediante SDS-PAGE).

[0088] La termoestabilidad también se puede determinar de la siguiente manera.

50 Por consiguiente, en una realización preferida la fitasa de la invención, tras la incubación durante 60 minutos a 70°C y pH 4,0, tiene una actividad residual mejorada en comparación con la actividad residual de una fitasa de referencia tratada de la misma manera, calculando la actividad residual para cada fitasa con respecto a la actividad encontrada antes la incubación (a 0 minutos).

La actividad residual se mide preferiblemente en fitato de sodio a pH 5,5 y 37°C. La incubación preferiblemente es en acetato de sodio 0,1 M a pH 4,0.

55 La fitasa preferiblemente está purificada, más preferiblemente a una pureza de al menos un 95 %, determinada mediante SDS-PAGE. Un tampón de ensayo de actividad de fitasa preferido es acetato de sodio 0,25 M a pH 5,5.

Usando este método, la actividad residual de la fitasa de la invención es preferiblemente al menos un 105 % de la actividad residual de la fitasa de referencia, más preferiblemente al menos un 110 %, 115 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 % o al menos un 200 %.

60 En la alternativa, la actividad residual respecto a la actividad a los 0 minutos es preferiblemente al menos un 31 % o al menos un 32 %.

Se prefieren las siguientes sustituciones que proporcionan termoestabilidad mejorada (ver tabla 9): 273L, 46E, 362R y/o 53V.

65 [0089] En una realización particular, la variante de fitasa de la invención es más termoestable que la fitasa de referencia, donde la termoestabilidad se determina utilizando cualquiera de las cuatro pruebas mencionadas

anteriormente (basadas en los ejemplos).

#### Estabilidad calorífica

- 5 [0090] La estabilidad calorífica se puede determinar como se describe en el ejemplo 4 determinando el perfil de temperatura/actividad de las variantes de fitasa.

#### Perfil de temperatura / estabilidad de temperatura

- 10 [0091] Se puede determinar según se describe en el ejemplo 4 si una fitasa de la invención tiene un perfil de temperatura modificado comparado con una fitasa de referencia. Por consiguiente, en una realización particular, la fitasa de la invención tiene un perfil de temperatura modificado comparado con una fitasa de referencia, donde el perfil de temperatura se determina como la actividad de fitasa como función de la temperatura en fitato de sodio a pH 5,5 en el intervalo de temperaturas de 20-90°C (en pasos de 10°C).

- 15 Un tampón preferido está en un tampón de acetato de sodio 0,25 M a 5,5 pH. La actividad a cada temperatura se indica preferiblemente como la actividad relativa (en %) normalizada al valor a temperatura óptima.

- La temperatura óptima es aquella temperatura dentro de las temperaturas ensayadas (es decir, aquellas con saltos de 5-10°C) donde la actividad es máxima.

#### 20 Perfil de pH

[0092] Se puede determinar según se describe en los ejemplos si una fitasa de la invención tiene un perfil de pH modificado comparado con una fitasa de referencia.

- 25 Por consiguiente, en una realización particular, la fitasa de la invención tiene un perfil de pH modificado en comparación con una fitasa de referencia, donde el perfil de pH se determina como la actividad de fitasa como función del pH en fitato de sodio a 37°C en el intervalo de pH de 2,0 a 7,5 (en pasos de 0,5 unidades de pH).

Un tampón preferido es un cóctel de glicina 50 mM, ácido acético 50 mM y Bis-Tris 50 mM.

Otro tampón preferido es acetato sódico 0,25 M.

- 30 La actividad a cada pH se indica preferiblemente como la actividad relativa (en %) normalizada al valor a pH óptimo.

[0093] Un ejemplo de un perfil de pH modificado es donde la curva de pH (actividad relativa como función de pH) se desplaza hacia pH más alto o más bajo.

- 35 [0094] Otro ejemplo de un perfil de pH modificado es donde se cambia el pH óptimo, en la dirección ascendente o descendente

[0095] Un perfil de pH modificado también se puede determinar comparando la actividad de fosfatasa a pH 3,5 y 5,5. Alternativamente, la actividad a pH 3,5 se puede comparar con la actividad a pH 4,0, 4,5 o 5,0.

- 40 En otra realización alternativa, se comparan las actividades de fitasa en vez de las actividades de fosfatasa.

[0096] En una realización particular, la fitasa de la invención tiene un perfil de pH modificado en comparación con una fitasa de referencia.

Más particularmente, el perfil de pH es modificado en el intervalo de pH 3,5-5,5.

- 45 Aún más particularmente, la actividad a pH 4,0, 4,5, 5,0 y/o 5,5 está a un nivel de al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o al menos un 95 % de la actividad a pH óptimo.

#### Actividad específica

- 50 [0097] En una realización particular, la fitasa de la invención tiene una actividad específica mejorada con respecto a una fitasa de referencia.

Más particularmente, la actividad específica de una fitasa de la invención es al menos un 105 % respecto a la actividad específica de una fitasa de referencia determinada por el mismo procedimiento.

- 55 En otras realizaciones particulares, la actividad específica relativa es al menos un 110, 115, 120, 125, 130, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 350 o incluso un 400 % respecto a la actividad específica de la fitasa de referencia según se determina mediante el mismo procedimiento.

- 60 [0098] En la alternativa, el término "alta actividad específica" se refiere a una actividad específica de al menos 200 FYT/mg de proteína enzimática (PE). En realizaciones particulares, la actividad específica es al menos 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 o 3000 FYT/mg de PE.

[0099] La actividad específica se mide en muestras altamente purificadas (un gel de poliacrilamida con SDS debería mostrar la presencia de un solo componente).

- 65 La concentración de proteína enzimática se puede determinar mediante el análisis de aminoácidos, y la actividad de fitasa en unidades de FYT, se determina como se describe en los ejemplos.

La actividad específica es una característica de la variante de fitasa específica en cuestión y se calcula como la actividad de fitasa medida en unidades FYT por mg de proteína enzimática de la variante de fitasa.

#### Rendimiento en piensos para animales

5 [0100] En una realización particular, la fitasa de la invención tiene un rendimiento mejorado en piensos para animales en comparación con una fitasa de referencia.

El rendimiento en piensos para animales se puede determinar mediante un modelo in vitro del ejemplo 5. Por consiguiente, en una realización preferida, la fitasa de la invención tiene un rendimiento mejorado en piensos para animales, donde el rendimiento se determina en un modelo in vitro, preparando muestras de pienso compuestas por un 30 % de harina de soja y un 70 % de harina de maíz con  $\text{CaCl}_2$  añadido hasta una concentración de 5 g de calcio por kg de pienso; precubándolas a 40°C y pH 3,0 durante 30 minutos añadiendo después pepsina (3000 U/g de pienso) y fitasa; incubando las muestras a 40°C y pH 3,0 durante 60 minutos y a continuación a pH 4,0 durante 30 minutos; parando las reacciones; extrayendo ácido fítico y fosfatos de inositol mediante la adición de HCl hasta una concentración final de 0,5M y la incubación a 40°C durante 2 horas, seguida de un ciclo de congelación-descongelación y una hora de incubación a 40°C; separando el ácido fítico y los fosfatos de inositol mediante cromatografía de iones de alto rendimiento; determinando la cantidad de fósforo del fitato (IP6-P) residual; calculando la diferencia de IP6-P residual entre la muestra en blanco de la fitasa tratada y la de una fitasa no tratada (esta diferencia es IP6-P degradado); y expresando el IP6-P degradado de la fitasa de la invención en relación con el IP6-P degradado de la fitasa de referencia (por ejemplo, las fitasas que tienen la SEC ID N° 3 y 4).

[0101] La fitasa de la invención y la fitasa de referencia están, por supuesto, dosificadas en la misma cantidad, preferiblemente basada en unidades de actividad de fitasa (FYT). Una dosis preferida es 125 FTU/kg de pienso.

Otra dosis preferida es 250 FTU/kg de pienso.

25 Las fitasas se pueden dosificar en forma de fitasas purificadas o en forma de sobrenadantes de fermentación.

Las fitasas purificadas preferiblemente tienen una pureza de al menos un 95 %, tal como se determina mediante SDS-PAGE.

30 [0102] En realizaciones preferidas, el valor de IP6-P degradado de la fitasa purificada de la invención, en relación con el valor de IP6-P degradado de la fitasa de referencia, es al menos un 101 % o al menos un 102 %, 103 %, 104 %, 105 %, 110 %, 115 % o al menos un 120 %.

En otras realizaciones preferidas, el valor de IP6-P degradado de la fitasa purificada de la invención, en relación con el valor de IP6-P degradado de la fitasa de referencia, es al menos un 125 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 % o al menos un 200 %.

35 Preferiblemente, el valor de IP6-P degradado de la fitasa de la invención, en relación con el valor de IP6-P degradado de la fitasa de la SEC ID N° 2, es al menos un 105 %, 110 %, 113 %, 115 %, 120 %, 125 % o al menos un 130 %.

40 [0103] El rendimiento relativo de una fitasa de la invención también se puede calcular como el porcentaje de fósforo liberado por la fitasa de referencia.

[0104] En otra realización particular, el rendimiento relativo de la fitasa de la invención se puede calcular como el porcentaje de fósforo liberado por la fitasa de la invención en relación con la cantidad de fósforo liberada por la fitasa de referencia.

45 [0105] En otras realizaciones particulares, el rendimiento relativo de la fitasa de la invención es al menos un 105 %, preferiblemente al menos un 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o al menos un 200 %.

#### Secuencias y constructos de ácidos nucleicos

50 [0106] La presente invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una variante de fitasa de la invención.

[0107] El término "secuencia de ácidos nucleicos aislada" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que está esencialmente libre de otras secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, al menos aproximadamente un 20 % pura, preferiblemente al menos aproximadamente un 40 % pura, más preferiblemente al menos aproximadamente un 60 % pura, aún más preferiblemente al menos aproximadamente un 80 % pura y de la forma más preferible al menos aproximadamente un 90% pura tal y como se determina mediante electroforesis de agarosa.

60 Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos aislada se puede obtener mediante procedimientos estándar de clonación usados en ingeniería genética para recolocar la secuencia de ácidos nucleicos desde su ubicación natural a un sitio diferente donde se reproducirá.

Los procedimientos de clonación pueden implicar la escisión y el aislamiento de un fragmento de ácido nucleico deseado que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido, la inserción del fragmento en una molécula vector y la incorporación del vector recombinante en una célula huésped donde se replicarán múltiples copias o clones de la secuencia de ácidos nucleicos.

La secuencia de ácidos nucleicos puede ser de origen genómico, de ADNc, de ARN, semisintético, sintético o

cualquier combinación de los mismos.

[0108] Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar introduciendo al menos una mutación en una plantilla de secuencia codificante de fitasa o una subsecuencia de la misma, donde la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica una variante de fitasa.

La introducción de una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos para intercambiar un nucleótido por otro nucleótido se puede realizar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida, mediante mutagénesis aleatoria o mediante mutagénesis aleatoria, dopada, enriquecida o localizada.

[0109] La mutagénesis aleatoria se realiza adecuadamente como mutagénesis aleatoria tanto localizada como específica de la región en al menos tres partes del gen que se traduce a la secuencia de aminoácidos mostrada en cuestión o en el gen entero.

Cuando la mutagénesis se realiza mediante el uso de un oligonucleótido, el oligonucleótido se puede dopar o enriquecer con los tres nucleótidos no progenitores durante la síntesis del oligonucleótido en las posiciones que se van a cambiar.

El dopaje o el enriquecimiento se pueden realizar de modo que se eviten los codones para aminoácidos no deseados.

El oligonucleótido dopado o enriquecido se puede incorporar al ADN que codifica la enzima fitasa mediante cualquier técnica, usando, por ejemplo, PCR, LCR o cualquier ADN polimerasa y ADN ligasa como se considere apropiado.

[0110] Preferiblemente, el dopaje se lleva a cabo usando un "dopaje aleatorio constante", en el que el porcentaje de tipo salvaje y mutación en cada posición está predefinido. Además, el dopaje se puede orientar hacia una preferencia por introducir ciertos nucleótidos y, de este modo, una preferencia por introducir uno o varios residuos específicos de aminoácidos.

El dopaje se puede hacer, por ejemplo, para permitir la introducción de un 90 % de tipo salvaje y un 10 % de mutaciones en cada posición.

Una consideración adicional en la elección de un esquema de dopaje se basa en restricciones genéticas, así como en restricciones estructurales proteínicas.

[0111] La mutagénesis aleatoria puede ser ventajosamente localizada a una parte de la fitasa progenitora en cuestión.

Esto puede, por ejemplo, ser beneficioso cuando se ha identificado que ciertas regiones de la enzima son de particular importancia para una propiedad dada de la enzima.

[0112] Los métodos alternativos para proporcionar variantes de la invención incluyen el barajado de genes, por ejemplo, como se describe en WO 95/22625 o en WO 96/00343, y el proceso de derivación de consenso como se describe en EP 897985.

Constructos de ácidos nucleicos

[0113] Un constructo de ácidos nucleicos comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención operativamente enlazada a uno o varias secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

Se entenderá que la expresión incluye cualquier paso involucrado en la producción del polipéptido incluyendo, pero sin limitarse a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0114] El término "constructo de ácidos nucleicos" tal como se utiliza en este documento se refiere a una molécula de ácido nucleico, tanto monocatenaria como bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de una manera que de otro modo no existirían en la naturaleza.

El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0115] El término "secuencias de control" se define en este documento para incluir todos componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención.

Cada secuencia de control puede ser nativa o extranjera a la secuencia de nucleótidos que codifican el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de transcripción.

Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional.

Se pueden proporcionar enlazadores a las secuencias de control con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la unión de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido.

[0116] El término "operativamente enlazado" denota en este documento una configuración en la que una secuencia de control se coloca apropiadamente en una posición relativa a la secuencia codificante de la secuencia de

polinucleótidos de manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

5 [0117] Cuando se usa en este documento, el término "secuencia codificante" (CDS) significa una secuencia de nucleótidos que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los límites de la secuencia codificante están generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que empieza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG. La secuencia codificante puede ser ADN, ADNc o una secuencia recombinante de nucleótidos.

10 Vector de expresión

[0118] El término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero sin limitarse a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

15 [0119] El término "vector de expresión" se define en este documento como una molécula lineal o circular de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención y que está operativamente enlazado a nucleótidos adicionales que se encargan de su expresión.

20 [0120] Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una variante de fitasa de la invención se puede expresar utilizando un vector de expresión que incluye típicamente secuencias de control que codifican un promotor, un operador, un sitio de unión al ribosoma, una señal de inicio de traducción y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores.

25 [0121] El vector de expresión recombinante que porta la secuencia de ADN que codifica una variante de fitasa de la invención puede ser cualquier vector que pueda ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá frecuentemente de la célula huésped en la que va a ser introducido.

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

30 [0122] La variante de fitasa también se puede coexpresar junto con al menos otra enzima de interés para piensos para animales, como fitasa, fosfatasa, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasa, proteasa, fosfolipasa, amilasa y/o beta-glucanasa.

Las enzimas pueden ser coexpresadas a partir de vectores distintos, a partir de un vector o utilizando una mezcla de ambas técnicas.

35 Cuando se usan vectores diferentes, los vectores pueden tener marcadores seleccionables diferentes y orígenes de replicación diferentes.

Cuando se usa un solo vector, los genes pueden ser expresados a partir de uno o varios promotores.

40 Si se clonan bajo la regulación de un promotor (di- o multicistrónico), el orden en el que los genes son clonados puede afectar a los niveles de expresión de las proteínas.

La variante de fitasa también se puede expresar como una proteína de fusión, es decir, que el gen que codifica la variante de fitasa se ha fusionado dentro del marco al gen que codifica otra proteína.

Esta proteína puede ser otra enzima o un dominio funcional de otra enzima.

45 Células huésped

[0123] El término "célula huésped", tal como se utiliza en este documento, incluye cualquier tipo de célula susceptible a transformación, transfección, transducción y similares con un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido de la presente invención.

50 [0124] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención, que son ventajosamente usadas en la producción recombinante de los polipéptidos.

55 Un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el vector se mantiene como integrante cromosómico o como vector extracromosómico autorreplicante según se ha descrito anteriormente.

El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante replicación.

La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

60 [0125] La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procarionta; o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota.

65 [0126] Los microorganismos unicelulares útiles son células bacterianas tales como bacterias gram positivas incluyendo, pero sin limitarse a, una célula de Bacillus, por ejemplo, Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus clausii, Bacillus coagulans, Bacillus lautus, Bacillus lentus, Bacillus

licheniformis, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*; o una célula de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* y *Streptomyces murinus*; o bacterias gram negativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas sp.* en un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus*, *lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*.

5 En otro aspecto preferido, la célula de *Bacillus* es un bacillus alcalófilico.

[0127] La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana puede, por ejemplo, estar afectada por la transformación de protoplastos (ver, por ejemplo, Chang and Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), usando células competentes (ver, por ejemplo, Young and Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829, o Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa and Dower, 1988 *Biotechniques* 6: 742-751) o conjugación (ver, por ejemplo, Koehler and Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

10

[0128] La célula huésped también puede ser un eucariota, como una célula de mamífero, insecto, planta o fúngica.

15 [0129] En un aspecto preferido, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongos" tal como se utiliza en este documento incluye los fila Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y zygomycota (según la definición de Hawkswort et al., In, Ainswort and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) así como los Oomycota (según se cita en Hawkswort et al., 1995, supra, página 171) y todos hongos mitospóricos (Hawkswort et al., 1995, supra).

20

[0130] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura" tal como se utiliza en este caso incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporogénea y levadura de los Fungi Imperfecti (Blastomicetos). Ya que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe ser definida como se describe en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series n°. 9, 1980).

25

[0131] En un aspecto aún más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

30 [0132] En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*.

35 En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*.  
En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

[0133] En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula fúngica filamentosa. "Fúngica filamentosa" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (según la definición de Hawkswort et al., 1995, supra).

40 Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos.  
El crecimiento vegetativo es mediante alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico.  
En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es mediante injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

45 [0134] En un aspecto aún más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromices*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyptocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

50

[0135] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.

55 En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*.

60 En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de cepas de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa* o *Ceriporiopsis subvermispora*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

65

[0136] Las células fúngicas se pueden transformar mediante un proceso que implica formación de protoplastos, transformación de los protoplastos y regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en EP 238 023 y Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474. Métodos Adecuados para transformar especies de *Fusarium* son descritos por Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156 y WO 96/00787. La levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, In Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, volumen 194, págs 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

#### Métodos de producción

[0137] La presente invención también se refiere a métodos para producir una fitasa de la presente invención que comprenden (a) cultivar una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción de la fitasa; y (b) recuperar la fitasa.

[0138] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar mediante cultivo en matraz de agitación y mediante fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentación continua, por lote, lote alimentado o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan al polipéptido ser expresado y/o aislado.

El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles en proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en los catálogos de la American Type Culture Collection).

Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, el polipéptido puede ser recuperado directamente del medio. Si el polipéptido no se segrega, puede ser recuperado de lisados celulares.

[0139] El polipéptido resultante se puede recuperar usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0140] Los polipéptidos de la presente invención pueden ser purificados mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, de cromatofoco y de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, Editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

#### Plantas transgénicas

[0141] La presente invención se refiere también a una planta transgénica, parte de planta o célula vegetal que ha sido transformada con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad de fitasa de la presente invención para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables.

El polipéptido se puede recuperar de la planta o de la parte de planta.

Alternativamente, la planta o parte de planta que contiene el polipéptido recombinante se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, mejorando el valor nutricional, la palatabilidad y las propiedades reológicas o para destruir un factor antinutricional.

[0142] En una realización particular, el polipéptido está dirigido a las vacuolas de almacenamiento del endospermo en semillas.

Esto se puede obtener sintetizándolo como un precursor con un péptido señal adecuado, ver Horvath et al. en PNAS, Feb. 15, 2000, vol. 97, nº 4, p. 1914-1919.

[0143] La planta transgénica puede ser dicotiledónea o monocotiledónea o variantes diseñadas de las mismas.

Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas tales como poa de los prados (poa pratense, poa), hierbas forrajeras tales como festuca, lolium, hierbas templadas tales como agrostis, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, triticale (híbrido estabilizado de trigo (triticum) y centeno (secale)) y maíz. Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, leguminosas, tales como girasol (helianthus), algodón (gossypium), lupinos, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y semilla de soja, y plantas crucíferas (familia Brassicaceae), como coliflor, semilla de colza y el organismo modelo estrechamente relacionado de *Arabidopsis thaliana*.

Plantas bajas en fitato como las descritas, por ejemplo, en la patente de EEUU nº 5,689,054 y la patente de EEUU nº 6,111,168 son ejemplos de plantas diseñadas.



- [0144] Ejemplos de partes de planta son tallo, callo, hojas, raíz, frutos, semillas y tubérculos, así como los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo, epidermis, mesófilo, parénquima, tejidos vasculares y meristemas.  
Compartimentos celulares específicos de la planta, tales como cloroplastos, apoplastos, mitocondrias, vacuolas, peroxisomas y citoplasma se consideran también una parte de planta.  
Además, cualquier célula vegetal, cualquiera que sea el origen del tejido, se considera que es parte de la planta.  
Asimismo, partes de planta tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la invención se consideran también partes de planta, por ejemplo: embriones, endospermos, aleurona y tegumentos.
- [0145] También se incluyen dentro del campo de la presente invención los descendientes de tales plantas, partes de planta y células vegetales.
- [0146] La planta o la célula vegetal transgénicas que expresan un polipéptido de la presente invención se pueden construir conforme a métodos conocidos en la técnica. En definitiva, la planta o la célula vegetal se construyen incorporando uno o varios constructos de expresión que codifican un polipéptido de la presente invención en el genoma huésped de la planta y propagando la planta o la célula vegetal modificadas resultantes a una planta o una célula vegetal transgénica.
- [0147] Convenientemente, el constructo de expresión es un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de la presente invención operativamente enlazado a secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en la planta o parte de planta elegida.  
Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable, útil para identificar células huésped en las que el constructo de expresión ha sido integrado, y secuencias de ADN necesarias para introducir el constructo en la planta en cuestión (esto último depende del método usado para introducir el ADN).
- [0148] La elección de las secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y terminadoras y, opcionalmente, secuencias de señal o tránsito, se determina, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde y cómo se desea que el polipéptido se exprese.  
Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser constitutiva o inducible, o puede ser específica de desarrollo, fase o tejido, y el producto genético puede ser dirigido a un compartimento celular, tejido o parte de planta específicos tales como semillas u hojas.  
Las secuencias reguladoras son, por ejemplo, descritas por Tague et al., 1988, *Plant Physiology* 86: 506.
- [0149] Para la expresión constitutiva se pueden usar los promotores siguientes: el promotor 35S-CaMV, la ubiquitina 1 del maíz (Christensen AH, Sharrock RA and Quail 1992. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation) o el promotor de actina 1 del arroz (*Plant Mo. Biol.* 18, 675-689.; Zhang W, McElroy D. and Wu R 1991, Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants. *Plant Cell* 3, 1155-1165).
- Los promotores específicos de un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata y frutos (Edwards & Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos tales como meristemas (Ito et al., 1994, *Plant. Mol. Biol.* 24: 863-878), un promotor específico de semilla como el promotor de glutelina, prolamina, globulina o albúmina del arroz (Wu et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 885-889), un promotor de Vicia faba de la legúmina B4 y el gen desconocido de proteína de semilla de Vicia faba (Conrad et al., 1998, *Journal of Plant Physiology* 152: 708-711), un promotor de una proteína de cuerpo aceitoso de semillas (Chen et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 935-941), el promotor del napA de proteínas de almacenamiento de Brassica napus o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor del rbcS del arroz o el tomate (Kiozuka et al., 1993, *Plant Physiology* 102: 991-1000), el promotor del gen de adenina metiltransferasa del virus chlorella (Mitra and Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93) o el promotor del gen aldP del arroz (Kagaya et al., 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668-674), o un promotor inducible por herida tal como el promotor del pin2 de la patata (Xu et al., 1993, *Plant Molecular Biology* 22: 573-588).
- Asimismo, el promotor puede ser inducible mediante tratamientos abióticos tales como temperatura, sequía o alteraciones en la salinidad; o inducible mediante sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, por ejemplo: etanol, estrógenos, hormonas de planta tipo etileno, ácido abscísico, ácido giberélico y/o metales pesados.
- [0150] Un elemento intensificador del promotor se puede usar también para conseguir una expresión mayor del polipéptido en la planta.  
Por ejemplo, el elemento intensificador del promotor puede ser un intrón que se coloca entre el promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención.  
Por ejemplo, Xu et al., 1993, supra, describen el uso del primer intrón del gen de actina 1 del arroz para mejorar su expresión.
- [0151] Aún más, el uso de codón se puede optimizar para las especies de la planta en cuestión para mejorar su expresión (ver Horvath et al. referido anteriormente).

[0152] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes del constructo de expresión se pueden elegir a partir de aquellos disponibles en la técnica.

5 [0153] El constructo de ácidos nucleicos se incorpora al genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partículas, transformación biolística y electroporación (Gasser et al., 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/technology* 8: 535; Shimamoto et al., 1989, *Nature* 338: 274).

10 [0154] Actualmente, la transferencia genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método elegido para generar dicotiledóneas transgénicas (para una reseña, ver Hooykas and Schilperoort, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 15-38), y puede también usarse para transformar monocotiledóneas, aunque otros métodos de transformación se usan más frecuentemente para estas plantas.

15 Actualmente, el método elegido para generar monocotiledóneas transgénicas, que complementa el método de *Agrobacterium*, es el bombardeo con partículas (partículas microscópicas de oro o tungsteno recubiertas con el ADN transformador) de callos embrionarios o embriones en desarrollo (Christou, 1992, *Plant Journal* 2: 275-281; Shimamoto, 1994, *Current Opinion Biotechnology* 5: 158-162; Vasil et al., 1992, *Bio/Technology* 10: 667-674).

20 Un método alternativo para transformar monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplastos según la descripción de Omirulleh et al., 1993, *Plant Molecular Biology* 21: 415-428.

[0155] Después de la transformación, los transformantes que han incorporado en ellos el constructo de expresión se seleccionan y se regeneran en plantas completas según métodos bien conocido en la técnica. Frecuentemente el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes seleccionables, o bien durante la regeneración, o bien en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de ADN-T separados o escisión específica del sitio del gen seleccionable mediante una recombinasa específica.

[0156] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprende (a) cultivar una planta transgénica o una célula vegetal que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con actividad de fitasa de la presente invención, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

#### Composiciones y usos

35 [0157] Aún en otros aspectos, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención, así como métodos para usarlas.

[0158] Las composiciones de polipéptido se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de líquido o de composición seca.

Por ejemplo, la composición del polipéptido puede estar en forma de granulados o microgranulados.

40 El polipéptido que se va a incluir en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

[0159] La fitasa de la invención se puede usar para degradar, en cualquier contexto industrial, por ejemplo, fitato, ácido fítico, y/o los mono-, di-, tri-, tetra- y/o pentafofosfatos de mioinositol.

45 Es bien conocido que las fracciones de fosfato de estos compuestos quelan cationes bivalentes y trivalentes de compuestos tales como iones metálicos, entre otros los iones nutricionalmente esenciales de calcio, hierro, zinc y magnesio, así como los oligoelementos manganeso, cobre y molibdeno.

Además, el ácido fítico, hasta cierto punto, enlaza también proteínas mediante interacción electrostática.

50 [0160] Por consiguiente, los usos preferidos de los polipéptidos de la invención son como preparados de piensos para animales (incluyendo alimento humano) o como aditivos para este tipo de preparados.

[0161] En una realización particular, el polipéptido de la invención se puede usar para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales.

55 Ejemplos no limitantes de la mejora del valor nutricional de piensos para animales (incluyendo alimento humano), son: mejorar la digestibilidad del pienso; promover el crecimiento del animal; mejorar la utilización del pienso; mejorar la biodisponibilidad de proteínas; incrementar el nivel de fosfato digerible; mejorar la liberación y/o degradación de fitato; mejorar la biodisponibilidad de oligoelementos; mejorar la biodisponibilidad de macrominerales; eliminar la necesidad añadir fosfato, oligoelementos y/o macrominerales adicionales; y/o mejorar la calidad de la cáscara de huevo.

60 El valor nutricional del pienso, por lo tanto, se incrementa, y la tasa de crecimiento y/o aumento de peso y/o conversión de pienso (es decir, el peso del pienso ingerido con respecto al aumento de peso) del animal se puede mejorar.

65 [0162] Además, el polipéptido de la invención se puede usar para reducir el nivel de fitato en abonos.

Animales, pienso para animales y aditivos del pienso

[0163] El término animal incluye todos los animales, incluyendo seres humanos.

Ejemplos de animales son los no rumiantes y los rumiantes.

5 Los animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como ovejas, cabras y ganado, por ejemplo, vacas tales como el ganado bovino para carne y vacas lecheras.

En una realización particular, el animal es un animal no rumiante.

10 Los animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, por ejemplo, cerdos (incluyendo, pero sin limitarse a, lechones, cerdos en crecimiento y cerdas); aves tales como pavos, patos y pollos (incluyendo, pero sin limitarse a, pollos para asar y gallinas ponedoras); pescado (incluyendo, pero sin limitarse a, trucha, tilapia, siluro y carpa); y crustáceos (incluyendo, pero sin limitarse a, gambas y cigalas).

[0164] El término pienso o composición de pienso significa cualquier compuesto, preparado, mezcla o composición adecuado para, o destinado a, ser consumido por un animal.

15 [0165] En el uso según la invención se puede alimentar al animal con el polipéptido antes, después o simultáneamente a la dieta.  
Esto último es lo que se prefiere.

20 [0166] En una realización particular, el polipéptido, en la forma en la que se añade al pienso, o cuando se incluye en un aditivo de pienso, es sustancialmente puro.

En una realización particular está bien definido.

El término "bien definido" significa que el preparado de fitasa es al menos un 50 % puro tal como se determina mediante cromatografía de exclusión de tamaño (véase ejemplo 12 de WO 01/58275).

25 En otras realizaciones particulares el preparado de fitasa es al menos un 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94 o al menos un 95 % puro como se determina mediante este método.

[0167] Un preparado polipeptídico sustancialmente puro y/o bien definido es ventajoso.

30 Por ejemplo, es mucho más fácil dosificar correctamente en el pienso un polipéptido que está esencialmente libre de interferir o contaminar a otros polipéptidos.

El término dosificar correctamente se refiere en particular al objetivo de obtener resultados consistentes y constantes, y la capacidad de optimizar la dosificación basándose en el efecto deseado.

35 [0168] Para el uso en piensos para animales, sin embargo, el polipéptido de fitasa de la invención no necesita ser tan puro; puede, por ejemplo, incluir otros polipéptidos, en cuyo caso podría denominarse preparado de fitasa.

[0169] El preparado de fitasa puede ser (a) añadido directamente al pienso (o usado directamente en un proceso de tratamiento de proteínas), o (b) se puede usar en la producción de una o varias composiciones intermedias tales como aditivos de piensos o premezclas que se añaden al pienso posteriormente (o se usan en un proceso de tratamiento).

40 El grado de pureza anteriormente descrito se refiere a la pureza del preparado polipeptídico original, si se usa según la (a) o la (b) anteriores.

45 [0170] Los preparados polipeptídicos con purezas de este orden de magnitud son particularmente obtenibles usando métodos recombinantes de producción, mientras que no son tan fáciles de obtener y también están sujetos a una variación entre lotes mucho más alta cuando el polipéptido se produce por métodos de fermentación tradicionales.

[0171] Tal preparado polipeptídico puede, por supuesto, mezclarse con otros polipéptidos.

50 [0172] El polipéptido se puede añadir al pienso en cualquier forma, ya sea como un polipéptido relativamente puro, ya sea mezclado con otros componentes destinados a ser añadidos a piensos para animales, es decir, en forma de aditivos de pienso, tales como las llamadas premezclas para piensos para animales.

55 [0173] En otro aspecto la presente invención se refiere a composiciones para usar en piensos para animales, tales como piensos para animales y aditivos de pienso, por ejemplo, premezclas.

[0174] Aparte del polipéptido de la invención, los aditivos de pienso de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble y/o al menos una vitamina hidrosoluble y/o al menos un oligoelemento.

60 El aditivo de pienso también puede contener al menos un macromineral.

[0175] Además, ingredientes opcionales de aditivos de piensos son agentes colorantes, por ejemplo, carotenoides tales como beta-caroteno, astaxantina y luteína; aromatizantes; estabilizadores; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados; especies reactivas generadoras de oxígeno ; y/o al menos otro polipéptido seleccionado de entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); fosfatasa (EC 3.1.3.1; EC 3.1.3.2; EC 3.1.3.39); xilanasas (EC 3.2.1.8); galactanasas (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasas (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4.-.-); fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa

tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3,2,1,1); y/o beta-glucanasa (EC 3,2,1,4 o EC 3,2,1,6).

[0176] En una realización particular estos otros polipéptidos están bien definidos (como se ha definido anteriormente para preparados de fitasa).

[0177] La fitasa de la invención también se puede combinar con otras fitasas, por ejemplo, fitasas de ascomiceto tales como fitasas de *Aspergillus*, por ejemplo, derivadas de *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*; o fitasas de basidiomiceto, por ejemplo, derivadas de *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Trametes pubescens* o *Paxillus involutus*; o derivadas, fragmentos o variantes de las mismas que tienen actividad de fitasa.

[0178] Así, en realizaciones preferidas del uso de la invención en piensos para animales, y en realizaciones preferidas del aditivo de pienso y del pienso para animales de la invención, la fitasa de la invención se combina con dichas fitasas.

[0179] Ejemplos de péptidos antimicrobianos (PAM) son CAP18, leucocina A, tritripticina, protegrina-1, Thanatina, defensina, lactoferrina, lactoferricina y ovispirina tal como novispirina (Robert Lehrer, 2000), plectasinas y estatinas, incluyendo los compuestos y polipéptidos descritos en WO 03/044049 y WO 03/048148, así como variantes o fragmentos de ellos que retienen actividad antimicrobiana.

[0180] Ejemplos de polipéptidos antifungicidas (PAF) son los péptidos de *Aspergillus giganteus* y de *Aspergillus niger*, así como variantes y fragmentos de los mismos que retienen actividad antifúngica, tal como se describe en WO 94/01459 y WO 02/090384.

[0181] Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos grasos poliinsaturados C18, C20 y C22 tales como el ácido araquidónico, el ácido docosahexaenoico, el ácido eicosapentanoico y el ácido gamma-linolénico.

[0182] Ejemplos de especies reactivas generadoras de oxígeno son productos químicos tales como perborato, persulfato o percarbonato; y polipéptidos tales como oxidasa, oxigenasa o sintetasa.

[0183] Normalmente, las vitaminas liposolubles e hidrosolubles, así como los oligoelementos, forman parte de lo que se llama una premezcla destinada a ser añadida al pienso, mientras que los macrominerales habitualmente se añaden al pienso por separado. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando se enriquece con un polipéptido de la invención, es un aditivo de pienso de la invención.

[0184] En una realización particular, el aditivo de pienso de la invención está destinado a ser incluido (o prescrito para tener que ser incluido) en dietas o piensos para animales o pienso a niveles de un 0,01 a un 10,0 %; más particularmente un 0,05 a un 5,0 %; o un 0,2 a un 1,0 % (% calculado como g aditivo por 100 g pienso). Esto es así en particular para las premezclas.

[0185] Las siguientes son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:

Ejemplos de vitaminas liposolubles son vitamina A, vitamina D3, vitamina E y vitamina K, por ejemplo, vitamina K3.

Ejemplos de vitaminas hidrosolubles son vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, por ejemplo, D-pantotenato de calcio.

Ejemplos de oligoelementos son manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, selenio y cobalto.

Ejemplos de macrominerales son calcio, fósforo y sodio.

[0186] Los requisitos nutricionales de estos componentes (ejemplificados con aves y lechones/cerdos) se enumeran en la tabla A de WO 01/58275.

"Requisito nutricional" significa que estos componentes deberían proporcionarse en la dieta en las concentraciones indicadas.

[0187] Alternativamente, el aditivo de pienso de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la tabla A de WO 01/58275.

"Al menos uno" significa cualquiera entre uno o más de uno, o dos, o tres, o cuatro, etc. hasta los trece o hasta los quince componentes individuales.

Más específicamente, este "al menos un" componente individual se incluye en el aditivo de la invención en una cantidad tal que proporcione una concentración en el pienso dentro del intervalo indicado en la columna cuatro, o columna cinco, o columna seis de la tabla A.

[0188] La presente invención también se refiere a composiciones de pienso para animales.

Las composiciones de pienso o dietas para animales tienen un contenido de proteínas relativamente alto.

Las dietas de las aves y los cerdos se pueden caracterizar como se indica en la tabla B de WO 01/58275, columnas 2-3.

Las dietas del pescado se pueden caracterizar como se indica en la columna 4 de esta tabla B. Además, tales dietas

del pescado tienen normalmente un contenido en grasa bruta de 200-310 g/kg.

[0189] WO 01/58275 corresponde a US 09/779334 que se incorpora por la presente mediante referencia.

5 [0190] Una composición de pienso para animales según la invención tiene un contenido de proteína bruta de 50-800 g/kg y comprende además al menos un polipéptido como se reivindica en este documento.

10 [0191] Además, o alternativamente (al contenido de proteína bruta indicado antes), la composición de pienso para animales de la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.

15 [0192] En realizaciones particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína bruta, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína y/o lisina está dentro de cualquiera de los intervalos 2, 3, 4 o 5 en la tabla B de WO 01/58275 (R. 2-5).

20 [0193] La proteína bruta se calcula como el nitrógeno (N) multiplicado por un factor 6,25, es decir, proteína bruta (g/kg) = N (g/kg) x 6,25.  
El contenido de nitrógeno se determina mediante el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14ª ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

25 [0194] La energía metabolizable se puede calcular basándose en la publicación del NRC Nutrient requirements in swine, novena edición revisada 1988, subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council. National Academy Press, Washington, D.C., págs. 2-6, y la European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, Países Bajos. Grafisch bedrijf Ponsen & Iooijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.

30 [0195] El contenido dietético de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en dietas completas para animales se calcula basándose en tablas de piensos tales como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voedervaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 PK IJlstad. ISBN 90-72839-13-7.

35 [0196] En una realización particular, la composición de pienso para animales de la invención contiene al menos una proteína.

La proteína puede ser una proteína animal, como harina de carne y hueso, y/o harina de pescado; o puede ser una proteína vegetal.

El término proteína vegetal tal como se utiliza en este documento se refiere cualquier compuesto, composición, preparado o mezcla que incluye al menos una proteína derivada de u originada a partir de un vegetal, incluyendo proteínas modificadas y derivados de proteínas.

40 En realizaciones particulares, el contenido proteico de las proteínas vegetales es al menos un 10, 20, 30, 40, 50 o 60 % (p/p).

45 [0197] Las proteínas vegetales se pueden derivar de fuentes de proteína vegetal, tales como leguminosas y cereales, por ejemplo, materiales de plantas de las familias Fabaceae (leguminosae), Cruciferaeae, Chenopodiaceae y Poaceae, tales como harina de soja, harina de lupino y harina de semilla de colza.

[0198] En una realización particular la fuente de proteína vegetal es material de una o varias plantas de la familia Fabaceae, por ejemplo, soja, lupinos, guisantes o judías.

50 [0199] En otra realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o varias plantas de la familia Chenopodiaceae, por ejemplo, remolacha, remolacha azucarera, espinacas o quinoa.

[0200] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son semilla de colza, semilla de girasol, semilla de algodón y repollo.

55 [0201] La semilla de soja es una fuente de proteína vegetal preferida.

[0202] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son cereales tales como cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, triticale y sorgo.

60 [0203] En otras realizaciones particulares, la composición de pienso para animales de la invención contiene un 0-80 % de maíz; y/o un 0-80 % de sorgo; y/o un 0-70 % de trigo; y/o un 0-70 % de cebada; y/o un 0-30 % de avena; y/o un 0-40 % de harina de soja; y/o un 0-25 % de harina de pescado; y/o un 0-25 % de harina de carne y hueso; y/o un 0-20 % de suero de leche.

65 [0204] Las dietas para animales pueden, por ejemplo, fabricarse como pienso triturado (no granulado) o pienso

granulado.

Típicamente, los piensos molidos se mezclan y se añaden cantidades suficientes de vitaminas y minerales esenciales según las especificaciones para las especies en cuestión.

Se pueden añadir polipéptidos como formulaciones polipeptídicas sólidas o líquidas.

- 5 Por ejemplo, una formulación polipeptídica sólida se añade típicamente antes o durante la etapa de mezclado; y una preparación polipeptídica líquida se añade típicamente después de la etapa de granulación. El polipéptido también se puede incorporar en un aditivo de pienso o premezcla.

- 10 [0205] La concentración final de polipéptido en la dieta está en el intervalo de 0,01-200 mg de proteína polipeptídica por kg dieta, por ejemplo, en el intervalo de 5-30 mg de proteína polipeptídica por kg de dieta animal.

[0206] La fitasa de la invención debería, por supuesto, aplicarse en una cantidad eficaz, es decir, en una cantidad adecuada para mejorar la solubilización y/o el valor nutricional del pienso.

- 15 Se contempla actualmente que el polipéptido se administre en una o varias de las siguientes cantidades (intervalos de dosificación): 0,01-200; 0,01-100; 0,5-100; 1-50; 5-100; 10-100; 0,05-50; o 0,10-10, con todos estos intervalos en mg de proteína polipeptídica fitasa por kg de pienso (ppm).

[0207] Para determinar los mg de proteína polipeptídica fitasa por kg de pienso, la fitasa se purifica a partir de la composición de pienso, y la actividad específica de la fitasa purificada se determina usando un ensayo pertinente.

- 20 La actividad de fitasa de la composición de pienso como tal también se determina usando el mismo ensayo, y, basándose en estos dos resultados, se calcula la dosificación en mg de proteína fitasa por kg de pienso.

[0208] Los mismos principios se aplican para determinar los mg proteína polipeptídica fitasa en aditivos de pienso.

- 25 Por supuesto, si está disponible una muestra de la fitasa usada para preparar el aditivo de pienso o el pienso, la actividad específica se determina a partir de esta muestra (no se necesita purificar la fitasa de la composición de pienso o el aditivo).

Métodos para producir productos de fermentación

- 30 [0209] Otro aspecto de la presente invención se refiere a los métodos para producir un producto de fermentación, como, por ejemplo, etanol, cerveza, vino, granos secos de destilería (DDG), en los que la fermentación se realiza en presencia de una fitasa producida por la presente invención.

Los ejemplos de procesos de fermentación incluyen, por ejemplo, los procesos descritos en WO 01/62947.

- 35 La fermentación se realiza utilizando un microorganismo fermentador, tal como levadura.

[0210] En una realización particular, la presente invención proporciona métodos para producir un producto de fermentación, que comprenden (a) fermentar (utilizando un microorganismo fermentador, tal como levadura) un material que contiene carbohidratos (por ejemplo, almidón) en presencia de una fitasa de la presente invención y (b) producir el producto de fermentación a partir del material fermentado que contiene carbohidratos.

- 40 [0211] En una realización particular, la presente invención proporciona métodos para producir etanol, que comprenden fermentar (utilizando un microorganismo fermentador tal como levadura) un material que contiene carbohidratos (por ejemplo, almidón) en presencia de una fitasa de la presente invención, y producir o recuperar etanol del material fermentado que contiene carbohidratos.

- 45 [0212] En otra realización, la presente invención proporciona métodos para producir etanol que comprenden a) hidrolizar almidón, por ejemplo, mediante un proceso de licuefacción y/o de sacarificación, un proceso de hidrólisis de almidón crudo, b) fermentar el almidón resultante en presencia de una fitasa de la presente invención, y c) producir etanol.

- 50 [0213] La fitasa se puede añadir al proceso de fermentación en cualquier fase adecuada y en cualquier composición adecuada, incluyendo sola o en combinación con otras enzimas, tales como una o varias alfa-amilasas, glucoamilasas, proteasas y/o celulasas.

- 55 [0214] En otra realización, la presente invención proporciona métodos para producir etanol que comprenden hidrolizar biomasa, y fermentar (utilizando un microorganismo fermentador, tal como levadura) la biomasa resultante en presencia de una fitasa de la presente invención.

### Ejemplos

- 60 [0215] Los productos químicos usados son productos comerciales de al menos calidad reactiva.

Ejemplo 1: preparación de variantes y determinación de la actividad

- 65 Preparación de variantes de fitasa

Expresión de variantes de fitasa en *Aspergillus oryzae*

[0216] Los constructos que comprenden los genes de la variante de fitasa de Buttiauxella se utilizan para construir vectores de expresión para *Aspergillus*.

5 Los vectores de expresión de *Aspergillus* pueden consistir en un casete de expresión basado en el promotor de amilasa neutra de *Aspergillus niger* II fusionado con la secuencia líder no traducida de la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* (Pna2/tpi) y el terminador de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (Tamg). El marcador selectivo pyrG de *Aspergillus nidulans*, que permite el crecimiento en medios mínimos para un *Aspergillus* que es pyrG<sup>-</sup>, puede también estar presente en el plásmido.

10 Los plásmidos de expresión para variantes de fitasa se transforman en *Aspergillus* según se describe en Lassen et al. (2001), Applied and Environmental Microbiology, 67,4701-4707.

Para cada uno de los constructos 4-6, las cepas deberían ser aisladas, purificadas y cultivadas en placas de microtitulación.

La expresión se determina usando un sustrato de p-nitrofenil fosfato.

15 La mejor cepa productora se puede fermentar en matraces de agitación.

## Purificación de variantes de fitasa de Buttiauxella

20 [0217] El sobrenadante de fermentación con la variante de fitasa se filtra a través de un filtro superior de botella rápido PES con un límite de 0,22 µm.

La solución resultante se diluyó con agua hasta el doble de volumen y se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético.

Ocasionalmente, la solución puede hacerse un poco turbia y esto se quita filtrándola a través de un filtro superior de botella rápido PES con un límite de 0,22 µm.

25 [0218] Después del pretratamiento la variante de fitasa se purifica mediante cromatografía en S-sefarosa, aproximadamente 30 ml en una columna XK26, que usa como tampón A acetato sódico 50 mM a pH 4,5, y como tampón B acetato sódico 50 mM + NaCl 1 M a pH 4,5.

Las fracciones de la columna se analizan en busca de actividad utilizando el ensayo de fosfatasa (ver más adelante) y las fracciones con actividad se agrupan.

30 [0219] En algunos casos la solución con la variante de fitasa purificada es concentrada utilizando un dispositivo de filtración Amicon ultra-15 con una membrana de límite 30 kDa.

## Determinación de la actividad de fosfatasa

35 [0220] 75 microlitros de solución enzimática con fitasa se depositan en un pocillo de una placa de microtitulación, por ejemplo, G. NUNC 269620, y se añade un sustrato de 75 microlitros (para preparar el sustrato se disuelven dos pastillas de 5 mg de p-nitrofenil fosfato (Sigma, N° de catálogo N-9389) en 10 ml de tampón de Na-acetato 0,1 M, pH 5,5).

40 La placa se sella e incuba durante 15 min., agitada a 750 r.p.m. a 37°C. Después del período de incubación se añaden 75 microlitros de reactivo de parada (el reactivo de parada es tetraborato de sodio 0,1 M en agua) y la absorbancia a 405 nm se mide en un espectrofotómetro para placas de microtitulación.

Una unidad de fosfatasa se define como la actividad enzimática que libera 1 micromol de fosfato/min bajo las condiciones de reacción dadas (tampón usado como blanco).

45 Se determina que la absorbancia de 1 micromol de p-nitrofenol es 56 UA (UA = unidades de absorbancia) bajo condiciones de ensayo.

## Determinación de la actividad de fitasa

50 [0221] 75 microlitros de solución enzimática con fitasa, apropiadamente diluidos en acetato sódico 0,25 M, 0,005 % (p/v) de Tween-20, pH5,5, se depositan en un pocillo de una placa de microtitulación, por ejemplo, G. NUNC 269620, y se añade un sustrato de 75 microlitros (preparado disolviendo 100 mg de fitato de sodio de arroz (N° de catálogo de Aldrich 274321) en 10 ml de tampón de acetato sódico 0,25 M, pH5,5).

55 La placa se sella e incuba durante 15min., agitada a 750 r.p.m. a 37°C. Después de la incubación se añaden 75 microlitros de reactivo de parada (el reactivo de parada se prepara mezclando 10 ml de solución de molibdato (10 % (p/v) de heptamolibdato de amonio en una solución de amoníaco al 0,25 % (p/v)), 10 ml vanadato de amonio (0,24 % del producto comercial de Bie&Berntsen, N° de catálogo LAB17650) y 20 ml de ácido nítrico del 21,7 % (p/v)), y la absorbancia a 405nm se mide en un espectrofotómetro para placas de microtitulación.

60 La actividad de fitasa se expresa en unidades de FYT, siendo un FYT la cantidad de enzima que libera 1 micromol ortofosfato inorgánico por minuto bajo las condiciones anteriores.

Un valor absoluto para la actividad de fitasa medida se puede obtener mediante referencia a una curva estándar obtenida a partir de diluciones apropiadas de fosfato inorgánico, o mediante referencia a una curva estándar hecha de diluciones de un preparado enzimático de fitasa con actividad conocida (dicho preparado enzimático estándar con actividad conocida está disponible, previa solicitud, en Novozymes A/S, Krogshoejvej 36; DK-2880 Bagsvaerd).

65 Ejemplo 2: actividad específica

[0222] La actividad específica de una variante de fitasa se determina en muestras altamente purificadas dializadas contra acetato sódico 250 mM a pH 5,5.

5 La pureza se comprueba de antemano en un gel de poliacrilamida SDS que muestra la presencia de un solo componente.

[0223] La concentración de proteínas se determina mediante el análisis de los aminoácidos de la siguiente manera: se hidroliza una parte alícuota de la muestra en HCl 6N y fenol al 0,1 % durante 16 h a 110°C en un tubo de vidrio evacuado.

10 Los aminoácidos resultantes son cuantificados utilizando un sistema de análisis de aminoácidos Applied Biosystems 420A operado según las instrucciones del fabricante.

De las cantidades de aminoácidos se puede calcular la masa total – y, por tanto, también la concentración - de proteínas en la parte alícuota hidrolizada.

15 [0224] La actividad de fitasa se determina en unidades de FYT tal como se describe en el ejemplo 1 ("Determinación de la actividad de fitasa"), y la actividad específica se calcula como la actividad de fitasa medida en unidades FYT por mg proteína enzimática de variante de fitasa.

20 Ejemplo 3: termoestabilidad mediante DSC

[0225] La termoestabilidad de la fitasa de Buttiauxella (número de acceso AEH25051 en GENESEQP) y de la variante E54C/A101 C/Q143C/I201C, ambas purificadas como se describe en el ejemplo 1, se determinaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) usando un instrumento VP-capillary DSC (MicroCal Inc., Piscataway, NJ, EE.UU.) equipado con un automuestreador.

25 La temperatura de desnaturalización térmica,  $T_d$  (°C), se tomó como la parte más alta del pico de desnaturalización (pico endotérmico mayor) en los termogramas ( $C_p$  vs. T) obtenidos después de calentar las soluciones de fitasa en acetato sódico 50 mM a pH 5,0 y 100 ppm de Tritón X a una tasa de calentamiento programada constante.

30 [0226] Las soluciones de muestra y de referencia (aprox. 0,5 ml) fueron preequilibradas térmicamente durante 10 minutos a 20 °C y la exploración de DSC se realizó entre 20 y 80 °C a una tasa de barrido de 200 K/hora.

El tratamiento de datos se realiza utilizando el software MicroCal Origin (versión 7.0383).

Las temperaturas de desnaturalización se determinaron con una precisión de aproximadamente +/- 0,5°C.

35 Tabla 2. Termoestabilidad comparativa de las fitasas de Buttiauxella

Fitasa	$T_d$ (°C)
AEH25051	56,5
E54C/A101 C/Q143C/I201 C=A/C	63,1

Los experimentos de DSC muestran que la variante E54C/A101C/Q143C/I201C tiene una termoestabilidad aumentada significativa en comparación con la fitasa de Buttiauxella de referencia (AEH25051).

40 Ejemplo 4: perfil de temperatura

[0227] El perfil de temperatura (la actividad de fitasa como función de la temperatura) se determinó para la fitasa de Buttiauxella (número de acceso AEH25051 en GENESEQP) y sus variantes en el intervalo de temperaturas de 20-80°C esencialmente como se ha descrito anteriormente ("Determinación de la actividad de fitasa").

45 Sin embargo, las reacciones enzimáticas (100 microlitros de solución enzimática con contenido de fitasa + 100 microlitros de sustrato) se realizaron en tubos PCR en vez de en placas de microtitulación.

Después de un periodo de reacción de 15 minutos a la temperatura deseada, los tubos fueron enfriados a 10°C durante 30 segundos y se transfirieron 150 microlitros de cada mezcla reactiva a una placa de microtitulación. Se añadieron 75 microlitros de reactivo de parada y la absorbancia a 405 nm se midió en un espectrofotómetro para placas de microtitulación.

50 Los resultados se resumen en la tabla 3. Los números dados para cada temperatura son la actividad relativa (en %) normalizada al valor a óptimo.

55 Tabla 3: perfiles relativos de temperatura

Variante de fitasa	Temperatura (°C)														
	20	30	40	50	55	60	63	65	67	70	75	80			
AEH25051	2	7	43	6	4	84	10	0	98	68	26	14	9	7	7
D33C/E54C/A101 C/W 179C=B/C	2	6	44	6	88	98	10	0	92	66	38	0	1	7	5
E54C/A101 C/Q143C/I201	2			6			10						1		



C=A/C	6	45	6	87	0	96	79	52	32	0	7	6
-------	---	----	---	----	---	----	----	----	----	---	---	---

Para ambas variantes los perfiles de temperatura se desplazan hacia mayores temperaturas en comparación con el perfil de temperatura de la fitasa de referencia de *Buttiauxella* (AEH25051).

5 Ejemplo 5: rendimiento en pienso para animales en un modelo in vitro

[0228] El rendimiento de diferentes variantes de fitasa de la invención en pienso para animales se compara en un modelo in vitro al rendimiento de una proteína de referencia tal como la SEC ID N° 2.

10 El modelo in vitro simula las condiciones gastro-intestinales en un animal monogástrico y se correlaciona bien con los resultados obtenidos en ensayos animales in vivo.

La versión usada en este ejemplo simula el buche y el estómago de un pollo para consumo.

La comparación se realiza de la siguiente manera:

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

[0229] Los gránulos de pienso de un ensayo de alimentación de un pollo para consumo - con maíz, harina de soja y aceite de soja como constituyentes principales - se preincuban a 40°C y pH 4,6 durante 5 minutos y después se añaden dosis adecuadas de las fitasas (se usan dosis idénticas para todas las fitasas que deben examinarse para permitir la comparación), por ejemplo, entre 125 a 1000 unidades de fitasa FYT/kg pienso, o del tampón en las muestras de control.

20 Después de 5 minutos de incubación, se añade pepsina (3000 U/g pienso) a una solución de HCl y de esta manera el pH se reduce a 3. Las muestras se incuban luego a 40°C durante otros 5 minutos.

[0230] Las reacciones se detienen y se extraen ácido fólico y fosfatos de inositol mediante adición de HCl hasta una concentración final 0,5 M e incubación a 40°C durante 2 horas, seguida de un ciclo de congelación-descongelación y una incubación de 1 hora a 40°C.

[0231] El ácido fólico y fosfatos de inositol se separan mediante cromatografía iónica de alto rendimiento tal como describen en Chen et al. en *Journal of Chromatography A* (2003) vol. 1018, págs. 41-52 y se cuantifica tal como describen Skoglund et al. en *J. Agric. Food Chem.* (1997), vol. 45, págs. 431-436.

[0232] Se calcula entonces la degradación de fitato como la diferencia de fósforo unido al inositol-6-fosfato (IP6-P) entre las muestras de fitasa tratada y no tratada.

35 El rendimiento relativo de la variante se calcula como el porcentaje de degradación de fitato por la fitasa de tipo salvaje.

Ejemplo 6: rendimiento en un ensayo en cerdos in vivo

[0233] Evaluación comparativa de los efectos de cantidades graduadas de la fitasa de tipo salvaje de *Buttiauxella* y una variante, en la digestibilidad fecal y la excreción de fósforo y calcio en cerdos en crecimiento.

[0234] Se usan sesenta y cuatro cerdos Large White x Landrace que tienen un peso corporal inicial de 43,55 ± 4,35 kg.

45 [0235] Los animales se alojan en corrales en una habitación de ambiente controlado. Cada corral tiene un suelo de alambre soldado recubierto de plástico y está equipado con dos tetinas para agua y cuatro comederos individualizados de acero inoxidable. La temperatura ambiente era 21-22° C y el porcentaje de humedad era del 50 %.

50 [0236] Los cerdos se alimentan de una dieta basal formulada para proporcionar fósforo (P) de origen exclusivamente vegetal durante un periodo adaptativo de 14 días. Después de ese periodo se reparte en 16 grupos iguales de 4 animales cada uno.

[0237] Son alimentados durante 12 días con la dieta basal o con dicha dieta suplementada con 1000 o 2000 U/kg de la fitasa de tipo salvaje de *Buttiauxella* o con 500, 1000 o 2000 U/kg de la variante designada 100 que tiene 2 enlaces disulfuro adicionales.

60 [0238] Un trazador indigerible (óxido de cromo) se añade en una concentración del 0,4 % a todas las dietas permitiendo el cálculo de la digestibilidad de P y calcio (Ca). El pienso se distribuye *ad libitum* en forma de triturado, bajo control de consumo de pienso de corral, y los animales tienen acceso libre a agua potable. La digestibilidad de Ca no se corrige para la ingesta de Ca con agua potable.

[0239] Las concentraciones fecales de P, Ca y Cr se miden en el 12° día del segundo periodo. Las heces se muestrearon individualmente, en aproximadamente la misma cantidad a la misma hora del día, durante los 3 últimos días que preceden a esa fecha.

## ES 2 594 359 T3

Así, para cada tratamiento dietético y para cada criterio se realizaron un total de 12 determinaciones individuales. Todos los minerales se determinan según métodos estándar de la Association of Official Analytical Chemists (1990) utilizando un espectrómetro Vista-MPX ICP-OES.

La digestibilidad aparente (% de la ingesta) de los minerales se calcula para el mencionado periodo de 3 días.

5

### LISTADO DE SECUENCIAS

[0240]

10 <110> Novozymes A/S

<120> Polipéptidos que tienen actividad de fitasa y ácidos nucleicos que codifican los mismos

15 <130> 11707-WO-PCT

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1

<211> 1341

<212> ADN

<213> Buttiauxella gaviniae DSM18930

25 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1338)

30 <220>

<221> sig peptide

<222> (1)..(99)

<220>

<221> mat peptide

35 <222> (100)..(1338)

<400> 1

ES 2 594 359 T3

atg acg atc tct gcg ttt aac cac aaa aaa ctg acg ctt cac cct ggt	48
Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn His Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly	
-30 -25 -20	
ctg ttc gta gca ctg agc gcc ata ttt tca tta ggc tct acg gca tat	96
Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr	
-15 -10 -5	
gcc aat gac act ccc gct tca ggc tac cag gtt gaa aaa gtg gtt atc	144
Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile	
-1 1 5 10 15	
ctc agc cgc cac ggt gtg cga gcc ccc acc aaa atg aca cag act atg	192
Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met	
20 25 30	
cgc gac gta aca ccc aat acc tgg cca gaa tgg cca gta aaa ctg ggt	240
Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly	
35 40 45	
tat atc acg cca cgc ggt gag cat ctg att agc ctg atg ggc ggg ttt	288
Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe	
50 55 60	
tat cgc gag aag ttt caa caa cag ggc att tta tcg cag ggc agt tgc	336
Tyr Arg Glu Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys	
65 70 75	
ccc aca cca aac tca att tat gtc tgg gca gac gtt gat cag cgc acg	384
Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr	
80 85 90 95	
ctt aaa act ggc gaa gct ttc ctg gca ggg ctt gct ccg caa tgt ggt	432

ES 2 594 359 T3

Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly	
100	105
110	
tta act att cac cac caa cag aat ctt gaa aaa gcc gat ccg ctg ttc	480
Leu Thr Ile His His Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe	
115	120
125	
cat ccg gtg aaa gcg ggc acc tgt tca atg gat aaa act ccg ctc caa	528
His Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Arg Leu Gln	
130	135
140	
cag gcc gtt gaa aaa gaa gct caa acg ccc att gag aat ctg aac cag	576
Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Glu Asn Leu Asn Gln	
145	150
155	
cac tat att ccc tct ctg gct ttg atg aac acg acc ctc aac ttt tcg	624
His Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser	
160	165
170	175
acg tct gcc tgg tgt cag aaa cac agc gcg gat aaa agc tgt gat tta	672
Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu	
180	185
190	
gcg caa tcc atg ccg agc aag ctg tcg ata aaa gat aat ggc aac aaa	720
Ala Gln Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys	
195	200
205	
gtc gct ctc gat ggg gct gtt ggt ctt tca tcc act ctt gct gaa att	768
Val Ala Leu Asp Gly Ala Val Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile	
210	215
220	
ttc ctg ctg gaa tat gcg caa ggg atg ccg caa gcg gcc tgg ggg aag	816
Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Lys	
225	230
235	
att cat tca gag caa gat tgg gcg gag ttg ctg aaa ctg cat aac gcc	864
Ile His Ser Glu Gln Asp Trp Ala Glu Leu Leu Lys Leu His Asn Ala	
240	245
250	255
cag ttt gat ttg atg gcg cgc aca cct tat atc gcc aga cat aac gga	912
Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Asn Gly	
260	265
270	
acg cct tta ttg cag gcc atc agc aac gcg ctg gac cca aac gcc acc	960
Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asp Pro Asn Ala Thr	
275	280
285	
gca agc aag ctg cct gat atc tcg ccg gac aat aag atc ctg ttt att	1008
Ala Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile	
290	295
300	
gcc gga cac gat acc aat atc gcc aac atc tca ggc atg ctc aac atg	1056
Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ser Gly Met Leu Asn Met	
305	310
315	
cgc tgg acg cta ccc gga caa cca gat aac act cct cca ggc ggc gct	1104
Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala	
320	325
330	335
ttg atc ttt gaa cgc ctg gct gat aaa gct ggg aaa caa tat gtt agt	1152
Leu Ile Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ala Gly Lys Gln Tyr Val Ser	
340	345
350	
gtg agt atg gtg tat cag aca ctc gag cag ttg cgc gct caa aca ccg	1200
Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ala Gln Thr Pro	

ES 2 594 359 T3

```

          355                360                365
ctt agc ctt aag gaa ccc gca gga agt gtg cag cta aaa att cct ggc      1248
Leu Ser Leu Lys Glu Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
          370                375                380

tgt aat gac cag acg gct gaa gga tat tgc ccg ctg cca aca ttt aaa      1296
Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Pro Thr Phe Lys
          385                390                395

cgc gtg gtt agc caa agt gaa gaa ccg ggc tgc cag cta cag taa      1341
Arg Val Val Ser Gln Ser Glu Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
          400                405                410

```

<210> 2

<211> 446

<212> PRT

5 <213> *Buttiauxella gaviniae* DSM18930

<400> 2

```

Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn His Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
          -30                -25                -20

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

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

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

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

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

Tyr Arg Glu Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
          65                70                75

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

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

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

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

```

ES 2 594 359 T3

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

His Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser  
160 165 170 175

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

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

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

Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Lys  
225 230 235

Ile His Ser Glu Gln Asp Trp Ala Glu Leu Leu Lys Leu His Asn Ala  
240 245 250 255

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

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

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

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

Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala  
320 325 330 335

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

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

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

Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Pro Thr Phe Lys  
385 390 395

ES 2 594 359 T3

Arg Val Val Ser Gln Ser Glu Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln  
400 405 410

- 5 <210> 3  
<211> 1271  
<212> ADN  
<213> Buttiauxella agrestis DSM18931
- 10 <220>  
<221> CDS  
<222> (3)..(1268)
- 15 <220>  
<221> sig peptide  
<222> (3) .. (29)
- 20 <220>  
<221> mat peptide  
<222> (30)..(1268)
- <400> 3

ES 2 594 359 T3

ca ttt tca tta ggt tta acg gca tat gcc agc gac act ccc gct tca	47
Phe Ser Leu Gly Leu Thr Ala Tyr Ala Ser Asp Thr Pro Ala Ser	
-5  -1 1  5	
ggc tac cag att gaa aaa gtg gta ata ctc agc cgc cac ggt gtg cga	95
Gly Tyr Gln Ile Glu Lys Val Val Ile Leu Ser Arg His Gly Val Arg	
10  15  20	
gca ccc acc aaa atg aca cag acc atg cgc gac gta aca ccc aat tcc	143
Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met Arg Asp Val Thr Pro Asn Ser	
25  30  35	
tgg ccc gaa tgg ccg gta aaa ttg ggt tat atc acg cca cgc ggt gag	191
Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu	
40  45  50	
cat ctg att agc ctg atg ggc ggg ttt tat cgc cag aag ttt caa caa	239
His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln	
55  60  65  70	
aag ggc att tta tcg cag ggc agt tgc ccc aca cca aac tca att tat	287
Lys Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr	
75  80  85	
gtc tgg gca gac gtt gat cag cgc acg ctt aaa acg ggc gaa gct ttc	335
Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe	
90  95  100	
ctg gca ggg ctt gct ccg caa tgt ggt tta act att cac cac cag cag	383
Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly Leu Thr Ile His His Gln Gln	
105  110  115	
aat ctt gaa aaa gcc gat ccg ctg ttc cat ccg gtg aaa gcg ggc acc	431
Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe His Pro Val Lys Ala Gly Thr	
120  125  130	
tgt tca atg gat aaa act caa gtc cag cag gcc gtt gaa aaa gaa gct	479
Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala	
135  140  145  150	
caa atg ccc att gag aat ctg aac cag cac tat att ccc tct ctg gcc	527
Gln Met Pro Ile Glu Asn Leu Asn Gln His Tyr Ile Pro Ser Leu Ala	



ES 2 594 359 T3

					155					160					165					
ttg	atg	aac	acg	act	ctc	aac	ttt	tcg	acg	tct	gcc	tgg	tgc	cag	aaa					575
Leu	Met	Asn	Thr	Thr	Leu	Asn	Phe	Ser	Thr	Ser	Ala	Trp	Cys	Gln	Lys					
			170					175					180							
cac	agc	gcg	gat	aaa	agc	tgt	gat	tta	gcg	caa	tcc	atg	ccg	agc	aag					623
His	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Cys	Asp	Leu	Ala	Gln	Ser	Met	Pro	Ser	Lys					
		185					190					195								
ctg	tcg	ata	aaa	gat	aat	ggc	aac	aaa	gtc	gct	ctt	gat	ggg	gcc	att					671
Leu	Ser	Ile	Lys	Asp	Asn	Gly	Asn	Lys	Val	Ala	Leu	Asp	Gly	Ala	Ile					
		200				205					210									
ggc	ctt	tcg	tct	acg	ctt	gct	gaa	att	ttc	ctg	ctg	gaa	tat	gcg	caa					719
Gly	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Ala	Glu	Ile	Phe	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala	Gln					
215					220					225					230					
ggg	atg	ccg	caa	gcg	gcg	tgg	ggg	aat	att	cat	tca	gag	caa	gag	tgg					767
Gly	Met	Pro	Gln	Ala	Ala	Trp	Gly	Asn	Ile	His	Ser	Glu	Gln	Glu	Trp					
			235					240						245						
gcg	tcg	cta	ttg	aaa	ctg	cat	aac	acc	cag	ttt	gat	ttg	atg	gcg	cgc					815
Ala	Ser	Leu	Leu	Lys	Leu	His	Asn	Thr	Gln	Phe	Asp	Leu	Met	Ala	Arg					
		250						255					260							
aca	cct	tac	atc	gcc	gca	cat	aac	gga	acg	ccg	tta	ttg	cag	acc	atc					863
Thr	Pro	Tyr	Ile	Ala	Ala	His	Asn	Gly	Thr	Pro	Leu	Leu	Gln	Thr	Ile					
		265					270					275								
agc	aac	gcg	ctg	gag	ccg	aaa	gcc	gac	gta	agc	aaa	ctg	cct	gat	atc					911
Ser	Asn	Ala	Leu	Glu	Pro	Lys	Ala	Asp	Val	Ser	Lys	Leu	Pro	Asp	Ile					
	280					285					290									
tca	tct	gac	aat	aag	atc	ctg	ttt	att	gcc	gga	cac	gat	acc	aat	att					959
Ser	Ser	Asp	Asn	Lys	Ile	Leu	Phe	Ile	Ala	Gly	His	Asp	Thr	Asn	Ile					
295				300						305				310						
gcc	aat	atc	gca	ggc	atg	ctc	aac	atg	cgc	tgg	acg	cta	cca	ggg	caa					1007
Ala	Asn	Ile	Ala	Gly	Met	Leu	Asn	Met	Arg	Trp	Thr	Leu	Pro	Gly	Gln					
			315						320					325						
ccc	gat	aac	acc	cca	ccg	ggc	ggc	gct	tta	gtc	ttt	gag	cgf	ttg	gcc					1055
Pro	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Ala	Leu	Val	Phe	Glu	Arg	Leu	Ala					
		330						335					340							
gat	aag	tca	ggg	aaa	caa	tat	att	agc	gtg	agc	atg	gtg	tat	cag	act					1103
Asp	Lys	Ser	Gly	Lys	Gln	Tyr	Ile	Ser	Val	Ser	Met	Val	Tyr	Gln	Thr					
		345					350						355							
ctt	gag	cag	ttg	cgc	gct	caa	aca	cca	ctt	agc	ctt	aat	gaa	cca	gcg					1151
Leu	Glu	Gln	Leu	Arg	Ala	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Asn	Glu	Pro	Ala					
	360					365					370									
ggt	agc	gta	cag	cta	aaa	att	cct	ggc	tgt	aac	gac	cag	acg	gct	gaa					1199
Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Lys	Ile	Pro	Gly	Cys	Asn	Asp	Gln	Thr	Ala	Glu					
375					380					385				390						
gga	tac	tgc	cca	ctg	tcg	acg	ttc	aca	cgc	gtg	ggt	agc	caa	agc	gtg					1247
Gly	Tyr	Cys	Pro	Leu	Ser	Thr	Phe	Thr	Arg	Val	Val	Ser	Gln	Ser	Val					
			395						400					405						
gaa	cca	ggc	tgc	cag	cta	ccg	taa													1271
Glu	Pro	Gly	Cys	Gln	Leu	Pro														
		410																		

ES 2 594 359 T3

<210> 4  
 <211> 422  
 <212> PRT  
 <213> *Buttiauxella agrestis* DSM18931

5

<400> 4

Phe Ser Leu Gly Leu Thr Ala Tyr Ala Ser Asp Thr Pro Ala Ser Gly  
 -5 -1 1 5

Tyr Gln Ile Glu Lys Val Val Ile Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala  
 10 15 20

Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met Arg Asp Val Thr Pro Asn Ser Trp  
 25 30 35

Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His  
 40 45 50 55

Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Lys  
 60 65 70

Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val  
 75 80 85

Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu  
 90 95 100

Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly Leu Thr Ile His His Gln Gln Asn  
 105 110 115

Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe His Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys  
 120 125 130 135

Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln  
 140 145 150

Met Pro Ile Glu Asn Leu Asn Gln His Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu  
 155 160 165

Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His  
 170 175 180

Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu Ala Gln Ser Met Pro Ser Lys Leu  
 185 190 195

Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly  
 200 205 210 215

ES 2 594 359 T3

Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly  
220 225 230

Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala  
235 240 245

Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Thr Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr  
250 255 260

Pro Tyr Ile Ala Ala His Asn Gly Thr Pro Leu Leu Gln Thr Ile Ser  
265 270 275

Asn Ala Leu Glu Pro Lys Ala Asp Val Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser  
280 285 290 295

Ser Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala  
300 305 310

Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro  
315 320 325

Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp  
330 335 340

Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Ile Ser Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu  
345 350 355

Glu Gln Leu Arg Ala Gln Thr Pro Leu Ser Leu Asn Glu Pro Ala Gly  
360 365 370 375

Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly  
380 385 390

Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu  
395 400 405

Pro Gly Cys Gln Leu Pro  
410

<210> 5

<211> 1341

<212> ADN

5 <213> *Buttiauxella agrestis* DSM18932

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1338)

10

<220>

ES 2 594 359 T3

<221> sig peptide

<222> (1)..(99)

<220>

5 <221> mat peptide

<222> (100)..(1338)

<400> 5

atg acg ttc tct gcg ttt aac cgc aaa aaa ctg acg ctt cac cct ggt	48
Met Thr Phe Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly	
-30 -25 -20	
ctg ttc gta gca ctg agc gcc ata ttt tca tta ggc tct acg gcc tat	96
Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr	
-15 -10 -5	
gcc aac gac act ccc gct tca ggc tac cag gtt gaa aaa gtg gta atc	144
Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile	
-1 1 5 10 15	
ctc agc cgc cac ggg gtg cga gca ccc acc aaa atg aca cag acc atg	192
Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met	
20 25 30	
cgc gac gta aca ccc aat acc tgg ccc gaa tgg cca gta aaa ttg ggt	240
Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly	
35 40 45	
tat atc acg cca cgc ggt gag cat ctg att agc ctg atg ggc ggg ttt	288
Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe	
50 55 60	
tat cgc gag aag ttt caa caa cag ggc att tta tcg cag ggc agt tgc	336
Tyr Arg Glu Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys	
65 70 75	
ccc gca cca aac tca att tat gtc tgg gca gac gtt gat cag cgc acg	384
Pro Ala Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr	
80 85 90 95	
ctt aaa act ggc gaa gct ttc ctg gca ggg ctt gct ccg caa tgt ggt	432
Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly	
100 105 110	
tta act att cac cac cag cag aat ctt gaa aaa gcc gat ccg ctg ttc	480
Leu Thr Ile His His Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe	
115 120 125	
cat ccg gtg aaa gcg ggc acg tgt tca atg gat aaa act cag gtc caa	528
His Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln	
130 135 140	
cag gcc gtt gaa aaa gaa gct caa acc ccc att gat aat ctg aat cag	576
Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln	
145 150 155	
cac tat att ccc tct ctg gcc ttg atg aac acg acc ctc aac ttt tcg	624
His Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser	
160 165 170 175	
acg tct gcc tgg tgt cag aaa cac agc gcg gat aaa agc tgt gat tta	672
Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu	
180 185 190	
gcg caa tcc atg ccg agc aag ctg tcg ata aaa gat aat ggc aac aaa	720
Ala Gln Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys	
195 200 205	

ES 2 594 359 T3

gtc gct ctc gac ggg gcc att ggc ctt tcg tct acg ctt gct gaa att 768  
 Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile  
 210 215 220

ttc ctg ctg gaa tat gcg caa ggg atg ccg caa gcg gcg tgg ggg aat 816  
 Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn  
 225 230 235

att cat tca gag caa gag tgg gcg tcg cta ctg aaa ctg cat aac gcc 864  
 Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Ala  
 240 245 250 255

cag ttt gat ttg atg gcg cgc aca cct tac atc gcc aca cat aac ggc 912  
 Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Thr His Asn Gly  
 260 265 270

acg cct tta ttg cag acc atc agc aac gcg ctg gag ccg aaa gcc gac 960  
 Thr Pro Leu Leu Gln Thr Ile Ser Asn Ala Leu Glu Pro Lys Ala Asp  
 275 280 285

gta agc aaa ctg cct ggt atc tca cct gac aat aag atc ctg ttt ctt 1008  
 Val Ser Lys Leu Pro Gly Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Leu  
 290 295 300

gcc ggg cac gat acc aat att gcc aat atc gca ggc atg ctc aac atg 1056  
 Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met  
 305 310 315

cgc tgg acg cta cca ggg caa ccc gat aac acc cct ccg ggc ggc gct 1104  
 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala  
 320 325 330 335

tta gtc ttt gag cgt ttg gcc gat aag tca ggg aaa caa tat gtt agc 1152  
 Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser  
 340 345 350

gtg agc atg gtg tat cag act ctc gag cag ttg cga tcc caa aca cca 1200  
 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro  
 355 360 365

ctt agc ctt aat caa cct gcg gga agc gtt cag cta aaa att cct ggc 1248  
 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly  
 370 375 380

tgt aac gac cag acg gct gaa gga tac tgc cca ctg tcg aca ttc aca 1296  
 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr  
 385 390 395

cgc gtg gtt agc caa agc gtg gaa ccc ggc tgc cag cta cag taa 1341  
 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln  
 400 405 410

<210> 6

<211> 446

<212> PRT

5 <213> *Buttiauxella agrestis* DSM18932

<400> 6

Met Thr Phe Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly  
 -30 -25 -20

ES 2 594 359 T3

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

ES 2 594 359 T3

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

## REIVINDICACIONES

1. Método para producir una variante de fitasa que tiene una termoestabilidad mejorada y/o un perfil de temperatura mejorado en comparación con la fitasa progenitora, donde la fitasa progenitora tiene un porcentaje de identidad para cualquiera de las SEC ID N° 2, 4 y 6 por encima del 70 % y donde la variante de fitasa:
- 5 a) tiene al menos un 85 % de identidad con los aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 2, los aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 4 y/o los aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 6 cuando se alinean con la secuencia de aminoácidos respectiva utilizando el programa Needle con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización de apertura de gap de 10,0, y una penalización de extensión de gap de 0,5; y
- 10 b) comprende establecer al menos dos puentes disulfuro en comparación con la SEC ID N° 2, donde dichos puentes disulfuro no están entre los cuatro de origen natural en las posiciones 79/110,135/410,180/189 y 384/393, y donde los, al menos dos, puentes disulfuro establecidos en una o varias posiciones son seleccionados del grupo que consiste en los pares de posiciones: A) 143C/201 C, B) 33C/179C y C) 54C/101C.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, donde el número de puentes disulfuro establecidos es dos utilizando las combinaciones siguientes de pares de posiciones:  
A+B, A+C y B+C, donde A significa 143C/201C, B significa 33C/179C y C significa 54C/101C.
- 20 3. Método según la reivindicación 1, donde el número de puentes disulfuro establecidos es tres utilizando las siguientes combinaciones de pares de posiciones:  
A+B+C, A+B+D, A+B+E, A+B+F, A+B+G, A+C+D, A+C+E, A+C+F, A+C+G, B+C+D, B+C+E, B+C+F y B+C+G, donde A significa 143C/201C, B significa 33C/179C, C significa 54C/101C, D significa 93C/48C, E significa 33C/178C, F significa 61C/102C y G significa 164C/251C.
- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende además una modificación en al menos una posición seleccionada de las siguientes: 1, 9, 10, 18, 22, 25, 26, 37, 38, 66, 71, 81, 89, 92, 94, 109, 111, 119, 120, 121, 131, 134, 141, 142, 144, 152, 155, 160, 164, 171, 176, 178, 188, 190, 192, 193, 206, 207, 209, 211, 214, 215, 219, 222, 239, 235, 243, 245, 248, 253, 255, 256, 257, 260, 261, 268, 270, 277, 283, 285, 287, 288, 293, 296, 303, 306, 307, 308, 314, 318, 328, 337, 345, 350, 364, 371, 372, 396, 399, 406 y/o 413.
- 30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde las sustituciones para establecer los puentes disulfuro son:
- 35 A'. Q143C/I201C  
B'. D33C/W179C  
C'. E54C/A101C  
D'. Q93C/Y48C  
E'. D33C/A178C  
F'. G61C/F102C  
40 G'. F164C/K251C
6. Método según la reivindicación 5, que comprende una modificación adicional seleccionada de las siguientes:  
N1S, S1N, I9V, V9I, V10I, K26E, N37Y, T38S, S38T, E66Q, Q66E, K71Q, Q71K, T81A, A81T, A89T, D92E, E109Q, H111G, D119N, I120L, K121E, T134I, T134V, R141Q, Q141R, V142L, L142V, T144I, T152M, M152T, E155D, D155E, H160R, S164F, F164S, T171I, T176K, A178P, S188N, D190E, A192G, G192A, L193Q, K207E, K207T, A209S, D211C, I214V, V214I, A235V, K239N, N239K, E245D, D245E, E248S, E248L, S248L, S248E, A255T, T255A, V255A, V255T, Q256H, Q256Y, A261 E, R268A, R268T, A268R, A268T, T268A, T268R, N270K, A277T, T277A, D283N, D283E, E283N, E283D, N283D, N283E, N285K, K285N, D287T, T287D, A288E, A288V, V288E, V288A, E288A, E288V, D293G, P296S, S296P, I303L, I303F, L303F, F303L, L303I, S314A, A314S, N318D, I337V, V337I, S345A, A345S, V350I, I350V, A364S, A364S, S364A, K371N, N371K, E372Q, E372Q, Q372E, P396S, S396P, T399K, K399T, E406V, V406E, P413Q y/o Q413P y/o de las siguientes combinaciones D92E/H160R, A261E/N270K, T134I/K207T, D190E/K207E/N318D, T134I/K207T/A261 E/N270K, T134I/K207E/A209S/A261 E/N270K, A89T/T134I/F164S/T176K/A178P/K207E/A261 E/N270K, A89T/T134I/F164S/T176K/A178P/K207E/A209S/S248L/Q256Y/A261E/N270K, A89T/D92E/H160R/F164S/T176K/A178P/S188N/G192A/K207E/A261 E/N270K, D92E/T134I/H160R/F164S/T170I/T76K/A188P/K207E/A235V/Q256H/A261E/N270K, A89T/T134I/H160R/F164S/T170I/T76K/A188P/K207E/A235V/Q256H/A261E/N270K/I303F, N37Y/D92E/T134I/H160R/F164S/T171I/T76K/A188P/K207E/A235V/Q256H/A261 E/N270K. y/o
- 55 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la parte madura de la fitasa de la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 o la SEC ID N° 6, o una parte madura de cualquiera de las siguientes secuencias de GENESEQP: AEH25051(SEC ID N° 7), AEH25056(SEC ID N° 8), AEH25057(SEC ID N° 9), AEH25058(SEC ID N° 10), AEH25059(SEC ID N° 11), AEH25060(SEC ID N° 12), AEH25061(SEC ID N° 13), AEH25062(SEC ID N° 14), AEH25063(SEC ID N° 15), AEH25064(SEC ID N° 16), AEH25065(SEC ID N° 17), AEH25066(SEC ID N° 18), AEH25067(SEC ID N° 19), AEH25068(SEC ID N° 20), AEH25069(SEC ID N° 21), AEH25070(SEC ID N° 22), AEH25071(SEC ID N° 23), AEH25072(SEC ID N° 24), AEH25073(SEC ID N° 25), AEH25074(SEC
- 60 65



ID N° 26), AEH25075(SEC ID N° 27) o AEH25076(SEC ID N° 28) se usa como progenitora/esqueleto para producir una variante de fitasa.

- 5 8. Variante de fitasa producida por cualquiera de los métodos de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que tiene una termoestabilidad mejorada y/o un perfil de temperatura mejorado, donde la variante de fitasa
- 10 a) tiene al menos un 85 % de identidad con los aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 2, los aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 4 y/o los aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 6 cuando se alinean con la secuencia de aminoácidos respectiva utilizando el programa Needle con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización de abertura de gap de 10,0, y una penalización de extensión de gap de 0,5; y
- 15 b) comprende establecer al menos dos puentes disulfuro en comparación con la SEC ID N° 2, donde dichos puentes disulfuro no están entre los cuatro de origen natural en las posiciones 79/110,135/410,180/189 y 384/393, y donde los, al menos dos, puentes disulfuro establecidos en una o varias posiciones son seleccionados del grupo que consiste en los pares de posiciones: A) 143C/201 C, B) 33C/179C y C) 54C/101C.
- 20 9. Polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la variante de fitasa según la reivindicación 8.
- 25 10. Constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido según la reivindicación 9 operativamente enlazado a una o varias secuencias de control que dirige la producción del polipéptido en un huésped de expresión.
- 30 11. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 10.
- 35 12. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 10 y/o el vector de expresión según la reivindicación 11.
- 40 13. Método para producir la variante de fitasa según la reivindicación 8, que comprende (a) cultivar la célula huésped según la reivindicación 12 para producir un sobrenadante que comprende la fitasa; y (b) recuperar la fitasa.
- 45 14. Composición que comprende al menos una variante de fitasa según la reivindicación 8, y (a) al menos una vitamina liposoluble; (b) al menos una vitamina hidrosoluble; y/o (c) al menos un oligoelemento.
- 50 15. Composición según la reivindicación 14 que comprende además al menos una enzima seleccionada del grupo siguiente de enzimas: amilasa, fitasa, fosfatasa, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasa, fosfolipasa y/o beta-glucanasa.
16. Método para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, donde la variante de fitasa según la reivindicación 8 se añade al pienso.
17. Uso de la variante de fitasa según la reivindicación 8 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 14-15 en pienso para animales; en la preparación de pienso para animales; para mejorar el valor nutricional de pienso para animales; para reducir los niveles de fitato en abono animal; para el tratamiento de proteínas vegetales; o para liberar fósforo de un sustrato de fitasa.
18. Método para producir un producto de fermentación que comprende fermentar un material de carbohidratos en presencia de la variante de fitasa según la reivindicación 8.
19. Método para producir etanol que comprende fermentar un material de carbohidratos en presencia de la variante de fitasa según la reivindicación 8 y producir etanol.

**Fig. 1**

Numeración	1	10	20
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
5	AEH25057		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	AEH25059		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	AEH25058		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	AEH25067		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	AEH25071		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	AEH25072		
10	AEH25074		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	AEH25076		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	AEH25075		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	AEH25073		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	AEH25070		
15	AEH25069		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	AEH25066		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	AEH25060		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	AEH25068		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	AEH25063		
20	AEH25065		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	AEH25062		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	AEH25061		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	AEH25056		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTEM		
	AEH25051		
25	AEH25064		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	SEC4		
	-----FSLGLTAYASDTPASGYQTEKVVILSRHGVRAPTKM		
	SEC6		
	MTFSAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
	SEC2		
	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM		
30	.*****:*****.*		

**Fig. 1 - continuación**

Numeración	30	40	50	60	70				
80									
5	AEH25057	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	AEH25059	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	AEH25058	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	AEH25067	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	AEH25071	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
10	AEH25072	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	AEH25074	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	AEH25076	TQTMRDVT	PYTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	AEH25075	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	AEH25073	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
15	AEH25070	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	AEH25069	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	AEH25066	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	AEH25060	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	AEH25068	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
20	AEH25063	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	AEH25065	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	AEH25062	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	AEH25061	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	AEH25056	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
25	AEH25051	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	AEH25064	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
	SEC4	TQTMRDVT	PN <b>S</b> WPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYRQ	KFQQ <b>K</b> GIL	SQGSCPT	PNSIYV
	SEC6	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYR <b>E</b> KF	QQGIL	SQGSC <b>A</b> P	PNSIYV
	SEC2	TQTMRDVT	PNTWPEW	PVKLGYIT	PRGEHLIS	LMGGFYR <b>E</b> KF	QQGIL	SQGSCPT	PNSIYV
30		*****	:	*****	:	*****	:	*****	:

**Fig. 1 - continuación**

Numeración	90	100	110	120	130
140					
5	AEH25057	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGVCSMDKTQVQQAVE			
	AEH25059	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGICSMCDKTQVQQAVE			
	AEH25058	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE			
	AEH25067	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGICSMCDKTQVQQAVE			
	AEH25071	WTDVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGICSMCDKTQVQQAVE			
10	AEH25072	WTDVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGICSMCDKTQVQQAVE			
	AEH25074	WADVEQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGICSMCDKTQVQQAVE			
	AEH25076	WADVEQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGICSMCDKTQVQQAVE			
	AEH25075	WTDVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGICSMCDKTQVQQAVE			
	AEH25073	WTDVEQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE			
15	AEH25070	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGICSMCDKTQVQQAVE			
	AEH25069	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGICSMCDKTQVQQAVE			
	AEH25066	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE			
	AEH25060	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE			
	AEH25068	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE			
20	AEH25063	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE			
	AEH25065	WADVEQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE			
	AEH25062	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE			
	AEH25061	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE			
	AEH25056	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE			
25	AEH25051	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE			
	AEH25064	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQQDIKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE			
	SEC4	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAP <b>QCGLTIHHQQNLE</b> KADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE			
	SEC6	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAP <b>QCGLTIHHQQNLE</b> KADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE			
	SEC2	WADVDQRTLKTGEAFLAGLAP <b>QCGLTIHHQQNLE</b> KADPLFHPVKAGTCSMDKT <b>RL</b> QQAVE			
30		*: ** : ***** : * ***** : : ***** ***** : : *****			

**Fig. 1- continuación**

Numeración	150	160	170	180	190
	200				
5	AEH25057	KEAQTPI DNLNQH YI PFLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNK			
	AEH25059	KEAQTPI DNLNQH YI PFLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNK			
	AEH25058	KEAQTPI DNLNQH YI PFLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNT			
	AEH25067	KEAQTPI DNLNQH YI PFLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNT			
	AEH25071	KEAQTPI DNLNQH YI PSLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNE			
10	AEH25072	KEAQTPI DNLNQH YI PSLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNE			
	AEH25074	KEAQTPI DNLNQR YI PSLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNE			
	AEH25076	KEAQTPI DNLNQR YI PSLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNE			
	AEH25075	KEAQTPI DNLNQR YI PSLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNE			
	AEH25073	KEAQTPI DNLNQR YI PSLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNE			
15	AEH25070	KEAQTPI DNLNQH YI PFLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNE			
	AEH25069	KEAQTPI DNLNQH YI PFLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNT			
	AEH25066	KEAQTPI DNLNQH YI PFLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNK			
	AEH25060	KEAQTPI DNLNQH YI PFLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNE			
	AEH25068	KEAQTPI DNLNQH YI PFLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNE			
20	AEH25063	KEAQTPI DNLNQH YI PFLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNK			
	AEH25065	KEAQTPI DNLNQR YI PFLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNK			
	AEH25062	KEAQTPI DNLNQH YI PFLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNK			
	AEH25061	KEAQTPI DNLNQH YI PFLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNK			
	AEH25056	KEAQTPI DNLNQH YI PFLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNK			
25	AEH25051	KEAQTPI DNLNQH YI PFLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNK			
	AEH25064	KEAQTPI DNLNQH YI PSLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNK			
	SEC4	KEAQTPI DNLNQH YI PSLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNK			
	SEC6	KEAQTPI DNLNQH YI PSLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNK			
	SEC2	KEAQTPI DNLNQH YI PSLALMNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNK			
30		**** *:*:****:*:*** ***** *:*:*:*****.*:*:*****.*:*:*****			

**Fig. 1 - continuación**

Numeración	210	220	230	240	250
	260				
5	AEH25057	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVQF	DLMARTPYIA
	AEH25059	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVQF	DLMARTPYIA
	AEH25058	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVQF	DLMARTPYIA
	AEH25067	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVQF	DLMARTPYIA
	AEH25071	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVQF	DLMERTPYIA
10	AEH25072	VSLDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWALLKLHNVYF	DLMERTPYIA
	AEH25074	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQVAWGN	IHSECEWASLLKLHNVH	FDLMERTPYIA
	AEH25076	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQVAWGN	IHSECEWASLLKLHNVH	FDLMERTPYIA
	AEH25075	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQVAWGN	IHSECEWASLLKLHNVH	FDLMERTPYIA
	AEH25073	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVQF	DLMERTPYIA
15	AEH25070	VSLDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVQF	DLMERTPYIA
	AEH25069	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVQF	DLMERTPYIA
	AEH25066	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVQF	DLMERTPYIA
	AEH25060	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVQF	DLMARTPYIA
	AEH25068	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVQF	DLMARTPYIA
20	AEH25063	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVQF	DLMARTPYIA
	AEH25065	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVQF	DLMARTPYIA
	AEH25062	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVYF	DLMARTPYIA
	AEH25061	VALCGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVQF	DLMARTPYIA
	AEH25056	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVQF	DLMARTPYIA
25	AEH25051	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVQF	DLMARTPYIA
	AEH25064	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHNVQF	DLMARTPYIA
	SEC4	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHN <b>T</b> QF	DLMARTPYIA
	SEC6	VALDGAIGLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN	IHSECEWASLLKLHN <b>A</b> QF	DLMARTPYIA
	SEC2	VALDGA <b>V</b> GLSSTLAEIFLLE	YAQGMPQAAWGN <b>K</b> IHSEC <b>DWA</b> EL	LLKLHN <b>A</b> QF	DLMARTPYIA
30		*.* **.*	*****	***:*****:***	*****. *****

**Fig. 1- continuación**

Numeración	270	280	290	300	310
	320				
5	AEH25057	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	AEH25059	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	AEH25058	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	AEH25067	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	AEH25071	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
10	AEH25072	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	AEH25074	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	AEH25076	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	AEH25075	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	AEH25073	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
15	AEH25070	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	AEH25069	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	AEH25066	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	AEH25060	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	AEH25068	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
20	AEH25063	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	AEH25065	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	AEH25062	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	AEH25061	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	AEH25056	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
25	AEH25051	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	AEH25064	RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	SEC4	<b>A</b> HNGTPLLQ <b>T</b> ISNAL <b>EPKADV</b> SKLPDIS <b>S</b> DNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	SEC6	<b>T</b> HNGTPLLQ <b>T</b> ISNAL <b>EPKADV</b> SKLP <b>G</b> ISPDNKILF <b>L</b> AGHDTN IANIAGMLNMRWTLPGQP			
	SEC2	RHNGTPLLQAI SNAL <b>DP</b> NAT <b>A</b> SKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANI <b>S</b> GMLNMRWTLPGQP			
30		*:*****:*****:*:*	****.*.*.*****:*****:****:*****		

**Fig. 1- continuación**

Numeración	330	340	350	360	370
	380				
5	AEH25057	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	AEH25059	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	AEH25058	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	AEH25067	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	AEH25071	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
10	AEH25072	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	AEH25074	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	AEH25076	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	AEH25075	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	AEH25073	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
15	AEH25070	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	AEH25069	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	AEH25066	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	AEH25060	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	AEH25068	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
20	AEH25063	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	AEH25065	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	AEH25062	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	AEH25061	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	AEH25056	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
25	AEH25051	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	AEH25064	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	SEC4	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRAQTPLSLNEPAGSVQLKIPGCNDQ			
	SEC6	DNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
	SEC2	DNTPPGGALVFERLADKAGKQYVSVSMVYQTLEQLRAQTPLSLKEPAGSVQLKIPGCNDQ			
30	*****:*****:****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****				



**Fig. 1- continuación**

	Numeración	390	400	410
	AEH25057	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
5	AEH25059	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	AEH25058	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	AEH25067	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	AEH25071	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	AEH25072	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
10	AEH25074	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	AEH25076	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	AEH25075	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	AEH25073	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	AEH25070	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
15	AEH25069	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	AEH25066	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	AEH25060	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	AEH25068	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	AEH25063	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
20	AEH25065	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	AEH25062	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	AEH25061	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	AEH25056	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	AEH25051	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
25	AEH25064	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	SEC4	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQL <b>P</b>		
	SEC6	TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
	SEC2	TAEGYCPL <b>P</b> TF <b>K</b> RVVSQS <b>E</b> EPGCQLQ		
		***** . ** .***** *****		
30				

