

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 503**

51 Int. Cl.:

A23L 11/00 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
A23K 10/00 (2006.01)
A23K 20/26 (2006.01)
A23K 20/189 (2006.01)
A23K 50/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2002 E 10013017 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2335501**

54 Título: **Alimento para animales que contiene fitasa y método**

30 Prioridad:

31.10.2001 US 335303 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.01.2017

73 Titular/es:

**HUVEPHARMA EOOD (50.0%)
3A, Nikolay Haytov Street 5th Floor
1113 Sofia, BG y
CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**WEBEL, DOUGLAS M.;
ORR, DONALD E.;
RUCH, FRANK E. y
LEI, XINGEN**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 597 503 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

Alimento para animales que contiene fitasa y método

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método de mejora del valor nutricional de un producto alimenticio. Más particularmente, la invención se refiere a un método de mejora del valor nutricional de un producto alimenticio que comprende hexakisfosfato de mio-inositol alimentando el producto alimenticio a un animal en combinación con una fitasa expresada en levadura.

10 En particular, la invención se refiere a un método de reducción de la razón de pienso con respecto a aumento de peso de un animal de especie aviar alimentando al animal con un producto alimenticio, en el que el producto alimenticio comprende hexakisfosfato de mio-inositol.

Antecedentes y sumario de la invención

15 Las fitasas son hexakisfosfato de mio-inositol fosfohidrolasas que catalizan la eliminación gradual de ortofosfato inorgánico de fitato (hexakisfosfato de mio-inositol). El fitato es la forma de almacenamiento principal de fosfato en piensos vegetales, incluyendo cereales y legumbres. Debido a que animales monogástricos como cerdos, aves de corral y seres humanos tienen poca fitasa en sus tractos gastrointestinales, casi todo el fosfato de fitato ingerido no puede digerirse. Por consiguiente, estos animales requieren complementación de sus dietas con fitasa o fosfato inorgánico. En cambio, los rumiantes tienen microorganismos en el rumen que producen fitasas y estos animales no requieren complementación con fitasa de sus dietas.

20 El fosfato de fitato no utilizado en animales monogástricos crea problemas adicionales. El fosfato de fitato no utilizado se excreta en el estiércol y contamina el medio ambiente. Además, en animales monogástricos el fitato pasa en gran medida intacto a través del tracto gastrointestinal superior donde queda minerales esenciales (por ejemplo, calcio y zinc), se une a aminoácidos y proteínas, e inhibe actividades enzimáticas. Por consiguiente, la complementación con fitasa de las dietas de animales monogástricos no sólo disminuye los requisitos para la complementación con fosfato inorgánico, sino que también reduce la contaminación del medio ambiente provocada por el fitato, disminuye los efectos antinutricionales del fitato y aumenta el valor nutricional del pienso.

25 Hay dos tipos de fitasas, incluyendo una 3-fitasa (EC.3.1.3.8) que elimina grupos fosfatos en las posiciones 1 y 3 del anillo de mio-inositol, y una 6-fitasa (EC.3.1.3.6) que libera en primer lugar el fosfato en la posición 6 del anillo. Las plantas contienen habitualmente 6-fitasas y una amplia gama de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos filamentosos y levaduras, producen 3-fitasas. Dos fitasas, *phyA* y *phyB* de *Aspergillus niger*, se han clonado y secuenciado. *PhyA* se ha expresado en *Aspergillus niger* y la enzima recombinante está disponible comercialmente para su uso en la complementación de dietas animales.

30 Se han aislado genes de fitasa de *Aspergillus terreus*, *Myceliophthora thermophila*, *Aspergillus fumigatus*, *Emericella nidulans*, *Talaromyces thermophilus*, *Escherichia coli* (*appA*) y maíz. Adicionalmente, se han aislado y/o purificado enzimas fitasa de *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella terrigena* y *Aspergillus ficum*.

35 El documento WO 01/36607 da a conocer una ácido fosfatasa/fitasa mutante aislada con propiedades enzimáticas mejoradas, que es útil en composiciones de pienso para animales.

El documento WO99/49740 da a conocer pienso con bajo contenido en fitato para animales complementado con una fitasa. La fitasa ejemplificada es Natuphos.

40 El alto coste de la producción de fitasa ha restringido el uso de la fitasa en la industria del ganado ya que los complementos de fitasa son generalmente más caros que los complementos de fósforo inorgánico menos deseables desde el punto de vista del medio ambiente. El coste de la fitasa puede reducirse potenciando la eficacia de producción y/o produciendo una enzima con actividad superior.

45 Pueden usarse sistemas de expresión en levaduras para producir eficazmente enzimas, en parte, debido a que las levaduras crecen en medios sencillos y baratos. Adicionalmente, con una secuencia señal apropiada, la enzima expresada puede secretarse al medio de cultivo para su aislamiento y purificación convenientes. Algunos sistemas de expresión en levaduras también se aceptan en la industria alimentaria ya que son seguros para la producción de productos alimenticios a diferencia de los sistemas de expresión fúngicos que en algunos casos pueden no ser seguros, por ejemplo, para la fabricación de alimentos para seres humanos.

50 En una realización, se proporciona un método de reducción de la razón de pienso con respecto a aumento de peso de un animal de especie aviar alimentando al animal con un producto alimenticio en el que el producto alimenticio comprende hexakisfosfato de mio-inositol. El método comprende la etapa de alimentar al animal con el producto alimenticio en combinación con una fitasa expresada en levadura, en el que la fitasa se selecciona del grupo que consiste en AppA2 derivada de *Escherichia coli* y un mutante dirigido al sitio de AppA derivada de *Escherichia coli*, y en el que la razón de pienso con respecto a aumento de peso del animal se reduce.

El método puede comprender la etapa de alimentar al animal con el producto alimenticio en combinación con una fitasa expresada en levadura en el que la fitasa se selecciona del grupo que consiste en AppA2 derivada de *Escherichia coli* y un mutante dirigido al sitio de AppA derivada de *Escherichia coli*, y en el que la masa ósea y contenido en mineral del animal aumenta.

5 El método puede comprender las etapas de secar por pulverización una fitasa seleccionada del grupo que consiste en AppA2 derivada de *Escherichia coli* y un mutante dirigido al sitio de AppA derivada de *Escherichia coli*, mezclar la fitasa con un portador para la fitasa y, opcionalmente, otros componentes para producir una composición de aditivo para piensos para complementar un producto alimenticio con la fitasa, mezclar la composición de aditivo para piensos con el producto alimenticio y alimentar al animal con el producto alimenticio complementado con la composición de aditivo para piensos.

10 El método puede comprender la etapa de alimentar a la especie aviar con el producto alimenticio en combinación con menos de 1200 unidades de una fitasa expresada en levadura por kilogramo del producto alimenticio, en el que la biodisponibilidad de fosfato a partir de fitato aumenta en al menos 1,5 veces en comparación con la biodisponibilidad de fosfato a partir de fitato obtenida alimentando a una especie no aviar con el producto alimenticio en combinación con la fitasa expresada en levadura.

15 En particular, se proporciona un método de reducción de la razón de pienso con respecto a aumento de peso de una especie aviar alimentando a la especie aviar con un producto alimenticio en el que el producto alimenticio comprende hexakisfosfato de mio-inositol. El método comprende la etapa de alimentar a la especie aviar con el producto alimenticio en combinación con una fitasa expresada en levadura en el que la razón de pienso con respecto a aumento de peso del animal se reduce.

20 El método puede comprender la etapa de alimentar a la especie aviar con el producto alimenticio en combinación con una fitasa expresada en levadura en el que la masa ósea y el contenido en mineral de la especie aviar aumenta.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de AppA2.

25 La figura 2 muestra las secuencias de aminoácidos y nucleótidos del mutante U.

La figura 3 muestra el aumento en porcentaje del fosfato biodisponible *in vivo* en pollos alimentados con un pienso para animales complementado con Natuphos®, mutante U, AppA o AppA2.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona

30 1. Un método de reducción de la razón de pienso con respecto a aumento de peso de un animal monogástrico alimentando al animal con un producto alimenticio en el que el producto alimenticio comprende hexakisfosfato de mio-inositol, comprendiendo el método la etapa de

alimentar al animal con el producto alimenticio en combinación con una fitasa de *E. coli* expresada en levadura, en el que la razón de pienso con respecto a aumento de peso del animal se reduce,

35 en el que el animal es una especie aviar.

2. El método de la realización 1, en el que el animal se alimenta con el producto alimenticio en combinación con menos de 2000 unidades de la fitasa expresada en levadura por kilogramo del producto alimenticio.

40 3. El método de las realizaciones 1 a 2, en el que el animal se alimenta con el producto alimenticio en combinación con desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 2000 unidades de la fitasa expresada en levadura por kilogramo del producto alimenticio.

4. El método de las realizaciones 1 a 2, en el que el animal se alimenta con el producto alimenticio en combinación con menos de 1500 unidades de la fitasa expresada en levadura por kilogramo del producto alimenticio.

5. El método de las realizaciones 1 a 2, en el que el animal se alimenta con el producto alimenticio en combinación con menos de 1200 unidades de la fitasa expresada en levadura por kilogramo del producto alimenticio.

45 6. El método de las realizaciones 1 a 5, en el que la fitasa tiene una actividad óptima a un pH de menos de aproximadamente 4.

7. El método de las realizaciones 1 a 6, en el que la fitasa expresada en levadura se escinde con una proteasa para potenciar la capacidad de la fitasa para reducir la razón de pienso con respecto a aumento de peso del animal en comparación con la fitasa expresada en levadura intacta.

50 8. El método de las realizaciones 1 a 7, en el que la levadura se selecciona del grupo que consiste en especies de

Saccharomyces, especies de *Pichia*, especies de *Kluyveromyces*, especies de *Hansenula* y especies de *Candida*.

9. Uso de una composición que comprende hexakisfosfato de mio-inositol en combinación con una fitasa de *E. coli* expresada en levadura, para alimentar a una especie aviar para reducir la razón de pienso con respecto a aumento de peso.

5 10. El uso de la realización 9, en el que el animal se alimenta con el producto alimenticio en combinación con menos de 2000 unidades de la fitasa expresada en levadura por kilogramo del producto alimenticio.

11. El uso de las realizaciones 9 a 10, en el que el animal se alimenta con el producto alimenticio en combinación con desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 2000 unidades de la fitasa expresada en levadura por kilogramo del producto alimenticio.

10 12. El uso de las realizaciones 9 a 11, en el que la levadura se selecciona del grupo que consiste en especies de *Saccharomyces*, especies de *Pichia*, especies de *Kluyveromyces*, especies de *Hansenula* y especies de *Candida*.

La fitasa puede seleccionarse del grupo que consiste en AppA2 derivada de *Escherichia coli* y un mutante dirigido al sitio de AppA derivada de *Escherichia coli*. Para una especie aviar, la fitasa puede ser cualquier fitasa, incluyendo fitasas seleccionadas del grupo que consiste en AppA derivada de *Escherichia coli*, AppA2 derivada de *Escherichia coli* y un mutante dirigido al sitio de AppA derivada de *Escherichia coli*. En algunas realizaciones, la biodisponibilidad de fosfato a partir de fitato, la razón de pienso con respecto a aumento de peso y la masa ósea y el contenido en mineral mejoran en al menos 2 veces, por ejemplo, en una especie aviar, tal como aves de corral, en comparación con la mejora en el valor nutricional obtenido alimentando el producto alimenticio en combinación con el mismo porcentaje en peso de una fitasa expresada en una célula huésped distinta de levadura. Adicionalmente, la biodisponibilidad de fosfato a partir de fitato y la masa ósea y el contenido en mineral obtenidos alimentando a una especie aviar con el producto alimenticio en combinación con la fitasa expresada en levadura aumenta en al menos 1,5 veces en comparación con la biodisponibilidad de fosfato a partir de fitato y la masa ósea y el contenido en mineral obtenidos alimentando a una especie no aviar con el producto alimenticio en combinación con la fitasa expresada en levadura.

25 Tal como se usa en el presente documento “mejora del valor nutricional” o “valor nutricional aumentado” significa una mejora en el valor nutricional de un producto alimenticio tal como se refleja por un aumento en la biodisponibilidad de fosfato a partir de fitato, una reducción en la razón de pienso con respecto a aumento de peso, un aumento en la masa ósea y el contenido en mineral, un aumento en la biodisponibilidad de inositol a partir de fitato, un aumento en la biodisponibilidad a partir de fitato de minerales tales como magnesio, manganeso, calcio, hierro y zinc en un animal alimentado con el producto alimenticio.

30 Tal como se usa en el presente documento un aumento en la “biodisponibilidad de fosfato a partir de fitato” significa un aumento en la disponibilidad de fosfato a partir de fitato tal como se refleja por un aumento en el aumento de peso o un aumento en las cenizas óseas.

35 Tal como se usa en el presente documento el término “célula huésped distinta de levadura” incluye una célula fúngica.

Tal como se usa en el presente documento, el término “fitasa” significa una enzima que puede catalizar la eliminación de fosfato inorgánico de hexakisfosfato de mio-inositol.

Tal como se usa en el presente documento, el término “fitato” significa una composición que comprende hexakisfosfato de mio-inositol.

40 Según la invención, la razón de pienso con respecto a aumento de peso se calcula dividiendo el aumento de peso entre la ingesta de pienso. Un aumento en la masa ósea o el contenido en mineral se refleja por un aumento en el peso seco de los huesos de la tibia o el peroné o por un aumento en el peso de cenizas.

Puede expresarse una variedad de genes de fitasa para producir fitasa para su uso según la invención. Genes a modo de ejemplo que pueden usarse según la invención son genes de fitasa derivados de bacterias, tales como los genes *appA* (número de registro de Gene Bank M58708) y *appA2* (número de registro de Gene Bank 250016) derivados de *Escherichia coli* (*E. coli*) y el o cualquier mutante dirigido al sitio de estos genes que conserva o tiene actividad hexakisfosfato de mio-inositol fosfohidrolasa mejorada.

50 Pueden obtenerse genes de fitasa a partir de *E. coli* aislada que presenta una actividad fitasa particularmente alta. Tal como se describe más adelante, el gen *appA2* se clonó a partir de un aislado de *E. coli*, y es a modo de ejemplo de tal gen de fitasa.

El gen de fitasa expresado es un gen heterólogo. Un gen heterólogo se define en el presente documento como un gen que se origina a partir de una especie diferente de la especie usada para la expresión del gen. Por ejemplo, en el caso de la expresión de un gen de fitasa heterólogo, puede expresarse un gen de fitasa derivado de *E. coli* en una especie de levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*. Un gen homólogo se describe en el

presente documento como un gen que se origina a partir de la misma especie usada para la expresión del gen. En el caso de la expresión de un gen de fitasa homólogo, puede expresarse un gen de fitasa derivado de *Saccharomyces cerevisiae*, por ejemplo, en la misma especie de levadura.

5 Genes a modo de ejemplo para su uso en la producción de fitasa para su uso según la invención son *appA*, *appA2* y mutantes dirigidos al sitio de *appA* o *appA2*. Genes de fitasa sustituidos, delecionados y truncados, en los que la fitasa expresada resultante, o un fragmento de la misma, conserva sustancialmente la misma actividad fitasa que las fitasas ejemplificadas específicamente en el presente documento, se consideran equivalentes de los genes de fitasa ejemplificados y están dentro del alcance de la presente invención.

10 El gen *appA* se aisló a partir de *E. coli* (véase la patente estadounidense n.º 6.451.572). El gen *appA2* se aisló a partir de una colonia bacteriana que presentaba una actividad fitasa particularmente alta obtenida del contenido del colon de cerdos Hampshire-Yorkshire-Duroc cruzados (véase la solicitud de patente estadounidense n.º 09/540.149). El producto de proteína AppA2 presenta un óptimo de pH de entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 3,5. La secuencia de aminoácidos de AppA2 es tal como se muestra en SEQ ID No.: 2, 3 y 10. La figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de AppA2. La región no traducida se indica mediante letras minúsculas. Las secuencias subrayadas son los cebadores usados para amplificar *appA2* (Pfl: 1-22, y K2: 1468-1490), *appA2* (E2: 243-252, y K2: 1468-1490). Los posibles sitios de N-glicosilación están en recuadros. La secuencia de *appA2* se ha transmitido a la biblioteca de datos Genbank con el número de registro 250016. La secuencia de nucleótidos de AppA2 es tal como se muestra en SEQ ID No.: 1.

20 Se han aislado varios mutantes dirigidos al sitio de *appA* (véase la publicación PCT n.º WO 01/36607 A1 (solicitud de patente estadounidense n.º 60/166.179)). Estos mutantes se diseñaron para potenciar la glicosilación de la enzima AppA. Los mutantes incluyen A131N/V134N/D207N/S211N, C200N/D207N/S211N (mutante U) y A131N/V134N/C200N/D207N/S211N (véase Rodríguez *et al.*, Arch. of Biochem. And Biophys. 382: 105-112 (2000)). El mutante U tiene una actividad específica superior a la de AppA y, como AppA2, tiene un óptimo de pH de entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 3,5. La mutación C200N en el mutante U está en una región con huecos y C200 está implicada con C210 en la formación de un enlace disulfuro único en AppA. La figura 2 muestra las secuencias de aminoácidos y nucleótidos del mutante U. La secuencia de aminoácidos del mutante U se muestra en SEQ ID No.: 5, y la secuencia de nucleótidos del mutante U se muestra en SEQ ID No.: 4.

25 Puede usarse cualquier sistema de expresión en levaduras conocido por los expertos en la técnica según la presente invención. Por ejemplo, se describen diversos sistemas de expresión en levaduras en la solicitud de patente estadounidense n.º 09/104.769 (ahora patente estadounidense n.º 6.451.572), solicitud de patente estadounidense n.º 09/540.149 y en la solicitud de patente estadounidense n.º 60/166.179 (publicación PCT n.º WO 01/36607 A1). Puede usarse cualquiera de estos sistemas de expresión en levaduras.

30 Puede usarse un sistema de expresión en levaduras para producir una cantidad suficiente de la fitasa que está secretándose a partir de las células de levadura de modo que la fitasa pueda aislarse y purificarse convenientemente del medio de cultivo. La secreción al medio de cultivo se controla mediante un péptido señal (por ejemplo, el péptido señal *phyA* o el péptido señal de factor α de levadura) que puede dirigir la fitasa expresada fuera de la célula de levadura. Los expertos en la técnica conocen otros péptidos señal adecuados para facilitar la secreción de la fitasa a partir de células de levadura. El péptido señal se escinde normalmente de la fitasa tras la secreción.

35 Puesto que se usa un sistema de expresión en levaduras, puede usarse cualquier especie de levadura adecuada para la expresión de un gen de fitasa incluyendo especies de levadura tales como especies de *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), especies de *Kluyveromyces*, especies de *Torulasporea*, especies de *Schizosaccharomyces* y especies de levadura metilotróficas tales como especies de *Pichia* (por ejemplo, *Pichia pastoris*), especies de *Hansenula*, especies de *Torulopsis*, especies de *Candida* y especies de *Karwinskia*. En una realización el gen de fitasa se expresa en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. Las levaduras metilotróficas pueden utilizar metanol como única fuente de carbono para la producción de los recursos energéticos necesarios para mantener la función celular, y contienen un gen que codifica para alcohol oxidasa para la utilización de metanol.

40 Puede usarse cualquier sistema de huésped-vector conocido por el experto en la técnica (por ejemplo, un sistema en el que el vector se replica de manera autónoma o se integra en el genoma del huésped) y compatible con levadura. En una realización, el vector tiene sitios de escisión por endonucleasas de restricción para la inserción de fragmentos de ADN, y marcadores genéticos para la selección de transformantes. El gen de fitasa puede unirse funcionalmente a un promotor que puede dirigir la expresión de la fitasa, en levadura, y, en una realización, el gen de fitasa experimenta corte y empalme en marco con un elemento de potenciador de la transcripción y tiene una secuencia de terminador para la terminación de la transcripción (por ejemplo, terminador HSP150). El promotor puede ser un promotor constitutivo (por ejemplo, el promotor de 3-fosfoglicerato cinasa o el promotor de factor α) o uno inducible (por ejemplo, el promotor de ADH2, GAL-1-10, GAL 7, PHO5 T7 o metalotionina). Se describen diversos sistemas de huésped-vector en la solicitud de patente estadounidense n.º 09/104.769 (ahora patente estadounidense n.º 6.451.572), solicitud de patente estadounidense n.º 09/540.149 y en la solicitud de patente estadounidense n.º 60/166.179 (publicación PCT n.º WO 01/36607 A1).

Las células de levadura se transforman con un constructo de gen-vector que comprende un gen de fitasa acoplado operativamente con un sistema de expresión en levaduras usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Tales protocolos de transformación incluyen electroporación y transformación de protoplastos.

5 Las células de levadura transformadas pueden hacerse crecer mediante una variedad de técnicas incluyendo fermentación discontinua y continua en un medio líquido o en un medio semisólido. Se conocen en la técnica medios de cultivo para células de levadura y se complementan normalmente con una fuente de carbono (por ejemplo, glucosa). Las células de levadura transformadas pueden hacerse crecer de manera aerobia a 30°C en un entorno de pH controlado (un pH de aproximadamente 6) y con la fuente de carbono (por ejemplo, glucosa) mantenida de manera continua a un nivel predeterminado que se sabe que soporta el crecimiento de las células de levadura hasta
10 una densidad deseada dentro de un periodo de tiempo específico.

La fitasa expresada en levadura para su uso según el método de la presente invención puede producirse en forma purificada mediante técnicas convencionales (por ejemplo, al menos aproximadamente pura al 60%, o al menos aproximadamente pura al 70-80%). Normalmente, la fitasa se secreta al medio de cultivo de levaduras y se recoge del medio de cultivo. Para la purificación a partir del medio de cultivo la fitasa puede someterse, por ejemplo, a precipitación con sulfato de amonio seguido por cromatografía en columna de DEAE-Sepharose. Pueden usarse otras técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica tales como filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en columna de DEAE-Sepharose, cromatografía de afinidad, extracción con disolvente-disolvente, ultrafiltración y HPLC. Alternativamente, pueden no requerirse etapas de purificación porque la fitasa puede estar presente en concentraciones tan altas en el medio de cultivo que la fitasa está esencialmente pura en el medio de cultivo (por ejemplo, pura al 70-80%).
15
20

En los casos en los que la fitasa no se secreta al medio de cultivo, las células de levadura pueden lisarse, por ejemplo, mediante sonicación, calor o tratamiento químico, y centrifugarse el homogenado para eliminar los residuos celulares. El sobrenadante puede someterse entonces a precipitación con sulfato de amonio, y técnicas de fraccionamiento adicionales según se requiera, tales como filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en columna de DEAE-Sepharose, cromatografía de afinidad, extracción con disolvente-disolvente, ultrafiltración y HPLC para purificar la fitasa. Debe entenderse que los métodos de purificación descritos anteriormente para la purificación de fitasas a partir del medio de cultivo o a partir de células de levadura no son limitantes y que puede usarse cualquier técnica de purificación conocida por los expertos en la técnica para purificar la fitasa expresada en levadura si tales técnicas se requieren para obtener una fitasa sustancialmente pura.
25

30 En una realización, la fitasa se recoge del medio de cultivo sin etapas de purificación adicionales enfriando el cultivo de levadura (por ejemplo, hasta aproximadamente 8°C) y eliminando las células de levadura usando técnicas tales como centrifugación, microfiltración y filtración a vacío rotatoria. La fitasa en el medio libre de células puede concentrarse mediante técnicas tales como, por ejemplo, ultrafiltración y filtración de flujo tangencial.

Pueden prepararse diversas formulaciones de la preparación de fitasa purificada. Las enzimas fitasa pueden estabilizarse a través de la adición de otras proteínas (por ejemplo, gelatina y leche desnatada en polvo), agentes químicos (por ejemplo, glicerol, polietilenglicol, EDTA, sorbato de potasio, benzoato de sodio, y agentes reductores y aldehídos), polisacáridos, monosacáridos, lípidos (aceites vegetales hidrogenados), fitato de sodio y otros compuestos que contienen fitato, y similares. Las suspensiones de enzima fitasa también pueden secarse (por ejemplo, secado por pulverización, secado en tambor y liofilización) y formularse como polvos, gránulos, píldoras, bloques minerales, líquidos y geles a través de procedimientos conocidos. Pueden usarse agentes de gelificación tales como gelatina, alginato, colágeno, agar, pectina y carragenano. La invención también se extiende a una preparación de inoculante para pienso que comprende levadura no patógena liofilizada que puede expresar las fitasas de la presente invención en el tracto gastrointestinal del animal cuando se alimenta el animal con la preparación.
35
40

45 En una realización, la fitasa en el medio de cultivo libre de células se concentra tal como mediante ultrafiltración y secado por pulverización del material retenido en la ultrafiltración. El polvo secado por pulverización puede combinarse directamente con un producto alimenticio, o el polvo secado por pulverización puede combinarse con un portador para su uso como composición de aditivo para piensos para la complementación de un producto alimenticio con fitasa. En una realización, la fitasa en el material retenido se seca conjuntamente con un portador y/o estabilizador. En otra realización, la fitasa se seca por pulverización con un componente que ayuda a la fitasa secada por pulverización a adherirse a un portador o, alternativamente, la fitasa puede asociarse de manera suelta con el portador. La composición de aditivo para piensos (es decir, la composición de fitasa/portador y, opcionalmente, otros componentes) puede usarse para combinarse con el producto alimenticio para lograr una distribución más uniforme de la fitasa en el producto alimenticio.
50

55 Las composiciones de aditivo para piensos a modo de ejemplo (es decir, composiciones de fitasa/portador y, opcionalmente, otros componentes) pueden contener de 600 unidades de fitasa/gramo del portador a 5000 unidades de fitasa/gramo del portador. Estas composiciones de fitasa/portador pueden contener componentes adicionales. Por ejemplo, las composiciones pueden formularse para que contengan cascarilla de arroz o harinilla de trigo como portador (el 25-80 por ciento en peso), la fitasa (del 0,5 al 20 por ciento en peso), carbonato de calcio (del 10 al 50 por ciento en peso) y aceites (del 1 al 3 por ciento en peso). Alternativamente, la composición de aditivo para
60

piensos puede incluir la fitasa y el portador y ningún componente adicional. La composición de aditivo para piensos puede mezclarse con el pienso para obtener una mezcla de pienso final con desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 2000 unidades de fitasa/kilogramo del pienso.

5 Por tanto, se ilustra un producto alimenticio que comprende una fuente de hexakisfosfato de mio-inositol, una fitasa expresada en levadura y un portador. Adicionalmente, se proporciona un método de mejora del valor nutricional de un producto alimenticio consumido por un animal monogástrico en el que el producto alimenticio comprende hexakisfosfato de mio-inositol en el que el método comprende las etapas de secar por pulverización una fitasa seleccionada del grupo que consiste en AppA derivada de *Escherichia coli*, AppA2 derivada de *Escherichia coli* y un mutante dirigido al sitio de AppA derivada de *Escherichia coli*, mezclar la fitasa con un portador y, opcionalmente, otros componentes, para producir una composición de aditivo para piensos para complementar un producto alimenticio con la fitasa, mezclar la composición de aditivo para piensos con el producto alimenticio y alimentar al animal con el producto alimenticio complementado con la composición de aditivo para piensos.

15 En este contexto, el portador puede ser cualquier portador adecuado para preparar una composición de aditivo para piensos conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, cascarilla de arroz, harinilla de trigo, un polisacárido (por ejemplo, almidones específicos), un monosacárido, aceite mineral, grasa vegetal, lípidos hidrogenados, carbonato de calcio, gelatina, leche desnatada en polvo, fitato y otros compuestos que contienen fitato, una mezcla de base, y similares. Una mezcla de base comprende normalmente la mayoría de los componentes, incluyendo vitaminas y minerales, de una mezcla de pienso final excepto por la combinación de pienso (por ejemplo, harina de maíz y harina de soja). La fitasa para su uso en la composición de aditivo para piensos es preferiblemente AppA derivada de *E. coli*, AppA2 derivada de *E. coli* o un mutante dirigido al sitio de AppA derivada de *E. coli*.

20 La composición de aditivo para piensos que contiene la fitasa secada por pulverización y un portador y, opcionalmente, otros componentes, se mezcla con la mezcla de pienso final para obtener un pienso con un número predeterminado de unidades de fitasa/kilogramo del pienso (por ejemplo, de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 unidades de fitasa/kilogramo del pienso). Antes de combinarse con el portador, la fitasa secada por pulverización se somete a ensayo para determinar la actividad fitasa para determinar la cantidad de polvo secado que va a combinarse con el portador para obtener una composición de aditivo para piensos con un número predeterminado de unidades de fitasa/gramo del portador. El portador que contiene fitasa se combina entonces con la mezcla de pienso final para obtener una mezcla de pienso final con un número predeterminado de unidades de fitasa/kilogramo del pienso. Por consiguiente, la concentración de fitasa en la composición de aditivo para piensos es mayor que la concentración de fitasa en la mezcla de pienso final.

Según la invención el producto alimenticio se alimenta en combinación con la fitasa expresada en levadura a pollos, pavos (pavipollos (es decir, primeras varias semanas tras la eclosión) y animales más mayores), patos y faisanes, cualquier otra especie aviar, animales mantenidos en cautividad (por ejemplo, animales de zoo) o animales domésticos.

35 Los animales monogástricos agrícolas se alimentan normalmente con composiciones de pienso para animales que comprenden productos vegetales que contienen fitato (por ejemplo, la harina de maíz y harina de soja contienen fitato (hexakisfosfato de mio-inositol)) como forma de almacenamiento principal de fosfato y, por tanto, es ventajoso complementar el pienso con fitasa. Por consiguiente, los productos alimenticios que pueden complementarse con fitasa según la invención incluyen pienso para animales agrícolas y pienso para aves de corral, y cualquier producto alimenticio para una especie aviar.

45 En el caso de un pienso para animales alimentado a animales monogástricos, puede usarse cualquier combinación de pienso para animales conocida en la técnica según la presente invención tal como harina de colza, harina de semilla de algodón, harina de soja y harina de maíz, pero la harina de soja y harina de maíz se prefieren particularmente. La combinación de pienso para animales se complementa con la fitasa expresada en levadura, pero pueden añadirse opcionalmente otros componentes a la combinación de pienso para animales. Los componentes opcionales de la combinación de pienso para animales incluyen azúcares e hidratos de carbono complejos tales como monosacáridos tanto solubles en agua como insolubles en agua, disacáridos y polisacáridos. Componentes de aminoácido opcionales que pueden añadirse a la combinación de pienso son arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, tirosina etilo HCl, alanina, ácido aspártico, glutamato de sodio, glicina, prolina, serina, cisteína etilo HCl, y análogos, y sales de los mismos. Vitaminas que pueden añadirse opcionalmente son tiamina HCl, riboflavina, piridoxina HCl, niacina, niacinamida, inositol, cloruro de colina, pantotenato de calcio, biotina, ácido fólico, ácido ascórbico y vitaminas A, B, K, D, E, y similares. También pueden añadirse minerales, componentes proteicos, incluyendo proteína obtenida de harina de carne o harina de pescado, huevo líquido o en polvo, componentes solubles de pescado, concentrado de proteína de suero lácteo, aceites (por ejemplo, aceite de soja), almidón de maíz, calcio, fosfato inorgánico, sulfato de cobre, sal y caliza. Puede añadirse cualquier componente de medicamento conocido en la técnica a la combinación de pienso para animales tal como antibióticos.

60 Las composiciones de pienso también pueden contener enzimas distintas de la fitasa expresada en levadura. Enzimas a modo de ejemplo son proteasas, celulasas, xilanasas y ácido fosfatasa. Por ejemplo, la desfosforilación completa del fitato puede no lograrse por la fitasa sola y la adición de una ácido fosfatasa puede dar como resultado

una liberación de fosfato adicional. Puede añadirse una proteasa (por ejemplo, pepsina), por ejemplo, para escindir la fitasa expresada en levadura para potenciar la actividad de la fitasa. Una fitasa tratada con proteasa de este tipo puede presentar una capacidad potenciada para aumentar la biodisponibilidad de fosfato a partir de fitato, para reducir la razón de pienso con respecto a aumento de peso, para aumentar la masa ósea y el contenido en mineral, y para aumentar el peso del huevo o número de huevos puestos para una especie aviar en comparación con fitasa expresada en levadura intacta. Adicionalmente, pueden usarse combinaciones de fitasas, tal como cualquier combinación que pueda actuar de manera sinérgica aumentando la biodisponibilidad de fosfato a partir de fitato, o pueden usarse fragmentos proteolíticos de fitasas o combinaciones de fragmentos proteolíticos. En este sentido, el gen de fitasa expresado en levadura podría usarse para producir un producto truncado directamente para su uso en el método de la presente invención.

También pueden añadirse antioxidantes al producto alimenticio, tal como una composición de pienso para animales, para impedir la oxidación de la proteína fitasa usada para complementar el producto alimenticio. La oxidación puede impedirse por la introducción de antioxidantes que se producen de manera natural, tales como beta-caroteno, vitamina E, vitamina C y tocoferol o de antioxidantes sintéticos tales como hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado, butilhidroquinona terciaria, galato de propilo o etoiquina al producto alimenticio. También pueden añadirse compuestos que actúan de manera sinérgica con antioxidantes tales como ácido ascórbico, ácido cítrico y ácido fosfórico. La cantidad de antioxidantes incorporada de esta manera depende de requisitos tales como formulación del producto, condiciones de envío, métodos de envasado y vida útil de almacenamiento deseada.

Según un método de la presente invención, el producto alimenticio, tal como un pienso para animales, se complementa con cantidades de la fitasa expresada en levadura suficientes para aumentar el valor nutricional del producto alimenticio. Por ejemplo, en una realización, el producto alimenticio se complementa con menos de 2000 unidades (U) de la fitasa expresada en levadura por kilogramo (kg) del producto alimenticio. Esta cantidad de fitasa es equivalente a añadir aproximadamente 34 mg de la fitasa a un kg del producto alimenticio (aproximadamente el 0,0034% p/p). En otra realización, el producto alimenticio se complementa con menos de 1500 U de la fitasa expresada en levadura por kg del producto alimenticio. Esta cantidad de fitasa es equivalente a añadir aproximadamente 26 mg de la fitasa a un kg del producto alimenticio (aproximadamente el 0,0026% p/p). En otra realización, el producto alimenticio se complementa con menos de 1200 U de la fitasa expresada en levadura por kg del producto alimenticio. Esta cantidad de fitasa es equivalente a añadir aproximadamente 17 mg de la fitasa a un kg del producto alimenticio (aproximadamente el 0,0017% p/p). En otra realización el producto alimenticio, tal como una composición de pienso para animales, se complementa con de aproximadamente 50 U/kg a aproximadamente 1000 U/kg de la fitasa expresada en levadura (es decir, de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 14,3 mg/kg o de aproximadamente el 0,00007% a aproximadamente el 0,0014% (p/p)). En aún otra realización el producto alimenticio se complementa con de aproximadamente 50 U/kg a aproximadamente 700 U/kg de la fitasa expresada en levadura (es decir, de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 10 mg/kg o de aproximadamente el 0,00007% a aproximadamente el 0,001% (p/p)). En todavía otra realización el producto alimenticio se complementa con de aproximadamente 50 U/kg a aproximadamente 500 U/kg de la fitasa expresada en levadura (es decir, de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 7 mg/kg o de aproximadamente el 0,00007% a aproximadamente el 0,007% (p/p)). En aún otra realización, el producto alimenticio se complementa con de aproximadamente 50 U/kg a aproximadamente 200 U/kg de la fitasa expresada en levadura (es decir, de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 2,9 mg/kg o de aproximadamente el 0,00007% a aproximadamente el 0,0003% (p/p)). En cada una de estas realizaciones se entiende que "kg" se refiere a kilogramos del producto alimenticio, tal como la composición de pienso final en el caso de una combinación de pienso para animales (es decir, el pienso en la composición como mezcla final). Además, una unidad (U) de actividad fitasa se define como la cantidad de enzima requerida para producir 1 mmol de fosfato inorgánico por minuto a partir de 1,5 mmol/l de fitato de sodio a 37°C y a un pH de 5,5.

La fitasa expresada en levadura puede mezclarse con el producto alimenticio, tal como un pienso para animales (es decir, la composición de pienso como mezcla final), antes de alimentar al animal con el producto alimenticio o la fitasa puede alimentarse al animal con el producto alimenticio sin mezclado previo. Por ejemplo, la fitasa puede añadirse directamente a un producto alimenticio no tratado, peletizado o procesado de otra forma, tal como un pienso para animales, o la fitasa puede proporcionarse por separado del producto alimenticio en, por ejemplo, un bloque mineral, una píldora, una formulación de gel, una formulación líquida o en el agua para beber. Según la invención, alimentar al animal con el producto alimenticio "en combinación con" la fitasa significa alimentar el producto alimenticio mezclado con la fitasa o alimentar el producto alimenticio y la fitasa por separado sin mezclado previo.

La fitasa expresada en levadura puede usarse en una forma no encapsulada o encapsulada para alimentar al animal o para su mezcla con una combinación de pienso para animales. La encapsulación protege a la fitasa frente a la descomposición y/u oxidación antes de su ingestión por el animal (es decir, la encapsulación aumenta la estabilidad de la proteína) y proporciona un producto seco para una alimentación más fácil al animal o para un mezclado más fácil con, por ejemplo, una combinación de pienso para animales. La fitasa expresada en levadura puede protegerse de esta manera, por ejemplo, recubriendo la fitasa con otra proteína o cualquier otra sustancia que se sabe en la técnica que es un agente de encapsulación eficaz tal como polímeros, ceras, grasas y aceites vegetales hidrogenados. Por ejemplo, la fitasa puede encapsularse usando una técnica reconocida en la técnica tal como una técnica de encapsulación con alginato de Na^{2+} en la que la fitasa se recubre con alginato de Na^{2+} seguido por

conversión en alginato de Ca^{2+} en presencia de iones Ca^{2+} para la encapsulación. Alternativamente, la fitasa puede encapsularse mediante una técnica reconocida en la técnica tal como granulación (es decir, atomización de un líquido en estado fundido y enfriamiento de las gotitas para formar una perla). Por ejemplo, la fitasa puede granularse en copos de semilla de algodón hidrogenada o aceite de soja hidrogenado para producir un producto seco. La fitasa puede usarse en una forma totalmente no encapsulada, una forma totalmente encapsulada o pueden añadirse mezclas de fitasa no encapsulada y encapsulada al producto alimenticio, tal como una composición de pienso para animales, o alimentarse directamente al animal sin mezclado previo con el producto alimenticio. Cualquier fitasa para su uso según el método de la presente invención puede tratarse de manera similar.

Según el método de la presente invención, el producto alimenticio que contiene fitasa puede administrarse a animales por vía oral en un producto alimenticio, tal como un pienso para animales, o en un bloque mineral o en el agua para beber, pero puede utilizarse cualquier otro método de administración eficaz conocido por los expertos en la técnica (por ejemplo, una forma de píldora). El producto alimenticio que contiene fitasa expresada en levadura puede administrarse a los animales durante cualquier periodo de tiempo que sea eficaz para aumentar la biodisponibilidad de fosfato a partir de fitato, para reducir la razón de pienso con respecto a aumento de peso, o para aumentar la masa ósea y el contenido en mineral del animal. Por ejemplo, en el caso de una composición de pienso alimentada a un animal monogástrico, la composición de pienso que contiene fitasa expresada en levadura puede administrarse al animal diariamente durante toda la vida del animal. Alternativamente, la composición de pienso que contiene fitasa puede administrarse al animal durante un periodo de tiempo más corto. Los periodos de tiempo para alimentar el producto alimenticio que contiene fitasa a los animales no son limitativos y debe apreciarse que puede usarse cualquier periodo de tiempo que se determina que es eficaz para potenciar la nutrición de los animales administrando el producto alimenticio que contiene fitasa.

EJEMPLO 1

COMPOSICIÓN DE COMBINACIÓN DE PIENSO PARA ANIMALES

La composición de la mezcla de piensos para pollos (es decir, la composición de pienso sin fitasa) fue tal como sigue:

Tabla 1. Composición de la combinación de pienso para animales usada en ensayos en pollos y cerdos.

Componente	Ensayos en pollos	Ensayo en cerdos
Harina de maíz	hasta 100,0	hasta 100,0
Maíz	50,89	61,35
Harina de soja, sin cáscara	39,69	31,19
Aceite de soja	5,00	3,00
Caliza, molida	1,67	1,06
Sal	0,40	--
Mezcla de vitaminas para pollos	0,20	--
Mezcla de vitaminas para cerdos	--	0,20
Mezcla de oligoelementos para pollos	0,15	--
Mezcla de oligovitaminas para cerdos	--	0,35
Cloruro de colina (60%)	0,20	--
Premezcla de antibióticos para cerdos (CSP)	--	0,50
Premezcla de bacitracina	0,05	--
Sulfato de cobre	--	0,08
L-Lisina HCl, calidad para alimentación	--	0,17
DL-Metionina, calidad para alimentación	0,20	0,05

EJEMPLO 2

PREPARACIÓN DE FITASA

Se inocularon cultivos simiente en levadura en medio de crecimiento con *Pichia pastoris* X33 transformada con o bien AOX1-*appA*, pGAP-*appA2* o bien mutante AOX1-U. Se hicieron crecer los cultivos simiente a 30°C durante aproximadamente 24 horas hasta que se alcanzó una DO_{600} de aproximadamente 50. Entonces se usaron los cultivos simiente para inocular fermentadores (procedimiento discontinuo) que contenían medio de crecimiento FM-22 estéril que contenía glucosa al 5%. Se diluyeron los cultivos simiente de 24 horas de aproximadamente 1:25 a aproximadamente 1:50 en el medio de crecimiento FM-22. Se incubaron los cultivos de levadura de manera aerobia en los fermentadores a 30°C con control del pH a 6,0 (usando NH_2OH) y con alimentación de glucosa continua hasta que los cultivos alcanzaron una OD_{600} de aproximadamente 400 (aproximadamente 36 horas).

Para recoger las fitasas del medio de cultivo, se enfriaron rápidamente los cultivos de levadura hasta 8°C. Se separaron las células del medio de cultivo mediante centrifugación y mediante microfiltración. Las fitasas estaban puras al 70-80% en el medio de cultivo y se prepararon para su combinación con un portador como aditivo para

piensos tal como sigue.

Se concentró el medio libre de células que contenía las fitasas secretadas mediante ultrafiltración (límite de exclusión de 10.000 PM). Se transfirieron los materiales retenidos en la ultrafiltración (el 7-5% de sólidos) a recipientes estériles para el secado por pulverización. Se secaron por pulverización los materiales retenidos usando técnicas convencionales conocidas en la técnica y se recogió el polvo resultante (el 4-6% de humedad).

Se realizaron pruebas microbiológicas del polvo y se sometió a ensayo el polvo para determinar la actividad fitasa. Se usó la actividad fitasa del polvo (unidades de actividad fitasa/mg de polvo) para determinar la cantidad de polvo secado que iba a combinarse con harinilla de trigo (es decir, el portador) para obtener una mezcla de fitasa/portador con un número predeterminado de unidades de fitasa/gramo del portador. Se mezcló el polvo de fitasa secado con la harinilla de trigo y se envasó en recipientes a prueba de humedad. Se mezcló la harinilla de trigo que contenía fitasa con una combinación de pienso para animales según se necesitase para obtener una mezcla de pienso final con un número predeterminado de unidades de fitasa/kg del pienso (de aproximadamente 400 a aproximadamente 1000 U/kg).

EJEMPLO 3

COMPOSICIÓN DE ADITIVO PARA PIENSOS

Las siguientes composiciones son a modo de ejemplo de composiciones de aditivo para piensos que pueden mezclarse con una combinación de pienso para animales, tal como la combinación de pienso para animales descrita en el ejemplo 1, para obtener una mezcla de pienso final con, por ejemplo, de aproximadamente 50 U de fitasa/kilogramo de la mezcla de pienso final a aproximadamente 2000 U de fitasa/kilogramo del pienso. Las composiciones de aditivo para piensos descritas a continuación no son limitativas y debe apreciarse que puede usarse cualquier composición de aditivo para pienso que contenga fitasa que se determina que es eficaz para potenciar el valor nutricional del pienso para animales. Se muestran composiciones de aditivo para piensos a modo de ejemplo para una composición de aditivo para piensos que contiene 600 unidades de fitasa/gramo de la composición de aditivo para piensos o 5000 unidades de fitasa/gramo de la composición de aditivo para piensos.

	600 unidades de fitasa/gramo (porcentaje en peso)	5000 unidades de fitasa/gramo (porcentaje en peso)
Cascarilla de arroz	82,64	76,35
Carbonato de calcio	15,00	15,00
Aceite	1,5	1,5
Enzima	0,86	7,15

	600 unidades de fitasa/gramo (porcentaje en peso)	5000 unidades de fitasa/gramo (porcentaje en peso)
Trigo molido	82,64	76,35
Carbonato de calcio	15,00	15,00
Aceite	1,5	1,5
Enzima	0,86	7,15

EJEMPLO 4

PROTOCOLO DE ALIMENTACIÓN

Se alimentaron pollos usando el protocolo descrito en Biehl, *et al.* (J. Nutr. 125:2407-2416 (1995)). En resumen, se realizaron los ensayos pollos macho y hembra del cruce de machos de New Hampshire y hembras Columbian y se realizaron en una sala de laboratorio controlada ambientalmente con 24 horas de iluminación fluorescente. Desde el día 0 hasta el día 7 tras la eclosión, se alimentaron los pollos con una dieta basal del 23% de proteína en bruto, harina de maíz-soja enriquecida con metionina tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1. En el día 8, se pesaron los pollos, se anillaron en las alas y se asignaron aleatoriamente a tratamientos experimentales. Cinco jaulas de tres o cuatro pollos por jaula recibieron cada tratamiento dietético durante un periodo de alimentación experimental de 13 días, y los pollos tenían un peso inicial promedio de 80 a 100 gramos.

A lo largo del periodo de alimentación de 13 días, se confinaron los pollos en baterías para pollos controladas termostáticamente, y también se usaron bebederos y comederos de acero inoxidable. Se emprendieron estas etapas para evitar la contaminación mineral del entorno. Estaban libremente disponibles dietas y agua desionizada destilada a lo largo del periodo de alimentación.

Se sometieron a ayuno los cerdos durante 12 antes del comienzo de cada ensayo, se alimentaron con las dietas experimentales durante 23 días, y se sometieron a ayuno durante 12 horas tras completarse cada ensayo. Se

usaron diez cerdos por grupo de tratamiento y los cerdos promediaron aproximadamente 8-120 kg al inicio del ensayo. Se alojaron los cerdos en jaulas individuales que contenían un comedero de acero inoxidable, un bebedero de acero inoxidable, y vallas de barra redonda galvanizadas.

- 5 Se sacrificaron para las pruebas todos los pollos en cada grupo de tratamiento y los cinco cerdos de peso mediano de cada grupo de tratamiento. Se midió el aumento de peso corporal y se recogieron la tibia (pollos) o el peroné (cerdos) para el análisis de cenizas óseas como reflejo de la masa ósea y el contenido en mineral.

EJEMPLO 5

MEDICIÓN DEL FOSFATO INORGÁNICO Y EL FOSFATO BIODISPONIBLE

- 10 Se cuantificó colorimétricamente el fosfato total en las muestras de pienso usadas para generar una curva patrón según AOAC (1984) tal como se describe en Biehl *et al.* Fosfato de potasio monobásico (pH_2PO_4) sirvió como patrón. Se generó una curva patrón midiendo los niveles de fosfato inorgánico en pienso basal complementado con KH_2PO_4 (Xaxis) y determinando el peso de cenizas de tibia (mg) o aumento de peso (g) (eje Y) para animales alimentados con pienso basal complementado con diversos niveles de KH_2PO_4 . Entonces se determinó la biodisponibilidad de fosfato a partir de fitato para animales alimentados con pienso basal complementado con fitasa mediante comparación del peso de cenizas de tibia y el aumento de peso en estos animales con la curva patrón.

EJEMPLO 6

ANÁLISIS DE CENIZAS ÓSEAS

- 20 Al final de cada experimento, se sacrificaron los pollos o los cerdos, y se extrajeron cuantitativamente los huesos de la tibia o el peroné derecho de los pollos o los cerdos, respectivamente. Se agruparon los huesos por jaula duplicada y, tras la eliminación del tejido adherente, se secaron durante 24 horas a 100°C y se pesaron. Tras pesar, se redujeron a cenizas secas los huesos durante 24 horas a 600°C en un horno de mufla. Se expresó el peso de las cenizas como un porcentaje del peso de huesos en seco y también como peso de cenizas por hueso.

EJEMPLO 7

EXPRESIÓN DE FITASA EN LEVADURA

- 25 Según la presente invención, cualquier gen de fitasa puede expresarse en levadura, y puede usarse cualquier sistema de expresión en levaduras según métodos conocidos por los expertos en la técnica. Se describen sistemas de expresión en levaduras para genes de fitasa a modo de ejemplo, tales como los genes *appA* y *appA2* derivados de *E. coli*, y para un mutante dirigido al sitio de AppA derivado de *E. coli*, en la solicitud de patente estadounidense n.º 09/104.769 (ahora patente estadounidense n.º 6.451.572), la solicitud de patente estadounidense n.º 09/540.149 y en la solicitud de patente estadounidense n.º 60/166.179 (publicación PCT n.º WO 01/36607 A1). Se describen brevemente a continuación sistemas de expresión en levaduras a modo de ejemplo para expresar las enzimas AppA y AppA2 y un mutante dirigido al sitio de AppA.

Expresión del gen *appA* en *Saccharomyces cerevisiae*.

- 35 Se expresó el gen *appA* en *Saccharomyces cerevisiae* unido al péptido señal del gen *phyA* (gen de fitasa de *Aspergillus niger*). Se obtuvo el gen *appA* de la ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, en donde se depositó según los requisitos del Tratado de Budapest, con el número de registro de la ATCC 87441. Se transformó el gen *appA* (1,3 kb) en la cepa de *E. coli* BL21 usando el sistema de expresión de *pappA1* (Ostanin *et al.*, J. Biol. Chem., 267:22830-36 (1992)). Para preparar el constructo de *appA*-péptido señal de *phyA*, se usó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se sintetizaron dos cebadores y el cebador en 5' tenía 80 pares de bases de longitud y contenía la secuencia de péptido señal de *phyA*, un sitio de corte de enzima de restricción KpnI y una secuencia complementaria al molde tal como sigue: 5' GGG GTA CCA TGG GCG TCT CTG CTG TTC TAC TTC CTT TGT ATC TCC TGT CTG GAG TCA CCT CCG GAC AGA GTG AGC CGG AG 3' (SEQ. ID No.: 6). El cebador en 3' tenía 24 pares de bases de longitudes y contenía un sitio EcoRI y una secuencia complementaria al molde tal como sigue: 5' GGG AAT TCA TTA CAA ACT GCA GGC 3' (SEQ. ID No.: 7). Se ejecutó la reacción PCR durante 25 ciclos con 1 minuto de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de apareamiento a 58°C y 1 minuto de extensión de la cadena a 72°C.

Se amplificó un fragmento de 1,3 kb mediante PCR, y se digirió con KpnI y EcoRI y se ligó en pYES2, un vector para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. Se transformó el constructo de pYES2-*appA*-péptido señal de *phyA* en la levadura (INVScI, Invitrogen, San Diego, CA) mediante el método de acetato de litio.

- 50 Se inocularon transformantes seleccionados en medio YEPD y se indujo la expresión con galactosa tras alcanzarse una DO_{600} de 2. Se recogieron las células 15-20 horas tras la inducción. Se aisló la enzima fitasa AppA del sobrenadante de cultivo y era la principal proteína presente eliminando la necesidad de una tediosa purificación.

Expresión del gen *appA* o *appA2* en *Pichia pastoris*.

appA. El molde para la reacción PCR fue tal como se describió anteriormente. El cebador en 5' usado para la

reacción PCR fue tal como sigue: 5' GGA ATT CCA GAG TGA GCC GGA 3' (SEQ ID No.: 8). El cebador en 3' fue tal como sigue: 5' GGG GTA CCT TAC AAA CTG CAC G 3' (SEQ ID No.: 9). La reacción de amplificación incluyó 1 ciclo a 94°C (3 min.), 30 ciclos a 94°C (0,8 min), 30 ciclos a 54°C (1 min.), 30 ciclos a 72°C (2 min.) y 1 ciclo a 72°C (10 min). Se insertó el producto en primer lugar en el vector pGEM T-easy (Promega), y se usó la cepa de *E. coli* TOP10F' como huésped para amplificar el constructo. Entonces se insertó el constructo en el vector de expresión de levadura pPlcZ α A (Invitrogen) en el sitio EcoRI, y se usó de nuevo la cepa de *E. coli* TOP10F' como huésped para amplificar el constructo.

Se transformó el vector PlcZ α que contenía *appA* en la cepa de *Pichia pastoris* X33 mediante electroporación. Se sembraron en placa las células transformadas en medio de agar YPD-zeocina y se incubaron colonias positivas en medio mínimo con glicerol (BMGY) durante 24 horas. Cuando se alcanzó una DO₆₀₀ de 5, se centrifugaron las células y se resuspendieron en medio con metanol al 0,5% (BMMY) para la inducción. Se añadió metanol (100%) cada 24 horas para mantener una concentración del 0,5-1%. Se recogieron las células a las 192 horas tras la inducción y se purificó la proteína AppA mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en columna de DEAE-Sepharose.

appA2. Se aisló el gen *appA2* (véase la solicitud de patente estadounidense n.º 09/540.179) de una colonia bacteriana que presentaba una actividad fitasa particularmente alta obtenida del contenido del colon de cerdos Hampshire-Yorkshire-Duroc cruzados. Para aislar una colonia bacteriana que presentaba alta actividad fitasa, se diluyó una muestra del contenido del colon en un medio de glucosa-fluido del rumen anaerobio, se agitó vigorosamente durante 3 minutos, y se diluyó en serie. Se cultivaron las muestras diluidas a 37°C durante 3 días en un medio de fluido del rumen-glucosa-celobiosa-agar que contenía fitato de calcio insoluble. Se sometieron a ensayo las colonias con una zona clara para determinar la actividad fitasa usando fitato de sodio como sustrato. Se identificó la colonia identificada como la que producía la actividad fitasa más alta como una cepa de *E. coli*. Por consiguiente, se aisló el gen *appA2* usando los cebadores descritos anteriormente para la expresión de *appA* en *Pichia pastoris* (SEQ. ID No. 8 y 9). Se clonó el gen *appA2* en el vector PlcZ α y se transformó la cepa de *Pichia pastoris* X33 con el constructo de PlcZ α -*appA2* tal como se describió anteriormente para la expresión de *appA* en *Pichia pastoris*. Se expresó la enzima AppA2 tal como se describió anteriormente para AppA, y se recogió la proteína AppA2 del sobrenadante de cultivo de levaduras.

Mutantes dirigidos al sitio de *AppA*.

Se prepararon mutantes dirigidos al sitio de *appA* tal como se describe en la solicitud de patente estadounidense n.º 06/166.179 (publicación PCT n.º WO 01/36607 A1), incorporada en el presente documento como referencia. En resumen, se construyeron los mutantes de *appA* de *E. coli* usando el método de mutagénesis dirigida al sitio de megacebador (Seraphin, B. *et al.*, Nucleic Acids Res. 24:3276-77 (1996); Smith, A.M. *et al.*, Biotechniques 22: 438-39 (1997)).

Se obtuvo el molde para la mutagénesis de la ATCC, y se transformó el gen (1,3 kb) en la cepa de *E. coli* BL21 (n.º 87441) usando el vector de expresión de *pappA1* (Ostanin *et al.*, J. Biol. Chem., 267:22830-36 (1992)). Se amplificó el molde tal como se describió anteriormente para *appA* expresado en *Pichia pastoris* usando los cebadores usados anteriormente para la expresión de *appA* en *Pichia pastoris* (SEQ. ID No.: 8 y 9). La reacción de amplificación incluyó 1 ciclo a 94°C (3 min.), 30 ciclos a 94°C (0,5 min), 30 ciclos a 54°C (1 min.), 30 ciclos a 72°C (1,5 min.) y 1 ciclo a 72°C (10 min).

Se realizó la reacción de PCR mutagénica tal como se describió anteriormente usando los siguientes cebadores:

5'CTGGGTATGGTTGGTTATATTACAGTCAGGT3' (SEQ ID No.: 10)	A131N V134N
5'CAAACCTTGAACCTTAAACGTGAG3' (SEQ ID No.: 11)	C200N
5'CCTGCGTTAAGTTACAGCTTTCATTCTGTTT3' (SEQ ID No.: 12)	D207N S211N

Las reacciones PCR mutagénicas incorporaban cebadores apropiados para preparar los mutantes A131N/V134N/D207N/S211N, C200N/D207N/S211N (mutante U) y A131N/V134N/C200N/D207N/S211N de *appA*. Se realizó la primera reacción PCR mutagénica (100 μ l) tal como se describió anteriormente, usando 4 μ l de la mezcla de reacción PCR de *appA* intacto y los cebadores modificados apropiados enumerados anteriormente. Se resolvieron todos los productos de PCR de megacebador en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5%. Se cortaron los fragmentos esperados y se eluyeron con un kit GENECLEAN II. Se estableció la reacción PCR mutagénica final (100 μ l) tal como se describió anteriormente, usando 4 μ l del producto de PCR de *appA* y concentraciones variables del megacebador purificado (de 50 ng a 4 μ g), dependiendo de su tamaño. Se establecieron cinco ciclos térmicos a 94°C durante 1 minuto y 70°C durante 2 minutos. Mientras estaba a 70°C, se añadieron 1 μ mol de cebador directo y 2 U de ADN polimerasa AmpliTaq y se mezclaron suavemente con la mezcla de reacción, y continuó el ciclado térmico durante 25 ciclos a 94°C durante 1 minuto y 70°C durante 1,5 minutos.

Se expresaron los genes que codifican para los mutantes dirigidos al sitio en *Pichia pastoris* tal como se describió

anteriormente para el gen *appA2*. Se expresaron los productos proteicos tal como se describió anteriormente para AppA, y se purificaron los mutantes dirigidos al sitio a partir del sobrenadante de cultivo de levaduras mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en DEAE-Sepharose.

EJEMPLO 8

5 EFECTOS *IN VIVO* DE FITASAS EXPRESADAS EN LEVADURA ALIMENTADAS A POLLOS

Para evaluar su potencial como complementos de piensos para animales, se secaron las fitasas expresadas en levadura AppA y AppA2, y se añadieron a la combinación de pienso para animales (el 23% de proteína en bruto) descrita anteriormente en el ejemplo 1 usando harinilla de trigo como portador. Se alimentaron pollos (cuatro pollos por jaula; peso inicial promedio de 97 gramos) con composiciones de pienso complementadas con fitasa tal como se describió anteriormente en el ejemplo 4. Los grupos de tratamiento incluyeron diversos niveles de KH₂PO₄ para construir la curva patrón, 500 U/kg de Natuphos®, una fitasa disponible comercialmente (Gist-Brocades) expresada en el hongo *Aspergillus niger*, 500 U/kg de AppA expresada en *Pichia pastoris* o en *E. coli*, y diversos niveles de AppA2/p (AppA2 expresada en *Pichia pastoris* usando el promotor de pGAP constitutivo para la expresión génica) tal como sigue:

15 Grupos de tratamiento:

1. Dieta basal (el 0,10% de P, el 0,75% de Ca)
2. Igual que 1 + el 0,05% de P a partir de KH₂PO₄
3. Igual que 1 + el 0,10% de P a partir de KH₂PO₄
4. Igual que 1 + el 0,15% de P a partir de KH₂PO₄
- 20 5. Igual que 1 + 500 U/kg de AppA (levadura)
6. Igual que 1 + 500 U/kg de AppA (*E. coli*)
7. Igual que 1 + 500 U/kg de AppA2/p
8. Igual que 1 + 1000 U/kg de AppA2/p
9. Igual que 1 + 1500 U/kg de AppA2/p
- 25 10. Igual que 1 + 500 U/kg de Natuphos®

Para los diversos grupos de tratamiento se determinaron el aumento de peso, la ingesta de pienso, la razón de alimentación con respecto a aumento de peso, el peso de tibia en seco, el peso de cenizas de tibia, el peso de cenizas de tibia como porcentaje del peso de tibia en seco y el porcentaje de fosfato biodisponible basado en el peso de cenizas de tibia y el aumento de peso. Los resultados se expresan a continuación como una media para los cuatro pollos para cada una de las cinco jaulas (R1, R2, R3, R4 y R5), y también se calculó la media para las cinco jaulas (marcada "media" en las tablas). Los grupos de tratamiento se marcan T1-T10 en las tablas, y "g/p/d" indica aumento de peso o ingesta de pienso en gramos/pollo/día.

Aumento de peso (g/p)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	185	282	315	321	314	284	334	352	334	269
R2	219	286	315	336	317	322	315	326	348	274
R3	234	277	327	335	321	312	318	321	342	267
R4	234	291	309	311	316	308	326	342	333	276
R5	223	278	303	332	316	268	313	336	361	294
Media	219 ^g	283 ^{ei}	314 ^{cd}	327 ^{bc}	317 ^c	299 ^{de}	321 ^{bc}	335 ^{ab}	344 ^a	276 ^f
g/p/d	16,8	21,8	24,2	25,2	24,4	23,0	24,7	25,8	26,5	21,2

EEM agrupado = 6

35 LSD = 16

Ingesta de pienso de 13 d (g/p)

ES 2 597 503 T3

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	303	392	434	434	426	389	450	474	465	397
R2	330	462	448	454	429	430	425	449	472	396
R3	336	391	445	458	446	425	428	445	464	397
R4	350	416	432	424	432	420	441	464	449	386
R5	335	388	421	467	425	389	453	461	483	420
Media	331 ¹	410 ^c	436 ^c	447 ^{abc}	432 ^{cd}	411 ^{de}	439 ^{bc}	459 ^{ab}	467 ^a	399 ^c
g/p/d	25,5	31,5	33,5	34,4	33,2	31,6	33,8	35,3	35,9	30,7

EEM agrupado = 7

LSD = 21

Aumento/pienso (g/kg)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	611	718	726	740	738	729	742	742	720	678
R2	665	618	703	741	738	749	741	727	738	692
R3	696	708	736	730	719	736	743	722	736	671
R4	668	700	715	733	731	733	738	738	743	715
R5	665	717	721	710	742	688	691	730	749	710
Media	661 ^c	692 ^b	720 ^a	731 ^a	734 ^a	727 ^a	731 ^a	732 ^a	737 ^a	691 ^b

EEM agrupado = 10

5 LSD = 28

Peso de tibia seco (mg/p)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	659	804	883	981	892	787	914	1059	1106	757
R2	655	769	891	977	907	918	873	997	1083	759
R3	713	751	878	1008	901	820	905	964	1065	726
R4	740	742	931	925	823	809	923	1083	1096	729
R5	714	866	942	841	809	931	1036	1132	764	714
Media	698 ^g	756 ^f	890 ^d	967 ^c	873 ^{dc}	829 ^e	909 ^d	1028 ^d	1096 ^a	747 ^f

EEM agrupado = 16

LSD = 45

Cenizas de tibia (mg/p)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	232	307	406	492	434	345	439	590	617	278
R2	215	315	415	507	445	435	420	546	600	305
R3	259	300	406	520	435	382	451	523	604	284
R4	237	297	442	462	392	372	454	590	616	267
R5	242	277	396	471	432	373	471	548	642	316
Media	237 ^h	299 ^g	413 ^e	490 ^c	428 ^{de}	381 ^f	447 ^d	559 ^b	616 ^a	290 ^g

10 EEM agrupado = 10

ES 2 597 503 T3

LSD = 28

Ingesta de P complementaria (g)

	T1	T2	T3	T4
R1	0	0,196	0,434	0,651
R2	0	0,231	0,448	0,680
R3	0	0,196	0,445	0,687
R4	0	0,208	0,432	0,636
R5	0	0,194	0,421	0,701
Media	0 ^d	0,205 ^c	0,436 ^b	0,671 ^a

EEM agrupado = 0,007

LSD = 0,022

5

Cenizas de tibia (%)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	35,15	38,22	46,03	50,12	48,64	43,78	47,98	55,64	55,79	36,78
R2	32,86	40,92	46,53	51,86	49,06	47,31	48,07	54,69	55,35	40,15
R3	36,30	39,96	46,22	51,61	48,31	46,62	49,85	54,23	56,69	39,14
R4	32,01	40,02	47,47	49,96	47,70	45,96	49,19	54,44	56,23	36,68
R5	33,45	38,82	45,74	49,95	51,40	46,11	50,54	52,86	56,71	41,32
Media	33,95 ^d	39,59 ^f	46,40 ^e	50,70 ^c	49,02 ^d	45,96 ^e	49,13 ^{cd}	54,37 ^b	56,15 ^a	38,81 ^f

EEM agrupado = 0,57

LSD = 1,62

Estimaciones de equivalencia de fósforo

Peso de cenizas de tibia

- 10 Curva patrón de KH_2PO_4 : $Y = \text{cenizas de tibia (mg)}$
 $X = \text{ingesta de P complementaria o equivalente (g)}$

$$Y = 232,0 + 389,9 X$$

$$r^2 = 0,97$$

Para actividad de fitasa de 500 U/kg (cálculos de ejemplo usando medios de tratamiento de cenizas de tibia)

	% de P biodisponible
AppA (levadura): (428 - 232,0)/389,9=0,503 g de P de 432 g de FI =	0,116%
AppA (<i>E. coli</i>): (381-232,0)/389,9=0,382 g de P de 411 g de FI =	0,093%
AppA2/p: (447-232,0)/389,9=0,551 g de P de 439 g de FI =	0,126%
Natuphos®: (290-232,0)/389,9=0,149 g de P de 399 g de FI=	0,037%

- 15 ** Resultados de ANOVA (cálculo realizado para cada jaula de cuatro aves; leyenda del tratamiento en la página previa)

P biodisponible (%)

	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	0,122	0,075	0,118	0,194	0,212	0,030

ES 2 597 503 T3

R2	0,127	0,121	0,113	0,179	0,200	0,047
R3	0,117	0,091	0,131	0,168	0,206	0,034
R4	0,095	0,085	0,129	0,198	0,219	0,023
R5	0,121	0,093	0,135	0,176	0,218	0,051
Media	0,116 ^c	0,093 ^d	0,125 ^c	0,183 ^d	0,211 ^a	0,037 ^c

EEM agrupado = 0,005

LSD = 0,016

Contrastes	Significación (valor de P)
AppA (levadura) frente a AppA (<i>E. coli</i>)	0,006
AppA2/p lineal	0,001
AppA2/p cuadrático	0,039

Aumento de peso

Curva patrón de KH₂PO₄: Y = Aumento de peso (g)

5 X = ingesta de P complementaria o equivalente (g)

Y = 234,1 + 157,2 X

r² = 0,84

Resultados de ANOVA (cálculo realizado para cada jaula de cuatro aves; leyenda del tratamiento en la página previa)

10 P biodisponible (%)

	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	0,119	0,082	0,141	0,158	0,137	0,056
R2	0,123	0,130	0,121	0,130	0,154	0,064
R3	0,124	0,117	0,125	0,124	0,148	0,053
R4	0,121	0,112	0,133	0,148	0,140	0,069
R5	0,123	0,055	0,111	0,141	0,167	0,091
Media	0,122 ^b	0,099 ^d	0,126 ^b	0,140 ^{ab}	0,149 ^a	0,067 ^d

EEM agrupado = 0,007

LSD = 0,021

Contrastes	Significación (valor de P)
AppA (levadura) frente a AppA (<i>E. coli</i>)	0,038
AppA2/p lineal	0,036
AppA2/p cuadrático	0,768

15 La complementación de la combinación de pienso para animales con cantidades crecientes de KH₂PO₄ dio como resultado aumentos lineales (p<0,001) en el aumento de peso y las cenizas de tibia. La complementación de la mezcla de piensos con Natuphos® dio como resultado aumentos lineales (p<0,001) en el aumento de peso, las cenizas de tibia y el % de fosfato biodisponible. A 500 U/kg las enzimas expresadas en levadura (AppA y AppA2/p) eran más eficaces que AppA expresada en *E. coli* o Natuphos® en la mejora de cada una de las respuestas *in vivo* sometidas a prueba, incluyendo la razón de alimentación con respecto a aumento de peso, el peso de la tibia y el % de fosfato biodisponible. De hecho, AppA y AppA2/p fueron 2-6 veces más eficaces en el aumento del nivel de fosfato biodisponible que Natuphos®, dependiendo de si se usó el peso de cenizas de tibia o el aumento de peso para calcular el porcentaje de fosfato biodisponible.

EJEMPLO 9

EFFECTOS IN VIVO DE FITASAS EXPRESADAS EN LEVADURA ALIMENTADAS A POLLOS

25 El procedimiento fue tal como se describió en el ejemplo 8 excepto porque los pollos tenían un peso inicial promedio de 91 gramos, y los grupos de tratamiento fueron los siguientes:

Grupos de tratamiento:

1. Dieta basal (el 0,10% de P, el 0,75% de Ca)
2. Igual que 1 + el 0,05% P de KH₂PO₄

ES 2 597 503 T3

- 3. Igual que 1 + el 0,10% P de KH_2PO_4
- 4. Igual que 1 + 300 U/kg de fitasa Natuphos®
- 5. Igual que 1 + 500 U/kg de fitasa Natuphos®
- 6. Igual que 1 + 700 U/kg de fitasa Natuphos®
- 5 7. Igual que 1 + 900 U/kg de fitasa Natuphos®
- 8. Igual que 1 + 1100 U/kg de fitasa Natuphos®
- 9. Igual que 1 + 1300 U/kg de fitasa Natuphos®
- 10. Igual que 1 + 1500 U/kg de fitasa de Natuphos®
- 11. Igual que 1 + 500 U/kg de fitasa Ronozyme®
- 10 12. Igual que 1 + 300 U/kg de fitasa mutante U
- 13. Igual que 1 + 500 U/kg de fitasa mutante U
- 14. Igual que 1 + 500 U/kg de fitasa AppA
- 15. Igual que 1 + 500 U/kg de fitasa AppA2

La fitasa Ronozyme® (Roche) es una fitasa expresada en hongos. El mutante U es el mutante dirigido al sitio de AppA descrito anteriormente. Las tablas se marcan tal como se describe en el ejemplo 8. Se midieron los efectos *in vivo* de la complementación con fitasa descrita en el ejemplo 8 y los resultados fueron los siguientes:

Aumento de peso (g/p)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
R1	287	295	318	269	295	271	301	305	304	317	256	324	340	319	343
R2	271	291	342	288	297	282	313	295	323	327	231	289	349	325	342
R3	268	302	326	286	278	267	298	309	308	327	274	332	337	348	336
R4	256	282	317	255	304	280	294	295	289	310	287	310	338	324	330
R5	215	279	310	292	270	290	302	270	295	306	284	316	329	319	331
Media	259	290	323	278	289	278	302	295	304	317	266	314	339	327	336
g/p/d	18,5	20,7	23,1	19,9	20,6	19,9	21,6	21,1	21,7	22,6	19,0	22,4	24,2	23,4	24,0

EEM agrupado = 6

20 LSD = 18

Ingesta de pienso (g/p)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
R1	463	450	489	428	450	435	466	479	445	489	422	500	487	483	503
R2	424	439	565	443	427	454	470	469	490	489	394	459	518	459	519
R3	425	446	526	444	417	425	444	480	483	485	427	522	496	520	535
R4	406	437	472	398	450	437	462	442	425	505	439	478	499	496	491
R5	381	443	478	421	423	438	447	423	455	452	437	463	496	476	519
Media	420	443	506	427	433	438	458	459	460	484	424	484	499	487	513
g/p/d	30,0	31,6	36,1	30,5	30,9	31,3	32,7	32,8	32,9	34,6	30,3	34,6	35,6	34,8	36,6

EEM agrupado = 10

LSD = 27

25

Aumento/pienso (g/kg)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
R1	620	656	650	627	655	623	645	636	683	648	605	648	699	661	681
R2	639	662	606	651	696	621	665	629	659	668	587	629	672	709	659

ES 2 597 503 T3

R3	630	677	619	644	666	628	671	644	637	673	641	635	680	669	629
R4	631	645	671	641	675	642	636	668	679	614	654	649	678	652	671
R5	564	630	649	694	639	662	675	639	648	678	649	683	663	669	638
Media	617	654	639	651	666	635	658	643	661	656	627	649	678	672	656

EEM agrupado = 10

LSD = 28

Peso de tibia seco (mg/p)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
R1	970	1010	1146	952	1028	1011	1007	995	1027	1131	---	1150	1169	1160	1234
R2	920	1029	1175	974	937	1047	1013	993	1077	1077	828	995	1251	1130	1209
R3	1038	872	1147	981	932	917	1049	1072	1030	1137	1029	1151	1238	1178	1215
R4	890	944	1125	957	1008	964	1073	1005	961	1100	919	1116	1273	1177	1128
R5	882	970	1078	954	976	1004	961	963	1065	1101	937	1046	1172	1141	1145
Media	940	965	1134	964	976	989	1021	1006	1032	1109	928	1092	1221	1157	1186

5

EEM agrupado = 22

LSD = 61

Ingesta de P complementaria (g)

	1	2	3
R1	0	0,225	0,489
R2	0	0,220	0,565
R3	0	0,223	0,526
R4	0	0,219	0,472
R5	0	0,222	0,478
Media	0 ^c	0,222 ^b	0,506 ^u

10

Cenizas de tibia (mg/p)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
R1	284	333	437	279	303	305	328	324	340	369	---	401	428	453	457
R2	270	318	447	298	290	336	336	325	383	363	226	355	481	441	470
R3	291	271	398	302	278	263	326	357	345	403	293	410	479	420	455
R4	234	305	398	281	314	297	341	317	324	364	264	406	500	447	413
R5	243	327	388	287	279	309	302	305	352	368	279	354	447	424	443
Media	264	311	414	289	293	302	327	326	349	373	266	385	467	437	448

EEM agrupado = 10

LSD = 28

Cenizas de tibia (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
R1	29,30	32,94	38,15	29,25	29,48	30,18	32,55	32,54	33,10	32,60	---	34,90	36,63	39,07	37,06
R2	29,29	30,97	38,03	30,61	30,99	32,06	33,21	32,73	35,51	33,67	27,33	35,66	38,48	39,04	38,89
R3	28,03	31,08	34,70	30,81	29,79	28,71	31,12	33,26	33,45	35,49	28,50	35,63	38,73	35,63	37,48
R4	26,30	32,33	35,34	29,35	31,17	30,80	31,73	31,55	33,71	33,11	28,74	36,38	39,29	38,00	36,63
R5	27,52	33,76	35,98	30,13	28,60	30,81	31,44	31,67	33,09	33,41	29,77	33,81	38,14	37,18	38,70
Media	28,09	32,21	36,44	30,03	30,00	30,51	32,01	32,35	33,77	33,65	28,58	35,28	38,25	37,78	37,75

15 EEM agrupado = 0,49

LSD = 1,39

Estimaciones de equivalencia de fósforo

ES 2 597 503 T3

Curva patrón de KH_2PO_4 :

Y = cenizas de tibia (mg)

X = ingesta de P complementaria o equivalente (g)

$$Y = 257,1 + 299,0 X$$

$$r^2 = 0,88$$

5 Para actividad fitasa de 500 U/kg

(cálculos de ejemplo usando la media de tratamiento de cenizas de tibia)

	% de P biodisponible
Natuphos®: (293 - 257,1)/299,0 = 0,120 g de P de 433 g de FI =	0,030%
Ronozyme®: (266 - 257,1)/299,0 = 0,030 g de P de 424 g de FI =	0,007%
Mutante U: (467 - 257,1)/299,0 = 0,702 g de P de 499 g de FI =	0,141%
AppA: (437 - 257,1)/299,0 = 0,602 g de P de 487 g de FI =	0,124%
AppA2: (448 - 257,1)/299,0 = 0,638 g de P de 513 g de FI =	0,124%

Resultados de ANOVA (cálculo realizado para cada jaula de cuatro aves; leyenda del tratamiento en la página previa)

10

P biodisponible (%)

	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
R1	0,017	0,034	0,037	0,051	0,047	0,062	0,076	---	0,097	0,117	0,136	0,133
R2	0,031	0,026	0,058	0,057	0,049	0,086	0,072	-0,026	0,071	0,145	0,134	0,137
R3	0,034	0,017	0,005	0,052	0,069	0,061	0,101	0,028	0,098	0,150	0,105	0,124
R4	0,020	0,043	0,030	0,060	0,045	0,053	0,071	0,006	0,104	0,163	0,128	0,106
R5	0,024	0,018	0,040	0,034	0,038	0,071	0,082	0,017	0,070	0,128	0,117	0,120
Media	0,025	0,027	0,034	0,051	0,050	0,066	0,080	0,006	0,088	0,140	0,124	0,124

EEM agrupado = 0,006

LSD = 0,018

Contrastes	Significación (valor de P)
Respuesta lineal a Natuphos® (grupos de tratamiento 5 (tto) 4-10)	0,001
Respuesta cuadrática a Natuphos®	0,208
500 U/kg de Natuphos® (tto 5) frente a 500 U/kg de fitasas expresadas en levadura (tto 13-15)	0,001
500 U/kg de Natuphos® (tto 5) frente a 500 U/kg de Ronozyme® (tto 11)	0,031
500 U/kg de Ronozyme® (tto 11) frente a 500 U/kg de fitasas expresadas en levadura (tto 13-15)	0,001
300 U/kg de mutante U (tto 12) frente a 500 U/kg de mutante U (tto 13)	0,001
500 U/kg de mutante U (tto 12) frente a 500 U/kg de AppA (tto 14)	0,074

500 U/kg de mutante U (tto 12) frente a 500 U/kg de AppA2 (tto 15)

0,074

Regresión lineal múltiple: Y = ceniza de tibia (mg)

X = ingesta de fitasa (U)

$Y = 263,462 + 0,144 (\text{Natuphos}^{\text{®}}) + 0,014 (\text{Ronozyme}^{\text{®}}) + 0,823 (\text{mutante U}) + 0,711 (\text{AppA}) + 0,718 (\text{AppA2})$

$R^2 = 0,93$

Actividad fitasa relativa	Razón (%)	Eq. a 500 U/kg de Natuphos [®]
Ronozyme [®] : $(0,014/0,144)*100 =$	10	50
Mutante U: $(0,823/0,144)*100 =$	572	2860
AppA: $(0,711/0,144)*100 =$	494	2470
AppA2: $(0,718/0,144)*100 =$	499	2495

- 5 A 500 U/kg, las enzimas expresadas en levadura (mutante U, AppA y AppA2) eran más eficaces que Natuphos[®] o Ronozyme[®] (ambas enzimas se expresan en sistemas de expresión fúngicos) en la mejora de las respuestas *in vivo* sometidas a prueba. Por ejemplo, el mutante U, AppA y AppA2 eran cuatro veces más eficaces que Natuphos[®] en la liberación de fosfato (véase la figura 3).

EJEMPLO 11

10 EFFECTOS *IN VIVO* DE FITASAS EXPRESADAS EN LEVADURA EN POLLOS

El procedimiento fue tal como se describió en el ejemplo 8 excepto porque los pollos tenían un peso inicial promedio de 83 gramos, y los grupos de tratamiento fueron los siguientes:

GRUPOS DE TRATAMIENTO:

1. Dieta basal (el 0,10% de P; el 0,75% de Ca)
- 15 2. Igual que 1 + el 0,05% de P de KH₂PO₄
3. Igual que 1 + el 0,10% de P de KH₂PO₄
4. Igual que 1 + el 0,15% de P de KH₂PO₄
5. Igual que 1 + 500 U/kg de fitasa Natuphos[®] (lote 1)
6. Igual que 1 + 500 U/kg de fitasa Natuphos[®] (lote 2)
- 20 7. Igual que 1 + 1000 U/kg de fitasa Natuphos[®] (lote 2)
8. Igual que 1 + 500 U/kg de fitasa Ronozyme[®] (lote 1)
9. Igual que 1 + 500 U/kg de fitasa Ronozyme[®] (lote 2)
10. Igual que 1 + 1000 U/kg de fitasa Ronozyme[®] (lote 2)
11. Igual que 1 + 500 U/kg de fitasa mutante U
- 25 12. Igual que 1 + 500 U/kg de fitasa AppA
13. Igual que 1 + 500 U/kg de fitasa AppA2

ES 2 597 503 T3

14. Igual que 1 + 500 U/kg de AppA2 + fitasa con promotor novedoso (AppA2/p)

Las tablas son tal como se marca en el ejemplo 8. Se midieron los efectos *in vivo* de la complementación con fitasa descrita en el ejemplo 8 y los resultados fueron los siguientes:

Aumento de peso (g/p)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14
R1	152	252	295	299	215	235	241	223	256	254	325	308	322	314
R2	199	238	290	332	206	210	256	237	212	243	312	316	309	306
R3	163	257	297	347	235	254	250	215	218	246	324	309	313	335
R4	176	262	288	330	242	250	288	228	195	223	329	318	310	317
R5	190	257	295	356	193	230	288	218	214	259	306	307	314	317
Media	176	253	293	333	218	236	265	224	219	245	319	312	314	318
g/p/d	12,6	18,1	20,9	23,8	15,6	16,9	18,9	16,0	15,6	17,5	22,8	22,3	22,4	22,7

5 EEM agrupado = 7

LSD = 19

Ingesta de pienso (g/p)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14
R1	279	373	431	424	347	386	352	359	284	321	435	429	447	424
R2	335	352	407	441	333	340	375	363	325	368	395	441	427	465
R3	291	374	419	472	369	400	381	330	348	367	439	459	440	472
R4	292	386	400	457	366	370	405	358	328	356	451	473	421	441
R5	344	374	427	483	341	370	450	336	344	394	425	420	449	445
Media	308	372	417	455	351	373	393	349	326	361	429	444	437	449
g/p/d	22,0	26,6	29,8	32,5	25,1	26,6	28,1	24,9	23,3	25,8	30,6	31,7	31,2	32,1

EEM agrupado = 10

LSD = 28

10

Aumento/pienso (g/kg)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14
R1	544	674	684	705	618	608	684	621	676	793	747	718	719	742
R2	593	676	713	752	617	616	682	653	651	659	790	716	722	657
R3	558	686	709	736	636	635	656	650	626	671	737	673	713	708
R4	601	680	720	723	662	677	711	637	594	627	729	673	737	719
R5	551	685	690	737	565	622	641	649	624	658	721	732	700	712
Media	569	680	703	731	620	632	675	642	634	682	745	702	718	708

EEM agrupado = 13

LSD = 37

ES 2 597 503 T3

Peso de tibia seco (mg/p)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
R1	671	886	1048	1002	919	840	912	825	891	831	1117	1041	1057	1091
R2	815	---	1003	1298	752	765	906	865	756	916	1113	1152	1041	1070
R3	730	884	1036	1296	849	942	937	864	849	816	1154	1017	1130	1220
R4	698	911	931	1232	802	901	918	837	807	872	1163	1165	1047	1078
R5	773	929	1037	1266	793	845	867	768	825	962	1044	1054	1130	1140
Media	737	903	1011	1219	823	859	908	832	826	879	1118	1086	1081	1120

EEM agrupado = 27

LSD = 77

Ingesta de P complementaria (g)

	1	2	3	4
R1	0	0,187	0,431	0,636
R2	0	0,176	0,407	0,661
R3	0	0,187	0,419	0,708
R4	0	0,193	0,400	0,685
R5	0	0,187	0,427	0,724
Media	0 ^d	0,186 ^c	0,417 ^b	0,683 ^a

5

Cenizas de tibia (mg/p)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
R1	174	255	381	367	254	230	246	239	253	224	415	385	404	411
R2	197	279	343	483	199	198	244	242	200	249	395	425	357	353
R3	185	279	361	486	238	261	276	230	228	231	410	370	389	454
R4	175	287	315	459	220	262	282	222	210	244	416	455	371	396
R5	183	261	335	481	211	229	264	202	222	262	383	380	406	431
Media	183	272	347	455	224	236	262	227	223	242	404	403	385	409

EEM agrupado = 12

LSD = 32

Cenizas de tibia (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
R1	25,88	28,82	36,31	36,67	27,60	27,39	26,91	29,01	28,42	26,99	37,15	37,03	38,24	37,64
R2	24,20	---	34,21	37,18	26,51	25,89	26,86	27,97	26,44	27,16	35,49	36,90	34,33	32,98
R3	25,43	31,61	34,87	37,53	28,06	27,75	29,52	26,65	26,85	28,35	35,54	36,34	34,40	37,22
R4	25,04	31,53	33,85	37,22	27,42	29,15	30,73	26,46	26,03	27,97	35,76	39,09	35,43	36,71
R5	23,72	28,11	32,27	38,02	26,61	27,17	30,41	26,26	26,88	27,22	36,67	36,02	35,99	37,80
Media	24,85	30,02	34,30	37,32	27,24	27,47	28,89	27,27	26,92	27,54	36,12	37,08	35,68	36,47

EEM agrupado = 0,57

ES 2 597 503 T3

LSD = 1,61

Estimaciones de equivalencia de fósforo

Curva patrón de KH_2PO_4 : Y = cenizas de tibia (mg)

X = ingesta de P complementaria o equivalente (g)

5 $Y = 187,9 + 393,4 X$

$r^2 = 0,95$

Para actividad de fitasa de 500 U/kg

(cálculos de ejemplo usando medias de tratamiento de cenizas de tibia)

	% de P biodisponible
Natuphos® 1: (224 - 187,9)/393,4 = 0,092 g de P de 351 g de FI =	0,026%
Natuphos® 2: (236 - 187,9)/393,4 = 0,122 g de P de 373 g de FI =	0,033%
Ronozyme® 1: (227 - 187,9)/393,4 = 0,099 g de P de 349 g de FI =	0,028%
Ronozyme® 2: (223 - 187,9)/393,4 = 0,089 g de P de 326 g de FI =	0,027%
Mutante U: (404 - 187,9)/393,4 = 0,549 g de P de 429 g de FI =	0,128%
AppA: (403 - 187,9)/393,4 = 0,547 g de P de 444 g de FI =	0,123%
AppA2: (385 - 187,9)/393,4 = 0,501 g de P de 437 g de FI =	0,115%
AppA2/p: (409 - 187,9)/393,4 = 0,562 g de P de 449 g de FI =	0,125%

Resultados de ANOVA (cálculo realizado para cada jaula de cuatro aves; leyenda del tratamiento en la página
10 previa)

P biodisponible (%)

	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
R1	0,048	0,028	0,042	0,036	0,058	0,029	0,133	0,117	0,123	0,138
R2	0,008	0,008	0,038	0,038	0,009	0,042	0,133	0,137	0,101	0,090
R3	0,35	0,047	0,059	0,032	0,029	0,030	0,129	0,101	0,116	0,143
R4	0,022	0,051	0,059	0,024	0,017	0,040	0,129	0,144	0,111	0,120
R5	0,017	0,028	0,043	0,011	0,025	0,048	0,117	0,116	0,123	0,139
Media	0,026 ^{ab}	0,032 ^{bc}	0,048 ^d	0,028 ^c	0,028 ^c	0,038 ^{bc}	0,128 ^a	0,123 ^a	0,115 ^a	0,125 ^a

EEM agrupado = 0,006

LSD = 0,018

15 A 500 U/kg, las enzimas expresadas en levadura (mutante U, AppA, AppA2 y AppA2/p) eran más eficaces que Natuphos® o Ronozyme® en la mejora de las respuestas *in vivo* sometidas a prueba incluyendo aumento de peso, razón de pienso con respecto a aumento de peso, masa ósea y contenido en mineral, y porcentaje de fosfato biodisponible. Las enzimas expresadas en levadura eran aproximadamente cuatro veces más eficaces en el aumento del nivel de fosfato biodisponible que cualquiera de las enzimas expresadas en hongos.

EJEMPLO 12

EFFECTOS *IN VIVO* DE FITASAS EXPRESADAS EN LEVADURA ALIMENTADAS A GALLINAS PONEDORAS TRAS EL DESPLUME

El procedimiento fue tal como se describió en el ejemplo 8 excepto porque se sometieron a prueba gallinas ponedoras tras el desplume, se determinó la producción de huevos y el peso del huevo, y los grupos de tratamiento y la dieta basal fueron los siguientes:

Tratamientos:

1. Dieta basal de harina de maíz-soja deficiente en P (el 0,10% de Pa; el 3,8% de Ca; el 17% de CP)
2. Como 1 + el 0,10% de Pi de KH_2PO_4
3. Como 1 + 150 U/kg de fitasa r-AppA2
- 10 4. Como 1 + 300 U/kg de fitasa r-AppA2
5. Como 1 + 10.000 U/kg de fitasa r-AppA2

Dieta basal: Componente	%
Maíz	63,65
Harina de soja, sin cáscara	25,65
Caliza, molida	9,80
Sal	0,40
Premezcla de minerales	0,20
Premezcla de vitaminas	0,15
DL-metionina, calidad para alimentación	0,10
Cloruro de colina	0,05

**Nota: El tratamiento 1 se interrumpió tras la semana 4 debido a una producción de huevos por debajo del 50%.

Las siguientes tablas se marcan tal como se describe en el ejemplo 8 y se midieron algunas de las mismas respuestas tal como se describe en el ejemplo 8. Los resultados muestran que AppA2 aumenta la producción de huevos y el peso del huevo en gallinas ponedoras tras el desplume.

Tratamientos:

1. Dieta basal de harina de maíz-soja deficiente en P (el 0,10% de pa; el 3,8% de Ca; el 17% de CP)
2. Como 1 + el 0,10% de Pi de KH_2PO_4
3. Como 1 + 150 U/kg de fitasa r-AppA2
- 20 4. Como 1 + 300 U/kg de fitasa r-AppA2
5. Como 1 + 10.000 U/kg de fitasa r-AppA2

Pesos corporales iniciales (g; media de 12 gallinas)

	T1	T2	T3	T4	T5
R1	1699	1792	1682	1790	1707

ES 2 597 503 T3

R2	1785	1698	1734	1855	1694
R3	1690	1665	1775	1724	1824
R4	1688	1745	1739	1823	1760
media	1716	1725	1733	1798	1746

EEM agrupado = 26

LSD = 78

Pesos corporales de 4 semanas (g: media de 12 gallinas)

	T1	T2	T3	T4	T5
R1	1566	1802	1763	1769	1748
R2	1558	1734	1816	1860	1723
R3	1633	1707	1744	1769	1850
R4	1615	1749	1762	1827	1757
media	1593	1748	1771	1806	1770

EEM agrupado = 21

5 LSD = 64

Pesos corporales de 12 semanas (g: media de 12 gallinas)

	T1	T2	T3	T4	T5
R1	--	1876	1831	1792	1781
R2	--	1791	1775	1856	1791
R3	--	1800	1765	1806	1933
R4	--	1853	1814	1876	1815
media	--	1830	1796	1833	1830

EEM agrupado = 24

LSD = 74

Tratamientos:

- 10
1. Dieta basal de harina de maíz-soja deficiente en P (el 0,10% de pa; el 3,8% de Ca; el 17% de CP)
 2. Como 1 + el 0,10% de Pi de KH_2PO_4
 3. Como 1 + 150 U/kg de fitasa r-AppA2
 4. Como 1 + 300 U/kg de fitasa r-AppA2
 5. Como 1 + 10.000 U/kg de fitasa r-AppA2

15

Ingesta de pienso (g/gallina/d)¹

	T1	T2	T3	T4	T5
R1	89	118	122	115	116

ES 2 597 503 T3

R2	92	125	114	122	119
R3	89	117	118	116	124
R4	94	123	119	115	123
media	91 ^b	121 ^a	118 ^a	117 ^a	121 ^a

EEM agrupado = 2

LSD = 5

¹ Las medias son la ingesta de pienso diaria promedio de las gallinas durante el periodo de las primeras 4 semanas para el tratamiento 1, y durante el periodo completo de 12 semanas para los tratamientos 2-5.

5

Pesos de los huevos (g)¹

	T1	T2	T3	T4	T5
R1	57,5	64,0	65,4	65,7	64,5
R2	63,5	64,7	64,3	66,0	65,5
R3	60,3	64,3	64,6	64,8	65,6
R4	62,8	63,3	62,2	65,3	63,7
media	61,0 ^b	64,1 ^a	64,1 ^a	65,5 ^a	64,8 ^a

EEM agrupado = 0,7

LSD = 2,2

¹ Las medias son los pesos promedio de los huevos de gallinas durante el periodo de las primeras 4 semanas para el tratamiento 1, y durante el periodo completo de 12 semanas para los tratamientos 2-5.

10 Tratamientos:

1. Dieta basal de harina de maíz-soja deficiente en P (el 0,10% de pa; el 3,8% de Ca; el 17% de CP)

2. Como 1 + el 0,10% de Pi de KH₂PO₄

3. Como 1 + 150 U/kg de fitasa r-AppA2

4. Como 1 + 300 U/kg de fitasa r-AppA2

15 5. Como 1 + 10.000 U/kg de fitasa r-AppA2

Producción de huevos por semana (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D1	75,3	55,7	36,0	22,9	--	--	--	--	--	--	--	--
D2	88,4	90,8	88,1	87,8	88,4	85,4	86,0	81,8	80,4	79,8	80,7	78,3
D3	84,5	85,1	83,3	85,1	83,3	82,1	83,6	79,2	77,4	77,4	79,5	76,5
D4	86,6	86,3	83,9	82,4	82,1	84,5	81,5	77,4	78,0	74,7	73,8	72,0
D5	82,4	83,3	83,6	84,8	80,7	81,3	82,7	78,6	80,1	78,9	76,8	72,6
EEM	3,0	3,2	3,4	3,5	3,3	3,2	3,2	4,1	3,4	4,5	3,5	3,9

Producción de huevos (%)¹

ES 2 597 503 T3

	T1	T2	T3	T4	T5
R1	44,6	86,5	73,0	81,0	80,7
R2	60,1	85,7	78,1	81,7	74,7
R3	43,2	87,2	84,3	83,9	87,8
R4	42,0	80,9	90,8	74,6	85,3
media	47,5	85,1	81,6	80,3	82,1
Medias ² de mínimos cuadrados	53,8 ^b	81,2 ^a	80,7 ^a	77,8 ^a	82,9 ^a

EEM agrupado = 2,1

¹ Las medias son la producción promedio de huevos de gallinas durante el periodo de las primeras 4 semanas para el tratamiento 1, y durante el periodo completo de 12 semanas para los tratamientos 2-5.

² Debido a la variación en la producción de huevos en la semana 1 (anteriormente), se usó la covarianza para analizar la producción global de huevos, mostrando las medias de mínimos cuadrados el efecto de la covariable.

EJEMPLO 15

EFFECTOS *IN VIVO* DE FITASAS EXPRESADAS EN LEVADURA ALIMENTADAS A POLLOS

El procedimiento para los estudios resumidos en las siguientes tablas fue tal como se describió en el ejemplo 8. Los grupos de tratamiento se muestran en cada tabla y las composiciones de dieta basal se muestran en la siguiente tabla (véase a continuación). Los resultados muestran que AppA2 (ECP) es tan eficaz como el fosfato en la mejora de la razón de aumento/pienso y en el aumento de la masa ósea y el contenido mineral. Los resultados también muestran que AppA2 es más eficaz que Natuphos® y Ronozyme® en el aumento del fosfato biodisponible. Además, los resultados muestran que AppA2 aumenta el peso del huevo y la producción de huevos en gallinas ponedoras tan eficazmente como el fosfato.

15 Composición en porcentaje de dietas (como base alimentada).

Componente	Ensayos en pollos
Harina de maíz	hasta 100
Maíz	50,89
Harina de soja, sin cáscara	39,69
Aceite de soja	5,00
Caliza, molida	1,67
Sal	0,40
Fosfato de dicalcio	-
Premezcla de oligoelementos	0,15 ^a
Premezcla de vitaminas	0,20 ^c
Cloruro de colina (60%)	0,20
Premezcla de antibióticos	0,05 ^c
Sulfato de cobre	-
L-Lisina HCl, calidad para alimentación	-
L-Treonina, calidad para alimentación	-
DL-Metionina, calidad para alimentación	0,20

ES 2 597 503 T3

Composición química	
Proteína en bruto, % ⁿ	22,6
Fósforo total, % ⁿ	0,42
Fósforo disponible, % ^l	0,10
Calcio, % ^l	0,75
ME, kcal/kg ^l	3123

^a Suministrado lo siguiente por kilogramo de dieta completa: Fe, 75 mg (FeSO₄H₂O); Zn, 100 mg (ZnO); Mn, 75 mg (MnO); Cu, 8 mg (CuSO₄H₂O); I, 0,35 mg (CaI₂); Se, 0,3 mg (Na₂SeO₃); NaCl, 3 g.

^b Suministrado lo siguiente por kilogramo de dieta completa: Fe, 90 mg (FeSO₄H₂O); Zn, 100 mg (ZnO); Mn, 20 mg (MnO); Cu, 8 mg (CuSO₄H₂O); I, 0,35 mg (CaI₂); Se, 0,3 mg (Na₂SeO₃); NaCl, 3 g.

5 ^c Suministrado lo siguiente por kilogramo de dieta completa: acetato de retinilo, 1,514 µg; colecalciferol, 25 µg; acetato de DL-α-tocoferilo, 11 mg; complejo de bisulfito de sodio-menadiona, 2,3 mg; niacina, 22 mg; D-Ca-pantotenato, 10 mg; riboflavina, 4,4 mg; vitamina B₁₂, 11 µg.

^d Suministrado lo siguiente por kilogramo de dieta completa; acetato de retinilo, 2,273 µg; colecalciferol, 16,5 µg; acetato de DL-α-tocoferilo, 88 mg; menadiona, 4,4 mg (complejo de bisulfito de sodio-menadiona); niacina, 33 mg; D-Ca-pantotenato, 24,2 mg; riboflavina, 8,8 mg; vitamina B₁₂, 35 µg; cloruro de colina, 319 mg.

^e Proporcionados 50 mg de bacitracina por kilogramo de dieta completa.

^f Proporcionados 55 mg de mecadox por kilogramo de dieta completa.

^g Proporcionados 38 mg de roxarsona por kilogramo de dieta completa.

^h Analizado (AOAC, 1999).

15 ⁱ Calculado (NRC, 1994; NRC, 1998).

Valoración de biodisponibilidad de fósforo relativa en pollos afectados por dos enzimas fitasa diferentes (ensayo en pollos 1)^a.

Dieta	Aumento de peso, g	Aumento/pienso, g/kg	Cenizas de tibia		P biodisponible, %
			%	mg	
1. Dieta basal	259 ^e	617 ^d	28,1 ^f	264 ^f	-
2. Como 1 + el 0,05% de P _i (KH ₂ PO ₄)	290 ^d	654 ^c	32,2 ^d	311 ^e	-
3. Como 1 + el 0,10% de P _i (KH ₂ PO ₄)	323 ^c	639 ^{cd}	36,4 ^c	414 ^d	-
4. Como 1 + 500 FTU/kg de Natuphos®	289 ^d	666 ^c	30,0 ^c	293 ^c	0,027 ^d
5. Como 1 + 500 FTU/kg de ECP	346 ^c	656 ^c	37,8 ^c	448 ^c	0,124 ^c
EEM agrupado	6	10	0,5	10	0,006

^a Los valores son medias de cinco jaulas de cuatro pollos macho alimentados con las dietas experimentales durante el periodo de 8 a 22 d tras la eclosión; el peso inicial promedio fue de 91 g.

ES 2 597 503 T3

^b La regresión lineal de cenizas de tibia (mg) para las dietas 1 a 3 como función de la ingesta de P complementaria (g) fue $Y = 257,1 \pm 9,8 + 299,0 \pm 30,7 X$ ($r^2 = 0,88$); las concentraciones de P biodisponible (rendimientos de P equivalentes) para las dietas 4 y 5 se determinaron calculando la ingesta de P biodisponible equivalente (g) a partir de la curva patrón, dividiendo esto entre la ingesta de pienso (g) y multiplicando por 100.

5 ^{c,d,e,f} Las medias dentro de una columna con distintos superíndices son diferentes, $P < 0,05$.

Biodisponibilidad de fósforo relativa en pollos alimentados con enzimas fitasa diferentes (ensayo en pollos 2)^a.

Dieta	Aumento de peso, g	Aumento/pienso, g/kg	Cenizas de tibia		P biodisponible, %
			%	mg	
1. Dieta basal	176 ^k	569 ^k	24,9 ^k	183 ^k	-
2. Como 1 + el 0,05% de P _i (KH ₂ PO ₄)	253 ^h	680 ⁿ	30,0 ⁿ	272 ⁿ	-
3. Como 1 + el 0,10% de P _i (KH ₂ PO ₄)	293 ^g	703 ^{gn}	34,3 ^g	347 ^g	-
4. Como 1 + el 0,15% de P _i (KH ₂ PO ₄)	333 ^f	731 ^{ei}	37,3 ^e	455 ^e	-
5. Como 1 + 500 FTU/kg de Natuphos ^{®c}	218 ^j	620 ^j	27,2 ^j	224 ^j	0,026 ^g
6. Como 1 + 500 FTU/kg de Natuphos ^{®d}	236 ^l	632 ^l	27,5 ^l	236 ^l	0,032 ^g
7. Como 1 + 1.000 FTU/kg de Natuphos ^{®d}	265 ⁱ	675 ^{gn}	28,9 ⁿⁱ	262 ⁿⁱ	0,048 ^f
8. Como 1 + 500 FTU/kg de Ronozyme [®]	219 ^j	634 ^l	26,9 ^j	223 ^j	0,028 ^g
9. Como 1 + 1.000 FTU/kg de Ronozyme [®]	245 ⁱ	682 ^{gn}	27,5 ^l	242 ^{nj}	0,038 ^g
10. como 1 + 500 FTU/k de ECP	318 ^{ei}	708 ^{gn}	36,5 ^{ei}	409 ^f	0,125 ^e
EEM agrupado	7	10	0,6	12	0,006

^a Los valores son medias de cinco jaulas de cuatro pollos macho alimentados con las dietas experimentales durante el periodo de 8 a 22 d tras la eclosión; el peso inicial promedio fue de 83 g.

10 ^b La regresión lineal de cenizas de tibia (mg) para las dietas 1 a 4 como función de la ingesta de P complementaria (g) fue $Y = 187,9 \pm 8,7 + 393,4 \pm 21,2 X$ ($r^2 = 0,95$); las concentraciones de P biodisponible (rendimientos de P equivalentes) para las dietas 4-11 se determinaron calculando la ingesta de P biodisponible equivalente (g) a partir de la curva patrón, dividiendo esto entre la ingesta de pienso (g) de la jaula y multiplicando por 100.

^c La enzima era del mismo lote que se usó para el ensayo en pollos 1.

^d La enzima era de un lote distinto del que se usó para el ensayo en pollos 1.

15 ^{e,f,z,h,i,j,k} Las medias dentro de una columna con distintos superíndices son diferentes, $P < 0,05$.

El efecto del nivel de actividad sobre la eficacia de liberación de fósforo de fitasa de *E. coli* en pollos (ensayo en pollos 3)^a.

ES 2 597 503 T3

Dieta	Aumento de peso, g	Aumento/pienso, g/kg	Cenizas de tibia		P biodisponible, % ^b
			mg		
1. Dieta basal	219 ⁿ	661 ^c	237 ⁱ		–
2. Como 1 + 0,05% de P _i (KH ₂ PO ₄)	283 ^g	692 ^d	299 ^h		–
3. Como 1 + el 0,10% de P _i (KH ₂ PO ₄)	314 ^c	720 ^c	413 ^g		–
4. Como 1 + el 0,15% de P _i (KH ₂ PO ₄)	327 ^{de}	731 ^c	490 ^c		–
5. Como 1 + 500 FTU/kg de ECP	321 ^{dc}	731 ^c	447 ⁱ		0,125 ^c
6. Como 1 + 1.000 FTU/kg de ECP	335 ^{cd}	732 ^c	559 ^d		0,183 ^d
7. Como 1 + 1.500 FTU/kg de ECP	344 ^c	737 ^c	616 ^c		0,211 ^c
8. Como 1 + 500 FTU/kg de Natuphos®	276 ^g	691 ^d	290 ^h		0,037 ⁱ
EEM agrupado	6	10	12		0,005

^a Los valores son medias de cinco jaulas de cuatro pollos macho alimentados con las dietas experimentales durante el periodo de 8 a 22 d tras la eclosión; el peso inicial promedio fue de 97 g.

^b La regresión lineal de cenizas de tibia (mg) para las dietas 1 a 4 como función de la ingesta de P complementaria (g) fue $Y = 232,0 \pm 6,9 + 389,9 \pm 16,7 X$ ($r^2 = 0,97$); las concentraciones de P biodisponible (rendimientos de P equivalentes) para las dietas 5 a 8 se determinaron calculando la ingesta de P biodisponible equivalente (g) de la curva patrón, dividiendo esto entre la ingesta de pienso (g) de la jaula, y multiplicando por 100.

^{c,d,e,f,s,h,i} Las medias dentro de una columna con distintos superíndices son diferentes, $P < 0,05$.

Combinar las fitasas 3 y 6 no produce efectos sinérgicos en la liberación de Pi en pollos alimentados con una dieta de harina de soja y maíz (ensayo en pollos 4)^a.

Dieta	Aumento de peso, g	Aumento/pienso, g/kg	Cenizas de tibia		P biodisponible, % ^b
			%	mg	
1. Dieta basal	137 ^g	610 ^g	25,4 ^g	134 ^h	–
2. Como 1 + el 0,05% de P _i (KH ₂ PO ₄)	191 ^{et}	678 ^{dc}	29,0 ⁱ	198 ^g	–
3. Como 1 + el 0,10% de P _i (KH ₂ PO ₄)	225 ^d	712 ^d	32,8 ^e	253 ^e	–
4. Como 1 + el 0,15% de P _i (KH ₂ PO ₄)	276 ^c	762 ^c	36,3 ^d	339 ^d	–

ES 2 597 503 T3

5. Como 1 + 500 FTU/kg de Natuphos®	192 ^{et}	624 ^{tg}	28,0 ^f	187 ^g	0,041 ^g
6. Como 1 + 500 FTU/kg de Ronozyme®	182 ^f	655 ^{et}	27,7 ^f	188 ^g	0,047 ^{tg}
7. Como 1 + 500 FTU/k de ECP	272 ^c	760 ^c	37,0 ^d	343 ^d	0,153 ^d
8. Como 5 + 6	211 ^{oc}	693 ^{oc}	28,3 ^f	212 ^{tg}	0,064 ^{et}
9. Como 5 + 7	282 ^c	763 ^c	37,8 ^d	360 ^d	0,162 ^d
10. Como 1 + 1.000 FTU/kg de Natuphos®	217 ^d	703 ^d	29,0 ^f	217 ^f	0,067 ^c
11. Como 1 + 1.000 FTU/kg de Ronozyme®	201 ^{oer}	666 ^{et}	27,9 ^f	194 ^{tg}	0,050 ^{etg}
12. Como 1 + 1.000 FTU/kg de ECP	292 ^c	758 ^c	41,1 ^c	433 ^c	0,206 ^c
EEM agrupado	9	15	0,6	10	0,007

^a Los valores son medias de cinco jaulas de cuatro pollos macho alimentados con las dietas experimentales durante el periodo de 8 a 22 d tras la eclosión; el peso inicial promedio fue de 68 g.

^b La regresión lineal de cenizas de tibia (mg) para las dietas 1 a 4 como función de la ingesta de P complementaria (g) fue $Y = 138,6 \pm 4,9 + 371,3 \pm 14,7 X$ ($r^2 = 0,97$); las concentraciones de P biodisponible (rendimientos de P equivalentes) para las dietas 5 a 8 se determinaron calculando la ingesta de P biodisponible equivalente (g) de la curva patrón, dividiendo esto entre la ingesta de pienso (g) de la jaula y multiplicando por 100.

^{c,d,e,f,g} Las medias dentro de una columna con distintos superíndices son diferentes, $P < 0,05$.

Efecto de fitasa de *E. coli* sobre el rendimiento de gallinas ponedoras desde la semana 1-4.^a

Dieta	Peso inicial de gallina, g	Peso de gallina de 4 semanas, g	Ingesta de pienso, g/d	Producción de huevos, % ^b	Peso del huevo, g
1. Dieta basal deficiente en P	1716	1593	90	54,0	61,0
2. Como 1 + el 0,10% de Pi	1725	1748	122	84,8	64,2
3. Como 1 + 150 FTU/kg de ECP	1733	1771	119	83,7	63,8
4. Como 1 + 300 FTU/kg de ECP	1798	1806	119	82,3	65,4
5. Como 1 + 10.000 FTU/kg de ECP	1746	1770	123	85,9	65,1
EEM agrupado	26	21 ^c	2 ^c	1,6 ^c	0,7 ^c

^a Los datos son medias de cuatro réplicas de 12 gallinas para las 4 primeras semanas del periodo de estudio.

ES 2 597 503 T3

^b La producción de huevos (%) se analizó usando la covarianza; los datos presentados son medias de mínimos cuadrados.

^c Dieta 1 frente a dietas 2-5, P <0,01.

Efecto de fitasa de *E. coli* sobre el rendimiento de gallinas ponedoras desde la semana 5-12^a.

Dieta	Peso de gallina de 4 semanas, g	Ingesta de pienso, g/d	Producción de huevos, % ^b	Peso del huevo, g
2. Como 1 + el 0,10% de Pi	1830	120	80,5	64,0
3. Como 1 + 150 FTU/kg de ECP	1796	118	80,6	64,1
4. Como 1 + 300 FFU/kg ECP	1833	116	77,2	65,5
5. Como 1 + 10.000 FTU/kg de ECP	1830	120	81,2	64,8
EEM agrupado	24	2	2,5	0,5c

5 ^a Los datos son medias de cuatro réplicas de 12 gallinas desde las semanas 5 hasta la 12 del periodo de estudio. La dieta 1 se eliminó del estudio debido a una producción de huevos escasa.

^b La producción de huevos (%) se analizó usando la covarianza; los datos presentados son medias de mínimos cuadrados.

^c Dieta 3 frente a dietas 4 y 5, P <0,01.

10

Efecto de fitasa de *E. coli* sobre el rendimiento de gallinas ponedoras desde la semana 1-12^a.

Dieta	Pesos de gallina			Ingesta de pienso, g/d	Producción de huevos, % ^b	Peso del huevo, g
	Inicial	4 semanas	12 semanas			
1. Dieta basal deficiente en P	1716	1593	-	90	53,8	61,0
2. Como 1 + el 0,10% de Pi	1725	1748	1830	121	81,2	64,1
3. Como 1 + 150 FTU/kg de ECP	1733	1771	1796	118	80,7	64,1
4. Como 1 + 300 FTU/kg de ECP	1798	1806	1833	117	77,8	65,5
5. Como 1 + 10.000 FTU/kg de ECP	1746	1770	1830	121	82,9	64,8
EEM agrupado	26	21 ^c	24	2 ^c	2,1 ^c	0,7 ^c

^a Los datos son medias de cuatro réplicas de 12 gallinas. Los datos son medias para las 4 primeras semanas para la dieta 1, pero para todas las 12 semanas para las dietas 2-5.

^b La producción de huevos (%) se analizó usando la covarianza; los datos presentados son medias de mínimos cuadrados.

^c Dieta 1 frente a dietas 2-5, $P < 0,01$.

Lista de secuencias

<110> Phytex, L.L.C.

5 <120> PIENSO PARA ANIMALES QUE CONTIENE FITASA Y MÉTODO

<130> Documento EP72663HV015pau

<140> no asignado aún

10 <141> adjunto

<150> Documento EP 02 802 504.7

<151> 31-10-2002

15 <150> Documento PCT/US02/34963

<151> 31-10-2002

<150> Documento US 60/335303

<151> 31-10-2002

20 <160> 14

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

25 <211> 1489

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<220>

30 <221> primer_bind

<222> (1)..(22)

<220>

35 <221> primer_bind

<222> (1468)..(1489)

<220>

<221> CDS

<222> (16)..(108)

40 <220>

<221> CDS

<222> (182)..(1480)

<400> 1

ES 2 597 503 T3

taaggagcag aaaca atg tgg tat ttc ctt tgg ttc gtc ggc att ttg ttg	51
Met Trp Tyr Phe Leu Trp Phe Val Gly Ile Leu Leu	
1 5 10	
atg tgt tcg ctc tcc acc ctt gtg ttg gta tgg ctg gac ccg cga ttg	99
Met Cys Ser Leu Ser Thr Leu Val Leu Val Trp Leu Asp Pro Arg Leu	
15 20 25	
aaa agt taa cgaacgtaag cctgatccgg cgcattagcg tcgatcaggc	148
Lys Ser	
30	
aataatatcg gatatcaaag cggaacata tcg atg aaa gcg atc tta atc cca	202
Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro	
35	
ttt tta tct ctt ttg att ccg tta acc ccg caa tct gca ttc gct cag	250
Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr Pro Gln Ser Ala Phe Ala Gln	
40 45 50	
agt gag ccg gag ctg aag ctg gaa agt gtg gtg att gtc agc cgt cat	298
Ser Glu Pro Gly Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser Arg His	
55 60 65	
ggg gtg cgt gcc cca acc aag gcc acg caa ctg atg cag gat gtc acc	346
Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met Gln Asp Val Thr	
70 75 80 85	
cca gac gca tgg cca acc tgg ccg gta aaa ctg ggt tgg ctg aca cca	394

ES 2 597 503 T3

tgg cgt cgg cta agc gat aac agc cag tgg att cag gtt tcg ctg gtc 1306
 Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser Leu Val 405
 390 395 400

ttc cag act tta cag cag atg cgt gat aaa acg ccg cta tca tta aat 1354
 Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn 420
 410 415

acg ccg ccc gga gag gtg aaa ctg acc ctg gca gga tgt gaa gag cga 1402
 Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg 435
 425 430

aat gcg cag ggc atg tgt tcg ttg gcc ggt ttt acg caa atc gtg aat 1450
 Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn 450
 440 445

gaa gcg cgc ata ccg gcg tgc agt ttg taa tggtacccc 1489
 Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu 460

<210> 2
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 2
 Met Trp Tyr Phe Leu Trp Phe Val Gly Ile Leu Leu Met Cys Ser Leu
 1 5 10 15

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

10

<210> 3
 <211> 432
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

15

<400> 3
 Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 597 503 T3

Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala
 145 150 155 160
 Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp
 165 170 175
 Phe Thr Gly His Arg Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu
 180 185 190
 Asn Phe Ser Gln Leu Asn Leu Cys Leu Asn Arg Glu Lys Gln Asp Glu
 195 200 205
 Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala
 210 215 220
 Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr
 225 230 235 240
 Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp
 245 250 255
 Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His
 260 265 270
 Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser
 275 280 285
 Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Met Ala Ala Leu Thr Pro His
 290 295 300
 Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu
 305 310 315 320
 Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu
 325 330 335
 Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly
 340 345 350
 Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln
 355 360 365
 Trp Ile Gln Val Ser Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp
 370 375 380
 Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr
 385 390 395 400
 Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala
 405 410 415
 Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
 420 425 430

<210> 4
 <211> 1486
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

<220>
 <221> CDS

5

ES 2 597 503 T3

<222> (188)..(1483)

<400> 4

taaggagcag aaacaatgtg gtatttactt tggttcgtcg gcattttggt gatgtgttcg	60
ctctccaccc ttgtgttggg atggctggac ccgcgattga aaagttaacg aacgtaggcc	120
tgatgcggcg cattagcatc gcatcaggca atcaataatg tcagatatga aaagcggaaa	180
catatcg atg aaa gcg atc tta atc cca ttt tta tct ctt ctg att ccg	229
Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro	
1 5 10	
tta acc ccg caa tct gca ttc gct cag agt gag ccg gag ctg aag ctg	277
Leu Thr Pro Gln Ser Ala Phe Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu	
15 20 25 30	
gaa agt gtg gtg att gtc agc cgt cat ggt gtg cgt gcc cca acc aag	325
Glu Ser Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys	
35 40 45	
gcc acg caa ctg atg cag gat gtc acc cca gac gca tgg cca acc tgg	373
Ala Thr Gln Leu Met Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp	
50 55 60	
ccg gta aaa ctg ggt tgg ctg aca cca cgc ggt ggt gag cta atc gcc	421
Pro Val Lys Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala	
65 70 75	
tat ctc gga cat tac caa cgc cag cgt ctg gtg gcc gac gga ttg ctg	469
Tyr Leu Gly His Tyr Gln Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu	
80 85 90	
gcg aaa aag ggc tgc ccg cag cct ggt cag gtc gcg att att gtc gat	517
Ala Lys Lys Gly Cys Pro Gln Pro Gly Gln Val Ala Ile Ile Val Asp	
95 100 105 110	
gtc gac gag cgt acc cgt aaa aca ggc gaa gcc ttc gcc gcc ggg ctg	565
Val Asp Glu Arg Thr 115 Lys Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu	
120 125	
gca cct gac tgt gca ata acc gta cat acc cag gca gat acg tcc agt	613
Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser	
130 135 140	
ccc gat ccg tta ttt att cct cta aaa act ggc gtt tgc caa ctg gat	661
Pro Asp Pro Leu Phe Ile Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp	
145 150 155	
aac gcg aac gtg act gac gcg atc ctc agc agg gca gga ggg tca att	709
Asn Ala Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile	
160 165 170	
gct gac ttt acc ggg cat cgg caa acg gcg ttt cgc gaa ctg gaa cgg	757
Ala Asp Phe Thr Gly His Arg Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg	
175 180 185 190	
gtg ctt aat ttt ccg caa tca aac ttg aac ctt aaa cgt gag aaa cag	805
Val Leu Asn Phe Pro 195 Gln Ser Asn Leu Asn Leu Lys Arg Glu Lys Gln	
200 205	
aat gaa agc tgt aac tta acg cag gca tta cca tcg gaa ctc aag gtg	853
Asn Glu Ser Cys Asn Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val	
210 215 220	
agc gcc gac aat gtt tca tta acc ggt gcg gta agc ctc gca tca atg	901
Ser Ala Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met	
225 230 235	

ES 2 597 503 T3

ctg acg gaa ata ttt ctc ctg caa caa gca cag gga atg ccg gag ccg 949
 Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro
 240 245 250

ggg tgg gga agg atc act gat tca cac cag tgg aac acc ttg cta agt 997
 Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser
 255 260 265 270

ttg cat aac gcg caa ttt tat tta cta caa cgc acg cca gag gtt gcc 1045
 Leu His Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala
 275 280 285

cgc agt cgc gcc acc ccg tta ttg gat ttg atc aag aca gcg ttg acg 1093
 Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr
 290 300

ccc cat cca ccg caa aaa cag gcg tat ggt gtg aca tta ccc act tca 1141
 Pro His Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser
 305 310 315

gtg ctg ttt att gcc gga cac gat act aat ctg gca aat ctc gcc ggc 1189
 Val Leu Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly
 320 325 330

gca ctg gag ctc aac tgg acg ctt cca ggt cag ccg gat aac acg ccg 1237
 Ala Leu Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro
 335 340 345 350

cca ggt ggt gaa ctg gtg ttt gaa cgc tgg cgt cgg cta agc gat aac 1285
 Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn
 355 360 365

agc cag tgg att cag gtt tcg ctg gtc ttc cag act tta cag cag atg 1333
 Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met
 370 375 380

cgt gat aaa acg ccg cta tca tta aat acg ccg ccc gga gag gtg aaa 1381
 Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys
 385 390 395

ctg acc ctg gca gga tgt gaa gag cga aat gcg cag ggc atg tgt tcg 1429
 Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser
 400 405 410

ttg gcc ggt ttt acg caa atc gtg aat gaa gcg cgc ata ccg gcg tgc 1477
 Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys
 415 420 425 430

agt ttg taa 1486
 Ser Leu

<210> 5
 <211> 432
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 5
 Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr
 1 5 10 15

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

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

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

ES 2 597 503 T3

Lys Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gly His Tyr Gln Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys
 85 90 95
 Lys Gly Cys Pro Gln Pro Gly Gln Val Ala Ile Ile Val Asp Val Asp
 100 105 110
 Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro
 115 120 125
 Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp
 130 135 140
 Pro Leu Phe Ile Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala
 145 150 155 160
 Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp
 165 170 175
 Phe Thr Gly His Arg Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu
 180 185 190
 Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Asn Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asn Glu
 195 200 205
 Ser Cys Asn Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala
 210 215 220
 Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr
 225 230 235 240
 Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp
 245 250 255
 Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His
 260 265 270
 Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser
 275 280 285
 Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His
 290 295 300
 Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu
 305 310 315 320
 Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu
 325 330 335
 Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly
 340 345 350
 Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln
 355 360 365

ES 2 597 503 T3

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

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

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

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

- 5 <210> 6
- <211> 80
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Cebador para amplificar el gen de appA.

- <400> 6
- ggggtaccat gggcgctctct gctgttctac ttcctttgta tctcctgtct ggagtcacct** 60
- ccggacagag tgagccggag** 80

- 15 <210> 7
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Cebador para amplificar el gen de appA.

- <400> 7
- ggaattcat taaaactgc aggc 24

- 25 <210> 8
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 30 <220>
- <223> Cebador para amplificar el gen de appA.

- <400> 8
- ggaattccag agtgagccgg a 21

- 35 <210> 9
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 40 <220>
- <223> Cebador para amplificar el gen de appA.

- <400> 9
- ggggtacctt acaaactgca cg 22

- 45 <210> 10
- <211> 31
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 50 <220>
- <223> Cebador para amplificar appA por amplificación por PCR mutagénica.

ES 2 597 503 T3

Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro
 115 120 125
 Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp
 130 135 140
 Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala
 145 150 155 160
 Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp
 165 170 175
 Phe Thr Gly His Arg Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu
 180 185 190
 Asn Phe Ser Gln Leu Asn Leu Cys Leu Asn Arg Glu Lys Gln Asp Glu
 195 200 205
 Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala
 210 215 220
 Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr
 225 230 235 240
 Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp
 245 250 255
 Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His
 260 265 270
 Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser
 275 280 285
 Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Met Ala Ala Leu Thr Pro His
 290 295 300
 Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu
 305 310 315 320
 Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu
 325 330 335
 Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly
 340 345 350
 Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln
 355 360 365
 Trp Ile Gln Val Ser Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp
 370 375 380
 Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr
 385 390 395 400
 Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala
 405 410 415
 Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
 420 425 430

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de reducción de la razón de pienso con respecto a aumento de peso de un animal monogástrico alimentando al animal con un producto alimenticio en el que el producto alimenticio comprende hexakisfosfato de mio-inositol, comprendiendo el método la etapa de
 5 alimentar al animal con el producto alimenticio en combinación con una fitasa de *E. coli* expresada en levadura, en el que la razón de pienso con respecto a aumento de peso del animal se reduce,
 en el que el animal es una especie aviar.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el animal se alimenta con el producto alimenticio en combinación con menos de 2000 unidades de la fitasa expresada en levadura por kilogramo del producto alimenticio.
3. Método según las reivindicaciones 1 a 2, en el que el animal se alimenta con el producto alimenticio en combinación con desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 2000 unidades de la fitasa expresada en levadura por kilogramo del producto alimenticio.
- 15 4. Método según las reivindicaciones 1 a 2, en el que el animal se alimenta con el producto alimenticio en combinación con menos de 1500 unidades de la fitasa expresada en levadura por kilogramo del producto alimenticio.
- 20 5. Método según las reivindicaciones 1 a 2, en el que el animal se alimenta con el producto alimenticio en combinación con menos de 1200 unidades de la fitasa expresada en levadura por kilogramo del producto alimenticio.
6. Método según las reivindicaciones 1 a 5, en el que la fitasa tiene una actividad óptima a un pH de menos de aproximadamente 4.
- 25 7. Método según las reivindicaciones 1 a 6, en el que la fitasa expresada en levadura se escinde con una proteasa para potenciar la capacidad de la fitasa para reducir la razón de pienso con respecto a aumento de peso del animal en comparación con fitasa expresada en levadura intacta.
8. Método según las reivindicaciones 1 a 7, en el que la levadura se selecciona del grupo que consiste en especies de *Saccharomyces*, especies de *Pichia*, especies de *Kluyveromyces*, especies de *Hansenula* y especies de *Candida*.
- 30 9. Uso de una composición que comprende hexakisfosfato de mio-inositol en combinación con una fitasa de *E. coli* expresada en levadura, para alimentar a una especie aviar para reducir la razón de pienso con respecto a aumento de peso.
10. Uso según la reivindicación 9, en el que el animal se alimenta con el producto alimenticio en combinación con menos de 2000 unidades de la fitasa expresada en levadura por kilogramo del producto alimenticio.
- 35 11. Uso según las reivindicaciones 9 a 10, en el que el animal se alimenta con el producto alimenticio en combinación con desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 2000 unidades de la fitasa expresada en levadura por kilogramo del producto alimenticio.
- 40 12. Uso según las reivindicaciones 9 a 11, en el que la levadura se selecciona del grupo que consiste en especies de *Saccharomyces*, especies de *Pichia*, especies de *Kluyveromyces*, especies de *Hansenula* y especies de *Candida*.

		P.F1																			
1	caadgaacgaaaca	ATG	TGG	TAT	TTC	CTT	TGG	TTC	GTC	GGC	ATT	TTG	TTG	ATG	TGT	TGC	CTC	63			
1		K	W	Y	F	L	W	F	V	G	I	L	L	M	C	S	L	16			
64	TCC	ACC	CTT	GTG	TTG	GTA	TGG	CTG	GAC	CCG	CGA	TTG	AAA	AGT	TAAcgaacgtaagccctgatacggg			128			
17	S	T	L	V	L	V	W	L	D	P	R	L	K	S	*			31			
129	cgcattagcgtcgtatcagcgaataatctcggatcatcaagcgggaacatctcg	ATG	AAA	GCG	ATC	TCA	ATC											201			
1		M	K	A	I	L	I											6			
		P.F2																			
202	CCA	TTT	TTA	TCT	CTT	TTG	ATT	CCG	TTA	ACC	CCG	CAA	TCT	GCA	TTT	GCT	CAG	AGT	GAG	CCG	261
7	P	F	L	S	L	L	I	P	L	T	P	Q	S	A	F	A	Q	S	E	E	26
262	GAG	CTG	AAG	CTG	GAA	AGT	GTG	GTG	ATT	GTC	AGC	CGT	CAT	GGT	GTG	CGT	GCC	CCA	ACC	AAG	321
27	E	L	K	L	E	S	V	V	I	V	S	R	H	G	V	R	A	P	T	K	46
322	GCC	ACG	CAA	CTG	ATG	CAG	GAT	GTC	ACC	CCA	GAC	GCA	TGG	CCA	ACC	TGG	CCG	GTA	AAA	CTG	381
47	A	L	M	Q	D	V	T	P	D	A	W	P	T	W	P	V	K	L			66
382	GGT	TGG	CTG	ACA	CCA	CGC	GGT	GGT	GAG	CTA	ATC	GCC	TAT	CTC	GGA	CAT	TAC	CAA	CGC	CTG	441
67	G	W	L	T	P	R	G	G	E	L	I	A	Y	L	G	H	Y	Q	R	Q	86
442	CGT	CTG	GTG	GCC	GAC	GGA	TTG	CTG	GCG	AAA	AAG	GCG	TGC	CCG	CTG	CCT	GGT	CTG	GTC	GCG	501
87	R	L	V	A	D	G	L	L	A	K	K	G	C	P	Q	P	Q	V	A	106	
502	ATT	ATT	GCT	GAT	GTC	GAC	GAG	CGT	ACC	CGT	AAA	ACA	GGC	GAA	GCC	TTC	GCC	GCC	GGG	CTG	561
107	I	I	A	D	V	D	E	R	T	R	X	T	G	E	A	F	A	A	G	L	126
562	GCA	CCT	GAC	TGT	GCA	ATA	ACC	GTA	CAT	ACC	CAG	GCA	GAT	ACG	TCC	AGT	CCC	GAT	CCG	TCA	621
127	A	P	Q	C	A	I	T	V	H	T	Q	A	D	T	S	S	P	D	P	K	146
622	TTT	AAT	CCT	CTA	AAA	ACT	GGC	GTT	TGC	CAA	CTG	GAT	AAC	GCG	ABC	GTG	ACT	GAC	GCG	ATC	681
147	F	N	P	L	K	T	G	V	C	Q	L	D	N	A	E	V	T	D	A	I	166
682	CTC	AGC	AGG	GCA	GGA	GCG	TCA	ATT	GCT	GAC	TTT	ACC	GGG	CAT	CCG	CAA	ACG	GCG	TTT	CCG	741
167	L	S	R	A	G	G	S	I	A	D	F	T	G	H	R	Q	T	A	F	R	186
742	GAA	CTG	GAA	CCG	GTG	CTT	AAT	TTT	TCC	CAA	TEA	AAC	TTG	TGC	CTT	AAC	CGT	GAG	AAA	CAG	801
187	E	L	E	R	V	L	N	F	S	Q	L	H	L	C	L	N	R	E	K	Q	206
802	GAC	GAA	AGC	TGT	TCA	TTA	ACG	CAG	GCA	TEA	CCA	TGG	GAA	CTC	ARG	GTG	AGC	GCC	GAC	AAT	861
207	D	E	S	C	S	L	T	Q	A	L	P	S	E	L	X	V	S	A	D	E	226
862	GTT	TCA	TTA	ACC	GGT	GCG	GTA	AGC	CTC	GCA	TCA	ATG	CTG	ACG	GAA	ATA	TTT	CTC	CTG	CAA	921
227	V	L	T	G	A	V	S	L	A	S	M	L	T	E	I	F	L	L	Q	Q	246
922	CAA	GCA	CAG	GGA	ATG	CCG	GAG	CCG	GGG	TGG	GGA	AGG	ATC	ACT	GAT	TCA	CAC	CTG	TGG	AAC	981
247	Q	A	Q	G	M	P	E	P	G	W	G	R	I	T	D	S	H	Q	W	N	266
982	ACC	TTG	CTA	AGT	TTG	CAT	AAC	GCG	CAA	TTT	TAT	TEA	CTA	CAA	CCG	ACG	CCA	GAG	GTT	GCC	1041
267	T	L	L	S	L	H	N	A	Q	F	Y	L	L	Q	R	T	P	E	V	A	286
1042	CCG	AGT	CCG	GCC	ACC	CCG	TTA	TTG	GAT	TTG	AIC	ATG	GCA	GCG	TTG	ACG	CCC	CAT	CCA	CCG	1101
287	R	S	R	A	T	P	L	L	D	L	I	M	A	A	L	T	P	H	P	P	306
1102	CAA	AAA	CAG	GCG	TAT	GGT	GTG	ACA	TTA	CCC	ACT	TCA	GTG	CTG	TTT	ATT	GCC	GGA	CAC	GAT	1161
307	Q	K	Q	A	Y	G	V	T	L	P	T	S	V	L	F	I	A	G	H	D	326
1162	ACT	AAT	CTG	GCA	AAT	CTC	GGC	GCG	GCA	CTG	GAG	CTC	AAC	TGG	ACG	CIT	CCA	GGT	CAG	CCG	1221
327	T	N	L	A	N	L	G	A	L	E	L	E	L	E	L	P	G	Q	P	366	
1222	GAT	AAC	ACG	CCG	CCA	GGT	GGT	GAA	CTG	GTG	TTT	GAA	CGC	TGG	CGT	CCG	CTA	AGC	GAT	AAC	1281
347	D	N	T	P	P	G	G	E	L	V	F	E	R	W	R	R	L	S	D	N	366
1282	AGC	CAG	TGG	ATT	CAG	GTT	TGG	CTG	GTC	TTC	CAG	ACT	TTA	CAG	CAG	ATG	CGT	GAT	AAA	ACG	1341
367	S	Q	W	I	Q	V	S	L	V	F	Q	T	L	Q	M	R	D	K	T	386	
1342	CCG	CTA	TCA	TTA	AAT	ACG	CCG	CCC	GGA	GAG	GTG	AAA	CTG	ACC	CTG	GCA	GGA	TGT	GAA	GAG	1401
387	P	L	S	L	N	T	P	P	G	E	V	X	L	T	L	A	G	C	E	E	406
1402	CGA	AAT	GCG	CAG	GCG	ATG	TGT	TGG	GCC	GGT	TTT	ACG	CAA	ATC	GTG	AAT	GAA	GCG	CCG	1461	
407	R	N	A	Q	G	M	C	S	L	A	G	F	T	Q	I	V	N	E	A	R	426
		P.F3																			
1462	ATA	CCG	GCG	TGC	AGT	TTG	TAA	TGGTACCC											1491		
427	I	P	A	C	S	L	*											433			

FIG. 1

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

FIG. 2A

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

FIG. 2B

1 taa gga gca gaa aca atg tgg tat tta ctt tgg ttc gtc gcc att
 46 ttg ttg atg tgt tcc ctc tcc acc ctt gtc ttg gta tgg ctg gac
 91 ccs cga ttg aaa agt t aac gaa cgt agy cct gat gcg gcg cat
 134 tag cat cgc atc agg cca tca ata atg tca gat atg aaa agc gga
 179 aac ata ccg atg aaa gcg atc tta atc cca ttt tta tct ctt ctg
 224 att ccg tta acc ccg caa tct gca ttc gct cag agt gag ccg gag
 259 ctg aag ctg gaa agt gtg gtg att gtc agc cgt cat ggt gtc cgt
 314 gcc cca acc aag gcc acg caa ctg atg cag gat gtc acc cca gac
 359 gca tgg cca acc tgg ccg gta aaa ctg ggt tgg ctg aca cca cgc
 404 ggt ggt gag cta atc gcc tat ctc gga cat tac caa csc cag cgt
 449 ctg gtc gcc gac gca ttg ctg gcg aaa aag ggc tgc ccg cag cct
 494 ggt cag gtc gcg att att gtc gat gtc gac gag cgt acc cgt aaa
 532 aca gcc gaa gcc ttc gcc gcc ggg ctg gca cct gac tgt gca ata
 584 acc gta cat acc cag gca gat acg tcc agt ccc gat ccg tta ttt
 629 att cct cta aaa act gcc gtt tgc caa ctg gat aac gcg aac gtc
 674 act gac gcg atc ctc agc agc gca gga ggg tca att gct gac ttt
 719 acc ggg cat cgg caa acg gcg ttt csc gaa ctg gaa cgg gtc ctt
 764 aat ttt ccg caa tca aac ttg aac ctt aaa cgt gag aaa cag aat
 809 gaa agc tgt aac tta acg cag gca tta cca tcc gaa ctc aag gtc
 854 agc gcc gac aat gtt tca tta acc ggt gcg gta agc ctc gca tca
 899 atg ctg acg gaa ata ttt ctc ctg caa caa gca cag gga atg ccg
 944 gag ccg ggg tgg gga agg atc act gat tca cac cag tgg aac acc
 989 ttg cta agt ttg cat aac gcg caa ttt tat tta cta caa cgc acg

FIG. 2C

1034 CCA GAG GTT GCC CGC AGT CGC GCC ACC CCG TTA TTG GAT TTG ATC
1079 AAG ACA GCG TTG ACG CCC CAT CCA CCG CAA AAT CAG GCG TAT GGT
1124 GTG ACA TTA CCC ACT TCA GTG CTG TTT ATT GCC GGA CAC GAT ACT
1169 AAT CTG GCA AAT CTC GGC GGC GCA CTG GAG CTC AAC TGG ACG CTT
1214 CCA GGT CAG CCG GAT AAC ACG CCG CCA GGT GGT GAA CTG GTG TTT
1259 GAA CGC DGG CGT CCG CTA AGC GAT AAC AGC CAG TGG ATT CAG GTT
1304 TCG CTG GTC TTC CAG ACT TTA CAG CAG ATG CGT GAT AAA ACG CCG
1349 GTA TCA TTA AAT ACG CCG CCC GGA GAG GTG AAA CTG ACC CTG GCA
1394 GGA TGT GAA GAG CCA AAT GCG CAG GGC ATG TGT TCG TTE GCC GGT
1439 TTT ACG CAA ATC GTG AAT GAA GCG CGC ATA CCG GCG TGC AGT TTG
1484 TAA

FIG. 2D

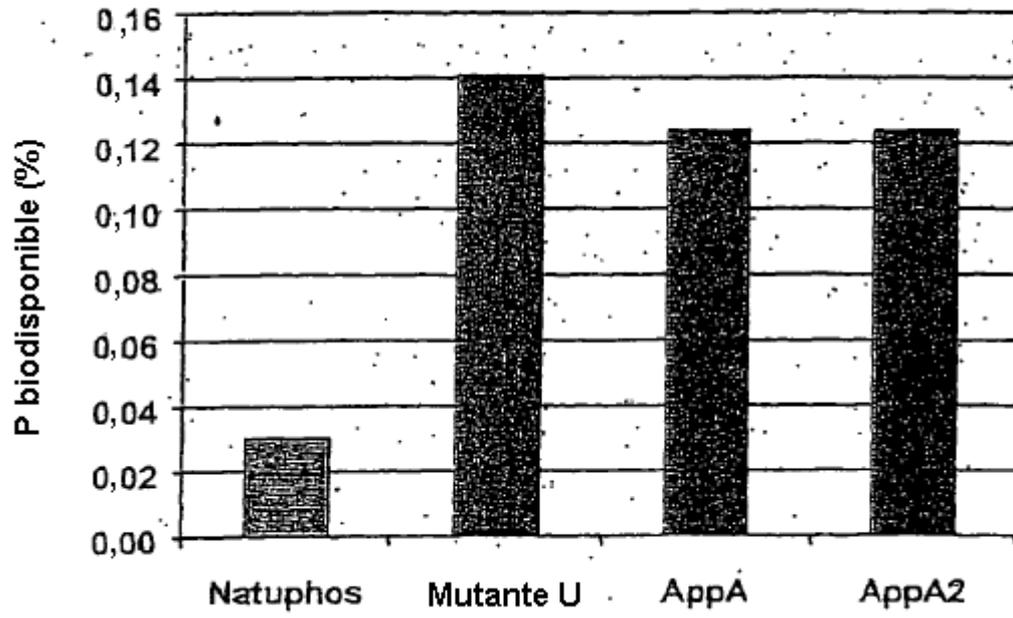


FIG. 3