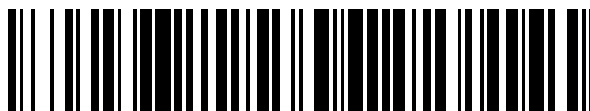


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 795**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

A23K 50/75 (2006.01)

A23K 10/10 (2006.01)

A23K 10/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2011 E 16175939 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 3101126**

54 Título: **Variantes de fitasa termoestables**

30 Prioridad:

26.03.2010 EP 10158026

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

06.05.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 758 795 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de fitasa termoestables

5 Referencia al listado de secuencias

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

10 Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a un método para producir una variante de fitasa a partir de una fitasa progenitora que tiene al menos un 70 % de identidad con los aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 2, los aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 4 y/o los aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 6 cuando se alinean con la secuencia de aminoácidos respectiva utilizando el programa Needle con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización de apertura de gap de 10,0, y una penalización de extensión de gap de 0,5, y comprende establecer al menos un puente disulfuro que no está entre los cuatro puentes disulfuro de origen natural en comparación con estos y otras fitasas estrechamente relacionadas (es decir, es una variante de las mismas). La invención también se refiere a las variantes producidas y al ADN que las codifica, así como su uso, por ejemplo, en piensos para animales y aditivos de pienso.

Antecedentes de la invención

25 Estado de la técnica

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

[0004] Es un objetivo de la presente invención proporcionar polipéptidos alternativos con actividad de fitasa (fitasas) y polinucleótidos que codifican los polipéptidos. Las variantes de fitasa de la invención exhiben propiedades modificadas o alteradas, preferiblemente mejoradas, en comparación con la fitasa progenitora. Ejemplos no limitantes de tales propiedades son: la estabilidad (como la estabilidad frente a ácidos, la estabilidad térmica, la estabilidad de vapor, la estabilidad frente a la granulación y/o la estabilidad de proteasa, en particular estabilidad de pepsina), el perfil de temperatura, el perfil de pH, la actividad específica, la especificidad del sustrato, el rendimiento en piensos para animales (como una liberación y/o degradación de fitato mejoradas), la susceptibilidad a la glicación y/o el patrón de glicosilación.

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

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

50 Buttiauxiella

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

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

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

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

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

[0009] WO 2008/192901 describe fitasas de *Buttiauxella gaviniae* DSM18930, *Buttiauxella agrestis* DSM18931 y *Buttiauxella agrestis* DSM18932 y diversas variantes de las mismas.
Estas fitasas se proporcionan en la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y la SEC ID N° 6 en este documento.

5 [0010] WO2008097619 describe también variantes de fitasa derivadas de la cepa P 1-29 de *Buttiauxella sp* especialmente la variante denominada BP-11 y algunas variantes de la misma.

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

10 [0012] La WO2008/036916 divulga fitasas termotolerantes.

[0013] La WO2007/112739 divulga variantes de fitasa derivadas de *Citrobacter braakii* con termoestabilidad mejorada.

15 [0014] Rodriguez et al (Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol382, No.1., pp105-112, 2000) divulga fitasas sin enlaces de disulfuro a C200/C210 en variantes que modulan la eficiencia y termoestabilidad de la enzima.

20 [0015] Mullaney et al (Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 238, no.2, 11 March 2005, págs. 404-408) divulga la conservación de residuos de cisteína en fitasas de ácido histidina fúngicas de especies *Aspergillus* y el incremento en la estabilidad y tolerancia al calor.

[0016] Mu X et al (New Biotechnology, vol. 25, Supplement 1, September 2009, pág. S86) divulga la eliminación del enlace de disulfuro (C125S, C263S, C395S, C417S, C446S) en fitasa para reducir la termoestabilidad.

25 Breve descripción de los dibujos y listado de secuencias

[0017]

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

35 El alineamiento se hizo utilizando el método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) usando el software MEGALIGN™ de LASERGENE™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización de gap de 10 y penalización de longitud de gap de 10. Los parámetros de alineamiento por parejas son Ktuple=1, penalización de gap=3, ventanas=5 y diagonales=5.

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

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

45 [0018] En el listado de secuencias las secuencias se aplican de la siguiente manera:

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

Resumen de ejemplos

50 [0019] En la especificación se proporcionan los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1: preparación de variantes y determinación de la actividad

Ejemplo 2: actividad específica

Ejemplo 3: termoestabilidad mediante DSC

Ejemplo 4: perfil de temperatura

Ejemplo 5: rendimiento en pienso para animales en un modelo in vitro
 Ejemplo 6: rendimiento en un ensayo en cerdos in vivo

Descripción de la invención

5

[0020] La presente invención se refiere a un método para producir una variante de fitasa, donde

10 a) la variante fitasa tiene al menos un 80 % identidad con los aminoácidos 1-413 de la fitasa progenitora de la SEC ID N° 2, los aminoácidos 1-413 de la fitasa progenitora de la SEC ID N° 4 y/o los aminoácidos 1-413 de la fitasa progenitora de la SEC ID N° 6 cuando se alinean con la secuencia de aminoácidos respectiva utilizando el programa Needle con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización de abertura de gap de 10,0, y una penalización de extensión de gap de 0,5; y

15 b) el método comprende establecer al menos un puente disulfuro en comparación con la SEC ID N° 2, donde el número de puentes disulfuro establecidos es 1, 2 o 3, donde dicho puente disulfuro no está entre los cuatro de origen natural en las posiciones 79/110,135/410,180/189 y 384/393, donde el puente disulfuro se establece en la posición F) 61C/102C;

20 donde los dos puentes disulfuro establecidos usan las siguientes combinaciones de pares de posición: A+F, B+F, C+F, D+F, E+F y F+G, donde A significa 143C/201C, B significa 33C/179C, C significa 54C/101C, D significa 93C/48C, E significa 33C/178C, F significa 61C/102C y G significa 164/251C.;

25 donde los tres puentes disulfuro establecidos usan las siguientes combinaciones de pares de posición: A+B+F, A+C+F, A+D+F, A+E+F, A+F+G, B+C+F, B+D+F, B+E+F, B+F+G, C+D+F, C+E+F, C+F+G, D+E+F, D+F+G y E+F+G, donde A significa 143C/201C, B significa 33C/179C, C significa 54C/101C, D significa 93C/48C, E significa 33C/178C, F significa 61C/102C y G significa 164C/251C y donde la variante tiene termoestabilidad mejorada y/o un perfil de temperatura mejorado en comparación con la fitasa progenitora. El porcentaje de identidad se determina tal y como se describe en la sección "Polipéptidos de fitasa, porcentaje de identidad".

30 [0021] Los números de posición se refieren a la numeración de posición de la SEC ID N° 2, tal y como se describe en la sección "Numeración de posición". Las posiciones que corresponden a estos números de posición de la SEC ID N° 2 en otras fitasas se determinan tal y como se describe en la sección "Identificación de los números de posición correspondientes".

35 [0022] Según el método de la invención, la variante de fitasa puede además comprender al menos una modificación en al menos una posición seleccionada de las siguientes: 1, 9, 10, 18, 22, 25, 26, 37, 38, 66, 71, 81, 89, 92, 94, 109, 111, 119, 120, 121, 131, 134, 141, 142, 144, 152, 155, 160, 164, 171, 176, 178, 188, 190, 192, 193, 206, 207, 209, 211, 214, 215, 219, 222, 239, 235, 243, 245, 248, 253, 255, 256, 257, 260, 261, 268, 270, 277, 283, 285, 287, 288, 293, 296, 303, 306, 307, 308, 314, 318, 328, 337, 345, 350, 364, 371, 372, 396, 399, 406 y/o 413.

40 [0023] La invención además estipula que las modificaciones anteriores son elegidas específicamente de las modificaciones siguientes: 1S, 91, 101, R18, R22, T25, 26E, 37Y, 38S, 66E, 71K, 81A, 89T, 92E, R94,109Q, 111G, 119N, 120L, 121E, K131,134I, 134V, 141R, 142L, T144,152M, 155E, 160R, 164F, 171I, 176K, 178P, 188N, 190E, 192G, 193Q, N206, 207E, 207T, 209S, 211C, 214V, G215, T219, E222, 239K, 235V, E243,245D, 248E, 248L, 248S, H253,255A, 255T, 256H, 256Y, F257; M260,261E, 268A, 268T, 270K, 277T, 283E, 283D, 285K, 287D, 288V, 288A, 293G, 296S, 303L, 303F, H306, D307, T308,314A, 314S, 318D, D328,337I, 345A, 350I, 364A, 371K, 372E, 396P, 399K, 406E y/o 413P.

45 [0024] En otras realizaciones específicas del método de la invención otras modificaciones específicas son: N1S, S1N, I9V, V9I, V10I, K26E, N37Y, T38S, S38T, E66Q, Q66E, K71Q, Q71K, T81A, A81T, A89T, D92E, E109Q, H111G, D119N, I120L, K121E, T134I, T134V, R141Q, Q141R, V142L, L142V, T144I, T152M, M152T, E155D, D155E, H160R, S164F, F164S, T171I, T176K, A178P, S188N, D190E, A192G, G192A, L193Q, K207E, K207T, A209S, D211C, I214V, V214I, A235V, K239N, N239K, E245D, D245E, E248S, E248L, S248L, S248E, A255T, T255A, V255A, V255T, Q256H, Q256Y, A261E, R268A, R268T, A268R, A268T, T268A, T268R, N270K, A277T, T277A, D283N, D283E, E283N, E283D, N283D, N283E, N285K, K285N, D287T, T287D, A288E, A288V, V288E, V288A, E288A, E288V, D293G, P296S, S296P, I303L, I303F, L303F, F303L, L303I, S314A, A314S, N318D, I337V, V337I, S345A, A345S, V350I, I350V, A364S, A364S, S364A, K371N, N371K, E372Q, E372Q, Q372E, P396S, S396P, T399K, K399T, E406V, V406E, P413Q y/o Q413P y/o de las siguientes combinaciones D92E/H160R, A261E/N270K, T134I/K207T, D190E/K207E/N318D, T134I/K207T/A261E/N270K, T134I/K207E/A209S/A261E/N270K, A89T/T134I/F164S/T176K/A178P/K207E/A261E/N270K, A89T/T134I/F164S/T176K/A178P/K207E/A209S/S248L/Q256Y/A261E/N270K, A89T/D92E/H160R/F164S/T176K/A178P/S188N/G192A/K207E/A261E/N270K, D92E/T134I/H160R/F164S/T170I/T176K/A188P/K207E/A235V/Q256H/A261E/N270K, A89T/T134I/H160R/F164S/T170I/T176K/A188P/K207E/A235V/Q256H/A261E/N270K/I303F y/o N37Y/D92E/T134I/H160R/F164S/T171I/T176K/A188P/K207E/A235V/Q256H/A261E/N270K.

65 [0025] El método de la invención se puede utilizar para crear una variante de parte de la parte madura de la fitasa de la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 o la SEC ID N° 6, o una parte madura de cualquiera las siguientes

secuencias de GENESEQP: AEH25051, AEH25056, AEH25057, AEH25058, AEH25059, AEH25060, AEH25061, AEH25062, AEH25063, AEH25064, AEH25065, AEH25066, AEH25067, AEH25068, AEH25069, AEH25070, AEH25071, AEH25072, AEH25073, AEH25074, AEH25075 o AEH25076 que se usa como un progenitor/esqueleto para producir una variante de fitasa.

5

[0026] El método de la invención proporciona una variante de fitasa con termoestabilidad mejorada y/o perfil de temperatura mejorado en comparación con la fitasa progenitora y puede proporcionar propiedades mejoradas tales como estabilidad calorífica, estabilidad de vapor, estabilidad frente a la granulación, estabilidad frente a ácidos, perfil de pH y/o estabilidad de proteasa, en particular estabilidad de pepsina, actividad específica, especificidad de sustrato, rendimiento en piensos para animales (como una liberación y/o degradación de fitato mejoradas), susceptibilidad a la glicación y/o patrón de glicosilación.

10

Las variantes proporcionadas por la invención exhiben propiedades térmicas especialmente mejoradas tales como termoestabilidad, estabilidad térmica, estabilidad de vapor, perfil de temperatura, estabilidad frente a la granulación o rendimiento mejorado en piensos para animales.

15

[0027] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con propiedades térmicas mejoradas, tales como termoestabilidad, estabilidad calorífica, estabilidad de vapor, perfil de temperatura y/o estabilidad frente a la granulación.

20

[0028] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con termoestabilidad mejorada.

[0029] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con estabilidad calorífica mejorada.

25

[0030] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con estabilidad de vapor mejorada.

[0031] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con perfil de temperatura mejorado.

30

[0032] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con estabilidad frente a la granulación mejorada.

35

[0033] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con estabilidad frente a ácidos mejorada.

[0034] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con perfil de pH mejorado.

40

[0035] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con estabilidad de proteasa mejorada, en particular estabilidad de pepsina.

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

45

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

[0038] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con rendimiento mejorado en piensos para animales (como una liberación y/o degradación de fitato mejoradas).

50

[0039] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con susceptibilidad a la glicación mejorada.

55

[0040] El método de la invención, de este modo, se refiere a variantes de fitasa con patrón mejorado y/o de glicosilación.

[0041] La invención se refiere además a polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican las variantes de fitasa producidas por el método; constructos de ácidos nucleicos que comprenden los polinucleótidos operativamente enlazados a una o varias secuencias de control, que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión; vectores de expresión recombinantes que comprenden tales constructos de ácidos nucleicos; y células huésped recombinantes que comprenden un constructo de ácidos nucleicos y/o un vector de expresión.

60

[0042] La invención se refiere además a métodos para producir variantes de fitasa tal como se proporciona que comprenden

65

(a) cultivar una célula huésped para producir un sobrenadante que comprenda la fitasa; y

(b) recuperar la fitasa.

[0043] La invención se refiere además a plantas o partes de planta transgénicas capaces de expresar las variantes de fitasa, composiciones que comprenden al menos una variante de fitasa, y (a) al menos una vitamina liposoluble; (b) al menos una vitamina hidrosoluble; y/o (c) al menos un oligoelemento.

Tales composiciones pueden además comprender al menos una enzima seleccionada del siguiente grupo de enzimas: amilasa, fitasa, fosfatasa, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasa, fosfolipasa y/o beta-glucanasa. Las composiciones pueden ser aditivos de piensos para animales que pueden tener un contenido bruto de proteína de 50 a 800 g/kg y que comprenden una variante de fitasa de la invención.

[0044] La invención se refiere además a métodos para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, añadiendo una variante de fitasa de la invención al pienso, procesos para reducir los niveles de fitato en abono animal alimentando un animal con una cantidad eficaz de pienso, métodos para el tratamiento de proteínas vegetales, que comprenden el paso de añadir una variante de fitasa por lo menos a una proteína vegetal, y el uso de una variante de fitasa de una composición de la invención.

[0045] La invención también proporciona un método para producir un producto de fermentación tal como, por ejemplo, etanol, cerveza y vino, que comprende fermentar un material de carbohidratos en presencia de una variante de fitasa, un método para producir etanol que comprende fermentar un material de carbohidratos en presencia de una variante de fitasa, y producir etanol.

Polipéptidos de fitasa, porcentaje de identidad

[0046] En el presente contexto una fitasa es un polipéptido con actividad de fitasa, es decir una enzima que cataliza la hidrólisis de fitato (mioinositol hexakisfosfato) hacia (1) mioinositol y/o (2) mono-, di-, tri-, tetra- y/o pentafosfatos del mismo y (3) fosfato inorgánico.

[0047] En el presente contexto, el término "sustrato de fitasa" abarca, entre otros, ácido fítico y cualquier fitato (sal de ácido fítico), así como los fosfatos enumerados en (2) anteriormente.

[0048] La página ENZYME en internet (<http://www.expasy.ch/enzyme/>) es un repositorio de información relativa a la nomenclatura de enzimas.

Está basado principalmente en las recomendaciones del Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUB-MB) y describe cada tipo de enzima caracterizada para el que se haya proporcionado un número EC (comisión enzimática) (Bairoch A. The ENZYME database, 2000, Nucleic Acids Res 28:304-305).

Ver también el manual Enzyme Nomenclature de NC-IUBBM, 1992).

[0049] Según la página ENZYME, se conocen tres tipos diferentes de fitasas: la llamada 3-fitasa (nombre alternativo 1-fitasa; una mioinositol hexafosfato 3-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.8), la llamada 4-fitasa (nombre alternativo 6-fitasa, nombre basado en sistema de numeración 1L y no en el 1D, EC 3.1.3.26) y la llamada 5-fitasa (EC 3.1.3.72).

A efectos de la presente invención, los tres tipos se incluyen en la definición de fitasa.

[0050] Las fitasas de la invención pertenecen a la familia de las fosfatasas ácidas de histidina, que incluyen la fosfatasa ácida pH 2,5 de *Escherichia coli* (gen appA) así como fitasas fúngicas tales como fitasas A y B de *Aspergillus awamorii* (EC: 3.1.3.8) (genes phyA y phyB).

Las fosfatasas ácidas de histidina comparten dos regiones de similitud de secuencia, cada una centrada alrededor de un residuo conservado de histidina.

Estas dos histidinas parecen estar involucradas en el mecanismo catalítico de las enzimas.

La primera histidina se ubica en la sección N-terminal y forma un intermedio de fosfo-histidina mientras que la segunda se ubica en la sección C-terminal y posiblemente actúa como donante de protones.

[0051] Las fitasas de la invención tienen un motivo de sitio activo conservado, a saber, R-H-G-X-R-X-P, donde X designa cualquier aminoácido (ver los aminoácidos 16 a 22 de las SEC ID N° 2, 3, 4, 6 y los aminoácidos 38-44 de la SEC ID N° 9).

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

[0052] Para los fines de la presente invención la actividad de fitasa se determina en unidades FYT, siendo un FYT la cantidad de enzima que libera 1 micromol de ortofosfato inorgánico por minuto bajo las condiciones siguientes: pH 5,5; temperatura 37°C; sustrato: fitato de sodio (C₆H₆O₂₄P₆Na₁₂) en una concentración de 0,0050 mol/l.

Ensayos de fitasa adecuados son los ensayos FYT y FTU descritos en ejemplo 1 de WO 00/20569.

FTU es para determinar la actividad de fitasa en piensos y premezclas.

La actividad de fitasa también se puede determinar utilizando los ensayos del ejemplo 1 ("Determinación de la

actividad de fosfatasa" o "Determinación de la actividad de fitasa").

[0053] En una realización particular la fitasa de la invención está aislada.

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

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

[0054] La relación entre dos secuencias de aminoácidos se describe mediante el parámetro "identidad". Para los fines de la presente invención, el alineamiento de dos secuencias de aminoácidos se determina usando el programa Needle del paquete EMBOSS (<http://emboss.org>) versión 2.8.0.

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

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

[0055] El grado de identidad entre una secuencia de aminoácidos de la presente invención ("secuencia de la invención") y la secuencia de aminoácidos referida en las reivindicaciones (SEC ID N° 2) se calcula como el número de coincidencias exactas en un alineamiento de las dos secuencias, dividido por la longitud de la "secuencia de la invención" o por la longitud de la SEC ID N° 2, la que sea más corta.

El resultado se expresa en porcentaje de identidad.

[0056] Una correspondencia exacta ocurre cuando la "secuencia de la invención" y la SEC ID N° 2 tienen residuos de aminoácidos idénticos en las mismas posiciones del solapamiento (en el ejemplo de alineamiento siguiente esto se representa mediante "|"). La longitud de una secuencia es el número de residuos de aminoácidos en la secuencia (por ejemplo, la longitud de los aminoácidos 1-411 de la SEC ID N° 2 es 411).

[0057] En el siguiente ejemplo de alineamiento puramente hipotético, el solapamiento es la secuencia de aminoácidos "HTWGER-NL" de la secuencia 1; o la secuencia de aminoácidos "HGWGEDANL" de la secuencia 2. En el ejemplo se indica un espacio mediante un "-".

Ejemplo de alineamiento hipotético:

[0058]

```

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

[0059] En una realización particular, el porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido con la SEC ID N° 2 se determina, i) alineando las dos secuencias de aminoácidos utilizando el programa Needle, con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización de apertura de gap de 10 y una penalización de extensión de gap de 0,5; ii) contando el número de coincidencias exactas en el alineamiento; iii) dividiendo el número de coincidencias exactas por la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos; y iv) convirtiendo el resultado de la división iii) a porcentaje.

[0060] En el ejemplo hipotético anterior, el número de coincidencias exactas es 6, la longitud más corta de una de las dos secuencias de aminoácidos es 12; por consiguiente, el porcentaje de identidad es 50 %. La invención está dirigida además a una variante fitasa donde la variante

a) tiene al menos un 80 % de identidad con aminoácidos 1-413 de la fitasa progenitora de la SEC ID N° 2, aminoácidos 1-413 de la fitasa progenitora de la SEC ID N° 4 y/o aminoácidos 1-413 de la SEC ID la fitasa progenitora N° 6, cuando se alinea a una secuencia de aminoácido respectiva usando el programa Needle con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización de apertura de gap de 10.0 y una penalización de apertura de gap de 0.5; y

b) comprende 1, 2 o 3 puentes de disulfuro establecidos en comparación con la SEC ID N° 2, donde dicho puente de disulfuro no está entre los cuatro de origen natural en posiciones 79/110, 135/410, 180/189 y 384/393,

donde el puente de disulfuro establecido está en la posición F) 61C/102C, donde los dos puentes de disulfuro establecidos usan las siguientes combinaciones de pares de posición: A+F, B+F, C+F, D+F, E+F y F+G, donde A significa 143C/201C, B significa 33C/179C, C significa 54C/101C, D significa 93C/48C, E significa 33C/178C, F significa 61C/102C y G significa 164C/251C.;

donde los tres puentes de disulfuro establecidos usan las siguientes combinaciones de pares de posición: A+B+F, A+C+F, A+D+F, A+E+F, A+F+G, B+C+F, B+D+F, B+E+F, B+F+G, C+D+F, C+E+F, C+F+G, D+E+F, D+F+G y E+F+G, donde A significa 143C/201C, B significa 33C/179C, C significa 54C/101C, D significa 93C/48C, E significa 33C/178C, F significa 61C/102C y G significa 164C/251C; y donde la variante tiene una termostabilidad mejorada y/o un perfil de temperatura o en comparación con la fitasa progenitora.

[0061] Todavía en una forma de realización particular, la fitasa de la invención tiene no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o no más de 10 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o no más de 20 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2; no más de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o no más de 30 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2; no más de 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o no más de 40 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o no más de 50 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o no más de 60 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 o no más de 70 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 o no más de 80 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 o no más de 90 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o no más de 100 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109 o no más de 110 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 o no más de 120 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora; o no más de 121, 122, 123 o 124 modificaciones en comparación con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 y/o la SEC ID N° 6 o cualquier otra fitasa progenitora.

Numeración de posición

[0062] La nomenclatura que se usa en este documento para definir las posiciones de los aminoácidos se basa en la secuencia de aminoácidos de la fitasa madura de *Buttiauxella gaviniae* DSM 18930 que se da en el listado de secuencias como SEC ID N° 2 (aminoácidos 1-413 de la SEC ID N° 2).

Por consiguiente, en el presente contexto, la base para numerar las posiciones es la SEC ID N° 2 empezando con N1 y terminando con Q413. (SEC ID N° 2) como estándar para la numeración de posición y, así, también para la nomenclatura.

[0063] Cuando se usa en este documento, el término parte (o secuencia) "madura" se refiere a esa parte del polipéptido que es segregada por una célula que contiene, como parte de su equipamiento genético, un polinucleótido que codifica el polipéptido.

En otras palabras, la parte de polipéptido maduro se refiere a la parte del polipéptido que permanece después de que la parte de péptido señal, así como una parte de propéptido, si lo hay, haya sido dividida.

La parte de péptido señal puede ser predicha por programas conocidos en la técnica (por ejemplo, SignalP).

Generalmente, el primer aminoácido de la parte madura de una enzima se puede determinar mediante secuenciación del N-terminal de la enzima purificada.

Cualquier diferencia entre la parte de péptido señal y la parte madura debe ser debida entonces a la presencia de un propéptido.

Modificaciones tales como sustituciones, deleciones e inserciones

[0064] Una variante de fitasa puede comprender varios tipos de modificaciones con respecto a una plantilla (es decir, una secuencia de aminoácidos de referencia o de comparación tal como la SEC ID N° 2): un aminoácido puede ser sustituido por otro aminoácido; un aminoácido puede ser eliminado; un aminoácido puede ser insertado; así como cualquier combinación de cualquier número de tales modificaciones.

En el presente contexto el término "inserción" pretende incluir también las extensiones N- y/o C-terminal.

[0065] La nomenclatura general que se usa en este documento para una única modificación es la siguiente: XDcY, donde "X" e "Y" designan de manera independiente un código de aminoácido de una sola letra, o un "*" (delección de un aminoácido), "D" designa un número y "c" designa un contador alfabético (a, b, c, etcétera), que está solo presente en inserciones.

Se hace referencia a Tabla 1 a continuación que describe ejemplos puramente hipotéticos de la aplicación de esta nomenclatura a varios tipos de modificaciones.

Tabla 1

Tipo	Descripción	Ejemplo
------	-------------	---------

Sustitución	X = Aminoácido en la plantilla D = Posición vacía en la plantilla c Y = Aminoácido en variante	G80A 80 AALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSG : AALNNSIAVLGVAPSAELYAVKVLGASGSG
Inserción	X="*" " D = Posición en la plantilla antes de la inserción c="a" para la primera inserción en esta posición, "b" para la siguiente, etc.	*80aT *80bY *85aS 80 85 AALNNSIG..VLGVA.PSAELYAVKVLGASG AALNNSIGTYVLGVASPSAELYAVKVLGASG
Delección	X = Aminoácido en la plantilla D = Posición vacía en la plantilla c Y = "*" "	V81* 80 AALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSG AALNNSIG.LGVAPSAELYAVKVLGASGSG
Extensión N-terminal	Inserción en la posición "0".	*0aA*0bT*0cG 1 ...AQSVPWGISRVQ ATGAQSVPWGISRVQ
Extensión C-terminal	Inserción después del aminoácido del N-terminal	*275aS *275bT 270 275 ATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR.. ATSLGSTNLYGSGLVNAEAATRST

[0066] Como se explica anteriormente, el número de posición ("D") se cuenta desde el primer residuo de aminoácido de la SEC ID N° 2.

5 [0067] Diferentes modificaciones en la misma secuencia están separadas por "/" (barra oblicua), por ejemplo, la designación "1*/2*/3*" significa que los aminoácidos en las posiciones número 1, 2, y 3 se eliminan todos, y la designación "104A/105F" significa que el aminoácido en la posición número 104 se sustituye por A, y el aminoácido en la posición número 105 se sustituye por F.

10 [0068] Las modificaciones alternativas están separadas por "," (coma), por ejemplo, la designación "119R,K" significa que el aminoácido en la posición 119 se sustituye por R o K.

[0069] Las comas usadas en este documento en otras enumeraciones de posibilidades significan lo que habitualmente significan gramáticamente, a saber, frecuentemente y/o.

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

[0070] En el presente contexto, "al menos una" (por ejemplo, modificación) significa una o varias, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones; o 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 25, 28 o 30 modificaciones; y así sucesivamente, hasta un número máximo de modificaciones de 125, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o de 200. Las variantes de fitasa de la invención, sin embargo, todavía tienen que ser al menos un 70 % idénticas a la SEC ID N° 2. Este porcentaje se determina como se ha descrito anteriormente.

25 [0071] Una sustitución o extensión sin alguna indicación de qué sustituir o extender se refiere a la inserción de cualquier aminoácido natural o no natural, excepto el que ocupa esta posición en la plantilla.

Identificación de los números de posición correspondientes

30 [0072] Como se ha explicado anteriormente, la secuencia madura de aminoácidos de la fitasa madura de *Buttiauxella gaviniae* DSM 18930 (SEC ID N° 2) se usa como estándar para la numeración de posición y, de este modo, también para la nomenclatura.

35 [0073] Para otra fitasa, en particular una variante de fitasa de la invención, la posición que corresponde a la posición D en la SEC ID N° 2 se encuentra mediante el alineamiento de las dos secuencias tal y como se especifica anteriormente en la sección titulada "Polipéptidos de fitasa, porcentaje de identidad". A partir del alineamiento, la posición en la secuencia de la invención que corresponde a la posición D de la SEC ID N° 2 se puede identificar claramente y sin ambigüedad (las dos posiciones una encima de la otra en el alineamiento).

[0074] Más adelante se incluyen ejemplos adicionales, puramente hipotéticos, que se derivan de la tabla 1

anterior en cuya tercera columna incluye varios alineamientos de dos secuencias:

Considerar la tercera celda de la primera fila de la tabla 1: la secuencia superior es la plantilla, la inferior la variante. La posición número 80 se refiere al residuo de aminoácido G en la plantilla. El aminoácido A ocupa la posición correspondiente en la variante. Por consiguiente, esta sustitución se designa G80A.

5 [0075] Considerar ahora la tercera celda de la segunda fila de la tabla 1: la secuencia superior es otra vez la plantilla y la inferior la variante.

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

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

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

15 [0076] Finalmente, considerar la tercera celda de la última fila de la tabla 1: la posición número 275 se refiere al último aminoácido de la plantilla.

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

20 Propiedades modificadas, fitasa de referencia

[0077] La fitasa de la invención tiene una termoestabilidad mejorada y/o un perfil de temperatura mejorado en comparación con la fitasa progenitora. Los términos "modificado" y "mejorado" implican una comparación con la fitasa progenitora.

25 [0078] Otros ejemplos no limitativos de propiedades que son modificadas, preferiblemente mejoradas, son los siguientes: perfil de pH, actividad específica, rendimiento en piensos para animales, estabilidad frente a la granulación, sensibilidad de proteasa y/o patrón de glicosilación. Las variantes de fitasa producidas por el método de la invención exhiben termoestabilidad mejorada y tienen un perfil de temperatura mejorado, y/o pueden incorporar un cambio de un sitio potencial de división de proteasa.

Rendimiento térmico

35 Termoestabilidad

[0079] La termoestabilidad se puede determinar como se describe en el ejemplo 3, es decir, usando mediciones de DSC para determinar la temperatura de desnaturalización, Td, de la proteína fitasa purificada.

La Td es indicativa de la termoestabilidad de la proteína: cuanto mayor es la Td, mayor es la termoestabilidad.

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

45 [0080] La termoestabilidad también se puede determinar de la siguiente manera. Por consiguiente, en una realización preferida la fitasa de la invención, tras la incubación durante 60 minutos a 70°C y pH 4,0, tiene una actividad residual mejorada en comparación con la actividad residual de una fitasa de referencia tratada de la misma manera, calculando la actividad residual para cada fitasa con respecto a la actividad encontrada antes la incubación (a 0 minutos).

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

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

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

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

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

60 [0081] En una realización particular, la variante de fitasa de la invención es más termoestable que la fitasa de referencia, donde la termoestabilidad se determina utilizando cualquiera de las cuatro pruebas mencionadas anteriormente (basadas en los ejemplos).

65 Estabilidad calorífica

[0082] La estabilidad calorífica se puede determinar como se describe en el ejemplo 4 determinando el perfil de temperatura/actividad de las variantes de fitasa.

Perfil de temperatura/estabilidad de temperatura

5

[0083] Se puede determinar según se describe en el ejemplo 4 si una fitasa de la invención tiene un perfil de temperatura modificado comparado con una fitasa de referencia. Por consiguiente, en una realización particular, la fitasa de la invención tiene un perfil de temperatura modificado comparado con una fitasa de referencia, donde el perfil de temperatura se determina como la actividad de fitasa como función de la temperatura en fitato de sodio a pH 5,5 en el intervalo de temperaturas de 20-90°C (en pasos de 10°C).

10

Un tampón preferido está en un tampón de acetato de sodio 0,25 M a 5,5 pH.

La actividad a cada temperatura se indica preferiblemente como la actividad relativa (en %) normalizada al valor a temperatura óptima.

15

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

Perfil de pH

20

[0084] Se puede determinar según se describe en los ejemplos si una fitasa de la invención tiene un perfil de pH modificado comparado con una fitasa de referencia.

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

25

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

Otro tampón preferido es acetato sódico 0,25 M.

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

30

[0085] Un ejemplo de un perfil de pH modificado es donde la curva de pH (actividad relativa como función de pH) se desplaza hacia pH más alto o más bajo.

[0086] Otro ejemplo de un perfil de pH modificado es donde se cambia el pH óptimo, en la dirección ascendente o descendente

35

Un perfil de pH modificado también se puede determinar comparando la actividad de fosfatasa a pH 3,5 y 5,5.

Alternativamente, la actividad a pH 3,5 se puede comparar con la actividad a pH 4,0, 4,5 o 5,0.

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

40

[0087] En una realización particular, la fitasa de la invención tiene un perfil de pH modificado en comparación con una fitasa de referencia.

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

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

45

Actividad específica

[0088] En una realización particular, la fitasa de la invención tiene una actividad específica mejorada con respecto a una fitasa de referencia.

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

50

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

55

[0089] En la alternativa, el término "alta actividad específica" se refiere a una actividad específica de al menos 200 FYT/mg de proteína enzimática (PE). En realizaciones particulares, la actividad específica es al menos 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 o 3000 FYT/mg de PE.

60

[0090] La actividad específica se mide en muestras altamente purificadas (un gel de poliacrilamida con SDS debería mostrar la presencia de un solo componente).

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

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

65

Rendimiento en piensos para animales

[0091] En una realización particular, la fitasa de la invención tiene un rendimiento mejorado en piensos para animales en comparación con una fitasa de referencia. El rendimiento en piensos para animales se puede determinar mediante un modelo in vitro del ejemplo 5. Por consiguiente, en una realización preferida, la fitasa de la invención tiene un rendimiento mejorado en piensos para animales, donde el rendimiento se determina en un modelo in vitro, preparando muestras de pienso compuestas por un 30 % de harina de soja y un 70 % de harina de maíz con CaCl_2 añadido hasta una concentración de 5 g de calcio por kg de pienso; preincubándolas a 40°C y pH 3,0 durante 30 minutos añadiendo después pepsina (3000 U/g de pienso) y fitasa; incubando las muestras a 40°C y pH 3,0 durante 60 minutos y a continuación a pH 4,0 durante 30 minutos; parando las reacciones; extrayendo ácido fítico y fosfatos de inositol mediante la adición de HCl hasta una concentración final de 0,5M y la incubación a 40°C durante 2 horas, seguida de un ciclo de congelación-descongelación y una hora de incubación a 40°C; separando el ácido fítico y los fosfatos de inositol mediante cromatografía de iones de alto rendimiento; determinando la cantidad de fósforo del fitato (IP6-P) residual; calculando la diferencia de IP6-P residual entre la muestra en blanco de la fitasa tratada y la de una fitasa no tratada (esta diferencia es IP6-P degradado); y expresando el IP6-P degradado de la fitasa de la invención en relación con el IP6-P degradado de la fitasa de referencia (por ejemplo, las fitasas que tienen la SEC ID N° 3 y 4).

[0092] La fitasa de la invención y la fitasa de referencia están, por supuesto, dosificadas en la misma cantidad, preferiblemente basada en unidades de actividad de fitasa (FTU). Una dosis preferida es 125 FTU/kg de pienso. Otra dosis preferida es 250 FTU/kg de pienso. Las fitasas se pueden dosificar en forma de fitasas purificadas o en forma de sobrenadantes de fermentación.

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

[0093] En realizaciones preferidas, el valor de IP6-P degradado de la fitasa purificada de la invención, en relación con el valor de IP6-P degradado de la fitasa de referencia, es al menos un 101 % o al menos un 102 %, 103 %, 104 %, 105 %, 110 %, 115 % o al menos un 120 %.

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

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

[0094] El rendimiento relativo de una fitasa de la invención también se puede calcular como el porcentaje de fósforo liberado por la fitasa de referencia.

[0095] En otra realización particular, el rendimiento relativo de la fitasa de la invención se puede calcular como el porcentaje de fósforo liberado por la fitasa de la invención en relación con la cantidad de fósforo liberada por la fitasa de referencia.

[0096] En otras realizaciones particulares, el rendimiento relativo de la fitasa de la invención es al menos un 105 %, preferiblemente al menos un 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o al menos un 200 %.

45 Secuencias y constructos de ácidos nucleicos

[0097] La presente invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una variante de fitasa de la invención.

[0098] El término "secuencia de ácidos nucleicos aislada" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que está esencialmente libre de otras secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, al menos aproximadamente un 20 % pura, preferiblemente al menos aproximadamente un 40 % pura, más preferiblemente al menos aproximadamente un 60 % pura, aún más preferiblemente al menos aproximadamente un 80 % pura y de la forma más preferible al menos aproximadamente un 90% pura tal y como se determina mediante electroforesis de agarosa.

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

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

La secuencia de ácidos nucleicos puede ser de origen genómico, de ADNc, de ARN, semisintético, sintético o cualquier combinación de los mismos.

[0099] Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar introduciendo al menos una

mutación en una plantilla de secuencia codificante de fitasa o una subsecuencia de la misma, donde la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica una variante de fitasa.

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

[0100] La mutagénesis aleatoria se realiza adecuadamente como mutagénesis aleatoria tanto localizada como específica de la región en al menos tres partes del gen que se traduce a la secuencia de aminoácidos mostrada en cuestión o en el gen entero.

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

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

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

[0101] Preferiblemente, el dopaje se lleva a cabo usando un "dopaje aleatorio constante", en el que el porcentaje de tipo salvaje y mutación en cada posición está predefinido. Además, el dopaje se puede orientar hacia una preferencia por introducir ciertos nucleótidos y, de este modo, una preferencia por introducir uno o varios residuos específicos de aminoácidos.

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

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

[0102] La mutagénesis aleatoria puede ser ventajosamente localizada a una parte de la fitasa progenitora en cuestión.

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

[0103] Los métodos alternativos para proporcionar variantes de la invención incluyen el barajado de genes, por ejemplo, como se describe en WO 95/22625 o en WO 96/00343, y el proceso de derivación de consenso como se describe en EP 897985.

Constructos de ácidos nucleicos

[0104] Un constructo de ácidos nucleicos comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención operativamente enlazada a uno o varias secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

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

[0105] El término "constructo de ácidos nucleicos" tal como se utiliza en este documento se refiere a una molécula de ácido nucleico, tanto monocatenaria como bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de una manera que de otro modo no existirían en la naturaleza.

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

[0106] El término "secuencias de control" se define en este documento para incluir todos componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención.

Cada secuencia de control puede ser nativa o extranjera a la secuencia de nucleótidos que codifican el polipéptido.

Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de transcripción.

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

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

nucleicos que codifica un polipéptido.

[0107] El término "operativamente enlazado" denota en este documento una configuración en la que una secuencia de control se coloca apropiadamente en una posición relativa a la secuencia codificante de la secuencia de polinucleótidos de manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

[0108] Cuando se usa en este documento, el término "secuencia codificante" (CDS) significa una secuencia de nucleótidos que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los límites de la secuencia codificante están generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que empieza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG. La secuencia codificante puede ser ADN, ADNc o una secuencia recombinante de nucleótidos.

Vector de expresión

[0109] El término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero sin limitarse a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0110] El término "vector de expresión" se define en este documento como una molécula lineal o circular de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención y que está operativamente enlazado a nucleótidos adicionales que se encargan de su expresión.

[0111] Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una variante de fitasa de la invención se puede expresar utilizando un vector de expresión que incluye típicamente secuencias de control que codifican un promotor, un operador, un sitio de unión al ribosoma, una señal de inicio de traducción y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores.

[0112] El vector de expresión recombinante que porta la secuencia de ADN que codifica una variante de fitasa de la invención puede ser cualquier vector que pueda ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá frecuentemente de la célula huésped en la que va a ser introducido.

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

[0113] La variante de fitasa también se puede coexpresar junto con al menos otra enzima de interés para piensos para animales, como fitasa, fosfatasa, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasa, fosfolipasa, amilasa y/o beta-glucanasa.

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

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

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

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

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

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

Células huésped

[0114] El término "célula huésped", tal como se utiliza en este documento, incluye cualquier tipo de célula susceptible a transformación, transfección, transducción y similares con un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido de la presente invención.

[0115] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención, que son ventajosamente usadas en la producción recombinante de los polipéptidos.

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

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

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

[0116] La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procarionta; o un

microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota.

5 [0117] Los microorganismos unicelulares útiles son células bacterianas tales como bacterias gram positivas incluyendo, pero sin limitarse a, una célula de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*; o una célula de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* y *Streptomyces murinus*; o bacterias gram negativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas sp.* en un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus*, *lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*.
10 En otro aspecto preferido, la célula de *Bacillus* es un bacillus alcalofílico.

15 [0118] La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana puede, por ejemplo, estar afectada por la transformación de protoplastos (ver, por ejemplo, Chang and Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), usando células competentes (ver, por ejemplo, Young and Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829, o Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa and Dower, 1988 *Biotechniques* 6: 742-751) o conjugación (ver, por ejemplo, Koehler and Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

20 [0119] La célula huésped también puede ser un eucariota, como una célula de mamífero, insecto, planta o fúngica.

25 [0120] En un aspecto preferido, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongos" tal como se utiliza en este documento incluye los fila *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *zygomycota* (según la definición de Hawkswort et al., In, Ainswort and Bisby's *Dictionary of The Fungi*, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) así como los *Oomycota* (según se cita en Hawkswort et al., 1995, supra, página 171) y todos hongos mitospóricos (Hawkswort et al., 1995, supra).

30 [0121] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura" tal como se utiliza en este caso incluye levadura ascoesporógena (*Endomycetales*), levadura basidioesporogénea y levadura de los *Fungi Imperfecti* (*Blastomycetos*). Ya que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe ser definida como se describe en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, *Soc. App. Bacteriol. Symposium Series n°. 9*, 1980).

35 [0122] En un aspecto aún más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

40 [0123] En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*.
En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*.
En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

45 [0124] En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula fúngica filamentosa. "Fúngica filamentosa" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (según la definición de Hawkswort et al., 1995, supra).
Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos.
El crecimiento vegetativo es mediante alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico.
50 En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es mediante injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

55 [0125] En un aspecto aún más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromices*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyopcladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

60 [0126] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.
En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*.
65 En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de cepas de *Bjerkandera*

adusta, Ceriporiopsis aneirina, Ceriporiopsis caregiea, Ceriporiopsis gilvoscens, Ceriporiopsis pannocinta, Ceriporiopsis rivulosa, Ceriporiopsis subrufa o Ceriporiopsis subvermispora, Coprinus cinereus, Coriolus hirsutus, Humicola insolens, Humicola lanuginosa, Mucor miehei, Myceliophthora thermophila, Neurospora crassa, Penicillium purpurogenum, Phanerochaete chrysosporium, Phlebia radiata, Pleurotus eryngii, Thielavia terrestris, Trametes villosa, Trametes versicolor, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei o Trichoderma viride.

[0127] Las células fúngicas se pueden transformar mediante un proceso que implica formación de protoplastos, transformación de los protoplastos y regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de Aspergillus y Trichoderma se describen en EP 238 023 y Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474. Métodos Adecuados para transformar especies de Fusarium son descritos por Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156 y WO 96/00787. La levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, In Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, volumen 194, págs 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

Métodos de producción

[0128] La presente invención también se refiere a métodos para producir una fitasa de la presente invención que comprenden (a) cultivar una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción de la fitasa; y (b) recuperar la fitasa.

[0129] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar mediante cultivo en matraz de agitación y mediante fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentación continua, por lote, lote alimentado o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan al polipéptido ser expresado y/o aislado.

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

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

[0130] El polipéptido resultante se puede recuperar usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0131] Los polipéptidos de la presente invención pueden ser purificados mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, de cromatografía de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, Editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

Plantas transgénicas

[0132] La presente invención se refiere también a una planta transgénica, parte de planta o célula vegetal que ha sido transformada con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad de fitasa de la presente invención para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables.

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

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

[0133] En una realización particular, el polipéptido está dirigido a las vacuolas de almacenamiento del endospermo en semillas.

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

[0134] La planta transgénica puede ser dicotiledónea o monocotiledónea o variantes diseñadas de las mismas. Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas tales como poa de los prados (poa pratense, poa), hierbas forrajeras tales como festuca, lolium, hierbas templadas tales como agrostis, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, triticale (híbrido estabilizado de trigo (triticum) y centeno (secale)) y maíz.

Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, leguminosas, tales como girasol (*helianthus*), algodón (*gossypium*), lupinos, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y semilla de soja, y plantas crucíferas (familia Brassicaceae), como coliflor, semilla de colza y el organismo modelo estrechamente relacionado de *Arabidopsis thaliana*.

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

[0135] Ejemplos de partes de planta son tallo, callo, hojas, raíz, frutos, semillas y tubérculos, así como los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo, epidermis, mesófilo, parénquima, tejidos vasculares y meristemas.

10 Compartimentos celulares específicos de la planta, tales como cloroplastos, apoplastos, mitocondrias, vacuolas, peroxisomas y citoplasma se consideran también una parte de planta.

Además, cualquier célula vegetal, cualquiera que sea el origen del tejido, se considera que es parte de la planta. Asimismo, partes de planta tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la invención se consideran también partes de planta, por ejemplo: embriones, endospermos, aleurona y tegumentos.

[0136] También se incluyen dentro del campo de la presente invención los descendientes de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

[0137] La planta o la célula vegetal transgénicas que expresan un polipéptido de la presente invención se pueden construir conforme a métodos conocidos en la técnica. En definitiva, la planta o la célula vegetal se construyen incorporando uno o varios constructos de expresión que codifican un polipéptido de la presente invención en el genoma huésped de la planta y propagando la planta o la célula vegetal modificadas resultantes a una planta o una célula vegetal transgénica.

[0138] Convenientemente, el constructo de expresión es un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de la presente invención operativamente enlazado a secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en la planta o parte de planta elegida.

Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable, útil para identificar células huésped en las que el constructo de expresión ha sido integrado, y secuencias de ADN necesarias para introducir el constructo en la planta en cuestión (esto último depende del método usado para introducir el ADN).

[0139] La elección de las secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y terminadoras y, opcionalmente, secuencias de señal o tránsito, se determina, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde y cómo se desea que el polipéptido se exprese.

Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser constitutiva o inducible, o puede ser específica de desarrollo, fase o tejido, y el producto genético puede ser dirigido a un compartimento celular, tejido o parte de planta específicos tales como semillas u hojas.

Las secuencias reguladoras son, por ejemplo, descritas por Tague et al., 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

[0140] Para la expresión constitutiva se pueden usar los promotores siguientes: el promotor 35S-CaMV, la ubiquitina 1 del maíz (Christensen AH, Sharrock RA and Quail 1992. *Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation*) o el promotor de actina 1 del arroz (*Plant Mo. Biol.* 18, 675-689.; Zhang W, McElroy D. and Wu R 1991,

Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants. Plant Cell 3, 1155-1165).

Los promotores específicos de un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata y frutos (Edwards & Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos tales como meristemas (Ito et al., 1994, *Plant. Mol. Biol.* 24: 863-878), un promotor específico de semilla como el promotor de glutelina, prolamina, globulina o albúmina del arroz (Wu et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 885-889), un promotor de Vicia faba de la legúmina B4 y el gen desconocido de proteína de semilla de Vicia faba (Conrad et al., 1998, *Journal of Plant Physiology* 152: 708-711), un promotor de una proteína de cuerpo aceitoso de semillas (Chen et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 935-941), el promotor del napA de proteínas de almacenamiento de Brassica napus o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor del rbcS del arroz o el tomate (Kiozuka et al., 1993, *Plant Physiology* 102: 991-1000), el promotor del gen de adenina metiltransferasa del virus chlorella (Mitra and Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93) o el promotor del gen aldP del arroz (Kagaya et al., 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668-674), o un promotor inducible por herida tal como el promotor del pin2 de la patata (Xu et al., 1993, *Plant Molecular Biology* 22: 573-588).

Asimismo, el promotor puede ser inducible mediante tratamientos abióticos tales como temperatura, sequía o alteraciones en la salinidad; o inducible mediante sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, por ejemplo: etanol, estrógenos, hormonas de planta tipo etileno, ácido abscísico, ácido giberélico y/o metales pesados.

[0141] Un elemento intensificador del promotor se puede usar también para conseguir una expresión mayor del polipéptido en la planta.

Por ejemplo, el elemento intensificador del promotor puede ser un intrón que se coloca entre el promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención.

Por ejemplo, Xu et al., 1993, supra, describen el uso del primer intrón del gen de actina 1 del arroz para mejorar su expresión.

[0142] Aún más, el uso de codón se puede optimizar para las especies de la planta en cuestión para mejorar su expresión (ver Horvath et al. referido anteriormente).

[0143] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes del constructo de expresión se pueden elegir a partir de aquellos disponibles en la técnica.

[0144] El constructo de ácidos nucleicos se incorpora al genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partículas, transformación biolística y electroporación (Gasser et al., 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/technology* 8: 535; Shimamoto et al., 1989, *Nature* 338: 274).

[0145] Actualmente, la transferencia genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método elegido para generar dicotiledóneas transgénicas (para una reseña, ver Hooykas and Schilperoort, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 15-38), y puede también usarse para transformar monocotiledóneas, aunque otros métodos de transformación se usan más frecuentemente para estas plantas.

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

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

[0146] Después de la transformación, los transformantes que han incorporado en ellos el constructo de expresión se seleccionan y se regeneran en plantas completas según métodos bien conocido en la técnica. Frecuentemente el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes seleccionables, o bien durante la regeneración, o bien en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de ADN-T separados o escisión específica del sitio del gen seleccionable mediante una recombinasa específica.

[0147] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprende (a) cultivar una planta transgénica o una célula vegetal que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con actividad de fitasa de la presente invención, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

Composiciones y usos

[0148] Aún en otros aspectos, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención, así como métodos para usarlas.

[0149] Las composiciones de polipéptido se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de líquido o de composición seca.

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

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

[0150] La fitasa de la invención se puede usar para degradar, en cualquier contexto industrial, por ejemplo, fitato, ácido fítico, y/o los mono-, di-, tri-, tetra- y/o pentafofosfatos de mioinositol.

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

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

[0151] Por consiguiente, los usos preferidos de los polipéptidos de la invención son como preparados de piensos para animales (incluyendo alimento humano) o como aditivos para este tipo de preparados.

[0152] En una realización particular, el polipéptido de la invención se puede usar para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales.

Ejemplos no limitantes de la mejora del valor nutricional de piensos para animales (incluyendo alimento humano),

- son: mejorar la digestibilidad del pienso; promover el crecimiento del animal; mejorar la utilización del pienso; mejorar la biodisponibilidad de proteínas; incrementar el nivel de fosfato digerible; mejorar la liberación y/o degradación de fitato; mejorar la biodisponibilidad de oligoelementos; mejorar la biodisponibilidad de macrominerales; eliminar la necesidad añadir fosfato, oligoelementos y/o macrominerales adicionales; y/o mejorar la calidad de la cáscara de huevo.
- 5 El valor nutricional del pienso, por lo tanto, se incrementa, y la tasa de crecimiento y/o aumento de peso y/o conversión de pienso (es decir, el peso del pienso ingerido con respecto al aumento de peso) del animal se puede mejorar.
- 10 [0153] Además, el polipéptido de la invención se puede usar para reducir el nivel de fitato en abonos.
- Animales, pienso para animales y aditivos del pienso
- [0154] El término animal incluye todos los animales, incluyendo seres humanos.
- 15 Ejemplos de animales son los no rumiantes y los rumiantes.
Los animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como ovejas, cabras y ganado, por ejemplo, vacas tales como el ganado bovino para carne y vacas lecheras.
En una realización particular, el animal es un animal no rumiante.
- 20 Los animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, por ejemplo, cerdos (incluyendo, pero sin limitarse a, lechones, cerdos en crecimiento y cerdas); aves tales como pavos, patos y pollos (incluyendo, pero sin limitarse a, pollos para asar y gallinas ponedoras); pescado (incluyendo, pero sin limitarse a, trucha, tilapia, siluro y carpa); y crustáceos (incluyendo, pero sin limitarse a, gambas y cigalas).
- [0155] El término pienso o composición de pienso significa cualquier compuesto, preparado, mezcla o composición adecuado para, o destinado a, ser consumido por un animal.
- 25 [0156] En el uso según la invención se puede alimentar al animal con el polipéptido antes, después o simultáneamente a la dieta. Esto último es lo que se prefiere.
- [0157] En una realización particular, el polipéptido, en la forma en la que se añade al pienso, o cuando se incluye en un aditivo de pienso, es sustancialmente puro.
En una realización particular está bien definido.
El término "bien definido" significa que el preparado de fitasa es al menos un 50 % puro tal como se determina mediante cromatografía de exclusión de tamaño (véase ejemplo 12 de WO 01/58275).
- 35 En otras realizaciones particulares el preparado de fitasa es al menos un 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94 o al menos un 95 % puro como se determina mediante este método.
- [0158] Un preparado polipeptídico sustancialmente puro y/o bien definido es ventajoso.
Por ejemplo, es mucho más fácil dosificar correctamente en el pienso un polipéptido que está esencialmente libre de interferir o contaminar a otros polipéptidos.
El término dosificar correctamente se refiere en particular al objetivo de obtener resultados consistentes y constantes, y la capacidad de optimizar la dosificación basándose en el efecto deseado.
- 40 [0159] Para el uso en piensos para animales, sin embargo, el polipéptido de fitasa de la invención no necesita ser tan puro; puede, por ejemplo, incluir otros polipéptidos, en cuyo caso podría denominarse preparado de fitasa.
- [0160] El preparado de fitasa puede ser (a) añadido directamente al pienso (o usado directamente en un proceso de tratamiento de proteínas), o (b) se puede usar en la producción de una o varias composiciones intermedias tales como aditivos de piensos o premezclas que se añaden al pienso posteriormente (o se usan en un proceso de tratamiento).
El grado de pureza anteriormente descrito se refiere a la pureza del preparado polipeptídico original, si se usa según la (a) o la (b) anteriores.
- 50 [0161] Los preparados polipeptídicos con purezas de este orden de magnitud son particularmente obtenibles usando métodos recombinantes de producción, mientras que no son tan fáciles de obtener y también están sujetos a una variación entre lotes mucho más alta cuando el polipéptido se produce por métodos de fermentación tradicionales.
- 55 [0162] Tal preparado polipeptídico puede, por supuesto, mezclarse con otros polipéptidos.
- [0163] El polipéptido se puede añadir al pienso en cualquier forma, ya sea como un polipéptido relativamente puro, ya sea mezclado con otros componentes destinados a ser añadidos a piensos para animales, es decir, en forma de aditivos de pienso, tales como las llamadas premezclas para piensos para animales.
- 60 [0164] En otro aspecto la presente invención se refiere a composiciones para usar en piensos para animales,
- 65

tales como piensos para animales y aditivos de pienso, por ejemplo, premezclas.

[0165] Aparte del polipéptido de la invención, los aditivos de pienso de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble y/o al menos una vitamina hidrosoluble y/o al menos un oligoelemento.

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

[0166] Además, ingredientes opcionales de aditivos de piensos son agentes colorantes, por ejemplo, carotenoides tales como beta-caroteno, astaxantina y luteína; aromatizantes; estabilizadores; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados; especies reactivas generadoras de oxígeno ; y/o al menos otro polipéptido seleccionado de entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); fosfatasa (EC 3.1.3.1; EC 3.1.3.2; EC 3.1.3.39); xilanas (EC 3.2.1.8); galactanasa (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4.-.-); fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3,2,1,1); y/o beta-glucanasa (EC 3,2,1,4 o EC 3,2,1,6).

10
15 [0167] En una realización particular estos otros polipéptidos están bien definidos (como se ha definido anteriormente para preparados de fitasa).

[0168] La fitasa de la invención también se puede combinar con otras fitasas, por ejemplo, fitasas de ascomiceto tales como fitasas de *Aspergillus*, por ejemplo, derivadas de *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*; o fitasas de basidiomiceto, por ejemplo, derivadas de *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Trametes pubescens* o *Paxillus involutus*; o derivadas, fragmentos o variantes de las mismas que tienen actividad de fitasa.

20
25 [0169] Así, en realizaciones preferidas del uso de la invención en piensos para animales, y en realizaciones preferidas del aditivo de pienso y del pienso para animales de la invención, la fitasa de la invención se combina con dichas fitasas.

[0170] Ejemplos de péptidos antimicrobianos (PAM) son CAP18, leucocina A, tritripticina, protegina-1, Thanatina, defensina, lactoferrina, lactoferricina y ovispirina tal como novispirina (Robert Lehrer, 2000), plectasinas y estatinas, incluyendo los compuestos y polipéptidos descritos en WO 03/044049 y WO 03/048148, así como variantes o fragmentos de ellos que retienen actividad antimicrobiana.

30
35 [0171] Ejemplos de polipéptidos antifúngicos (PAF) son los péptidos de *Aspergillus giganteus* y de *Aspergillus niger*, así como variantes y fragmentos de los mismos que retienen actividad antifúngica, tal como se describe en WO 94/01459 y WO 02/090384.

[0172] Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos grasos poliinsaturados C18, C20 y C22 tales como el ácido araquidónico, el ácido docosahexaenoico, el ácido eicosapentanoico y el ácido gamma-linolénico.

40 [0173] Ejemplos de especies reactivas generadoras de oxígeno son productos químicos tales como perborato, persulfato o percarbonato; y polipéptidos tales como oxidasa, oxigenasa o sintetasa.

[0174] Normalmente, las vitaminas liposolubles e hidrosolubles, así como los oligoelementos, forman parte de lo que se llama una premezcla destinada a ser añadida al pienso, mientras que los macrominerales habitualmente se añaden al pienso por separado.
45 Cualquiera de estos tipos de composición, cuando se enriquece con un polipéptido de la invención, es un aditivo de pienso de la invención.

[0175] En una realización particular, el aditivo de pienso de la invención está destinado a ser incluido (o prescrito para tener que ser incluido) en dietas o piensos para animales o pienso a niveles de un 0,01 a un 10,0 %; más particularmente un 0,05 a un 5,0 %; o un 0,2 a un 1,0 % (% calculado como g aditivo por 100 g pienso).
50 Esto es así en particular para las premezclas.

[0176] Las siguientes son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:
55 Ejemplos de vitaminas liposolubles son vitamina A, vitamina D3, vitamina E y vitamina K, por ejemplo, vitamina K3.

[0177] Ejemplos de vitaminas hidrosolubles son vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, por ejemplo, D-pantotenato de calcio.
60

[0178] Ejemplos de oligoelementos son manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, selenio y cobalto.

[0179] Ejemplos de macrominerales son calcio, fósforo y sodio.

65 [0180] Los requisitos nutricionales de estos componentes (ejemplificados con aves y lechones/cerdos) se enumeran en la tabla A de WO 01/58275.

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

5 [0181] Alternativamente, el aditivo de pienso de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la tabla A de WO 01/58275.

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

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

[0182] La presente invención también se refiere a composiciones de pienso para animales.

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

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

Las dietas del pescado se pueden caracterizar como se indica en la columna 4 de esta tabla B. Además, tales dietas del pescado tienen normalmente un contenido en grasa bruta de 200-310 g/kg.

20 [0183] Una composición de pienso para animales según la invención tiene un contenido de proteína bruta de 50-800 g/kg y comprende además al menos un polipéptido como se reivindica en este documento.

25 [0184] Además, o alternativamente (al contenido de proteína bruta indicado antes), la composición de pienso para animales de la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.

[0185] La proteína bruta se calcula como el nitrógeno (N) multiplicado por un factor 6,25, es decir, proteína bruta (g/kg) = N (g/kg) x 6,25.

30 El contenido de nitrógeno se determina mediante el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14^a ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

35 [0186] La energía metabolizable se puede calcular basándose en la publicación del NRC Nutrient requirements in swine, novena edición revisada 1988, subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council. National Academy Press, Washington, D.C., págs. 2-6, y la European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, Países Bajos. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.

40 [0187] El contenido dietético de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en dietas completas para animales se calcula basándose en tablas de piensos tales como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6,8219 pk Ielstad. ISBN 90-72839-13-7.

45 [0188] En una realización particular, la composición de pienso para animales de la invención contiene al menos una proteína.

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

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

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

55 [0189] Las proteínas vegetales se pueden derivar de fuentes de proteína vegetal, tales como leguminosas y cereales, por ejemplo, materiales de plantas de las familias Fabaceae (leguminosae), Cruciferaeae, Chenopodiaceae y Poaceae, tales como harina de soja, harina de lupino y harina de semilla de colza.

60 [0190] En una realización particular la fuente de proteína vegetal es material de una o varias plantas de la familia Fabaceae, por ejemplo, soja, lupinos, guisantes o judías.

[0191] En otra realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o varias plantas de la familia Chenopodiaceae, por ejemplo, remolacha, remolacha azucarera, espinacas o quinoa.

65 [0192] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son semilla de colza, semilla de girasol, semilla de algodón y repollo.

[0193] La semilla de soja es una fuente de proteína vegetal preferida.

[0194] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son cereales tales como cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, triticale y sorgo.

[0195] En otras realizaciones particulares, la composición de pienso para animales de la invención contiene un 0-80 % de maíz; y/o un 0-80 % de sorgo; y/o un 0-70 % de trigo; y/o un 0-70 % de cebada; y/o un 0-30 % de avena; y/o un 0-40 % de harina de soja; y/o un 0-25 % de harina de pescado; y/o un 0-25 % de harina de carne y hueso; y/o un 0-20 % de suero de leche.

[0196] Las dietas para animales pueden, por ejemplo, fabricarse como pienso triturado (no granulado) o pienso granulado.

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

Se pueden añadir polipéptidos como formulaciones polipeptídicas sólidas o líquidas.

Por ejemplo, una formulación polipeptídica sólida se añade típicamente antes o durante la etapa de mezclado; y una preparación polipeptídica líquida se añade típicamente después de la etapa de granulación.

El polipéptido también se puede incorporar en un aditivo de pienso o premezcla.

[0197] La concentración final de polipéptido en la dieta está en el intervalo de 0,01-200 mg de proteína polipeptídica por kg dieta, por ejemplo, en el intervalo de 5-30 mg de proteína polipeptídica por kg de dieta animal.

[0198] La fitasa de la invención debería, por supuesto, aplicarse en una cantidad eficaz, es decir, en una cantidad adecuada para mejorar la solubilización y/o el valor nutricional del pienso.

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

[0199] Para determinar los mg de proteína polipeptídica fitasa por kg de pienso, la fitasa se purifica a partir de la composición de pienso, y la actividad específica de la fitasa purificada se determina usando un ensayo pertinente.

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

[0200] Los mismos principios se aplican para determinar los mg proteína polipeptídica fitasa en aditivos de pienso.

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

Ejemplos

[0201] Los productos químicos usados son productos comerciales de al menos calidad reactiva.

Ejemplo 1: preparación de variantes y determinación de la actividad

Preparación de variantes de fitasa

Expresión de variantes de fitasa en *Aspergillus oryzae*

[0202] Los constructos que comprenden los genes de la variante de fitasa de *Buttiauxella* se utilizan para construir vectores de expresión para *Aspergillus*.

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

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

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

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

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

Purificación de variantes de fitasa de *Buttiauxella*

[0203] El sobrenadante de fermentación con la variante de fitasa se filtra a través de un filtro superior de botella rápido PES con un límite de 0,22 µm.

5 La solución resultante se diluyó con agua hasta el doble de volumen y se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético. Ocasionalmente, la solución puede hacerse un poco turbia y esto se quita filtrándola a través de un filtro superior de botella rápido PES con un límite de 0,22 µm.

[0204] Después del pretratamiento la variante de fitasa se purifica mediante cromatografía en S-sefarosa, aproximadamente 30 ml en una columna XK26, que usa como tampón A acetato sódico 50 mM a pH 4,5, y como tampón B acetato sódico 50 mM + NaCl 1 M a pH 4,5.

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

[0205] En algunos casos la solución con la variante de fitasa purificada es concentrada utilizando un dispositivo de filtración Amicon ultra-15 con una membrana de límite 30 kDa.

Determinación de la actividad de fosfatasa

[0206] 75 microlitros de solución enzimática con fitasa se depositan en un pocillo de una placa de microtitulación, por ejemplo, G. NUNC 269620, y se añade un sustrato de 75 microlitros (para preparar el sustrato se disuelven dos pastillas de 5 mg de p-nitrofenil fosfato (Sigma, N° de catálogo N-9389) en 10 ml de tampón de Na-acetato 0,1 M, pH 5,5).

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

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

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

Determinación de la actividad de fitasa

[0207] 75 microlitros de solución enzimática con fitasa, apropiadamente diluidos en acetato sódico 0,25 M, 0,005 % (p/v) de Tween-20, pH5,5, se depositan en un pocillo de una placa de microtitulación, por ejemplo, G. NUNC 269620, y se añade un sustrato de 75 microlitros (preparado disolviendo 100 mg de fitato de sodio de arroz (N° de catálogo de Aldrich 274321) en 10 ml de tampón de acetato sódico 0,25 M, pH5,5).

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

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

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

Ejemplo 2: actividad específica

[0208] La actividad específica de una variante de fitasa se determina en muestras altamente purificadas dializadas contra acetato sódico 250 mM a pH 5,5.

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

[0209] La concentración de proteínas se determina mediante el análisis de los aminoácidos de la siguiente manera: se hidroliza una parte alícuota de la muestra en HCl 6N y fenol al 0,1 % durante 16 h a 110°C en un tubo de vidrio evacuado.

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

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

[0210] La actividad de fitasa se determina en unidades de FYT tal como se describe en el ejemplo 1

("Determinación de la actividad de fitasa"), y la actividad específica se calcula como la actividad de fitasa medida en unidades FYT por mg proteína enzimática de variante de fitasa.

Ejemplo 3: termoestabilidad mediante DSC

[0211] La termoestabilidad de la fitasa de Buttiauxella (número de acceso AEH25051 en GENESEQP) y de la variante E54C/A101C/Q143C/I201C, ambas purificadas como se describe en el ejemplo 1, se determinaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) usando un instrumento VP-capillary DSC (MicroCal Inc., Piscataway, NJ, EE.UU.) equipado con un automuestreador.

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

[0212] Las soluciones de muestra y de referencia (aprox. 0,5 ml) fueron preequilibradas térmicamente durante 10 minutos a 20 °C y la exploración de DSC se realizó entre 20 y 80 °C a una tasa de barrido de 200 K/hora. El tratamiento de datos se realiza utilizando el software MicroCal Origin (versión 7.0383). Las temperaturas de desnaturalización se determinaron con una precisión de aproximadamente +/- 0,5°C.

Tabla 2. Termoestabilidad comparativa de las fitasas de Buttiauxella

Fitasa	Td (°C)
AEH25051	56,5
E54C/A101C/Q143C/I201C=A/C	63,1

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

Ejemplo 4: perfil de temperatura

[0213] El perfil de temperatura (la actividad de fitasa como función de la temperatura) se determinó para la fitasa de Buttiauxella (número de acceso AEH25051 en GENESEQP) y sus variantes en el intervalo de temperaturas de 20-80°C esencialmente como se ha descrito anteriormente ("Determinación de la actividad de fitasa").

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

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

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

Tabla 3: perfiles relativos de temperatura

Variante de fitasa	Temperatura (°C)											
	20	30	40	50	55	60	63	65	67	70	75	80
AEH25051	27	43	64	84	100	98	68	26	14	9	7	7
D33C/E54C/A101 C/W 179C=B/C	26	44	66	88	98	100	92	66	38	10	7	5
E54C/A101 C/Q143C/I201 C=A/C	26	45	66	87	100	96	79	52	32	10	7	6

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

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

[0214] El rendimiento de diferentes variantes de fitasa de la invención en pienso para animales se compara en un modelo in vitro al rendimiento de una proteína de referencia tal como la SEC ID N° 2.

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

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

La comparación se realiza de la siguiente manera:

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

5 [0215] Los gránulos de pienso de un ensayo de alimentación de un pollo para consumo - con maíz, harina de soja y aceite de soja como constituyentes principales - se preincuban a 40°C y pH 4,6 durante 5 minutos y después se añaden dosis adecuadas de las fitasas (se usan dosis idénticas para todas las fitasas que deben examinarse para permitir la comparación), por ejemplo, entre 125 a 1000 unidades de fitasa FYT/kg pienso, o del tampón en las muestras de control. Después de 5 minutos de incubación, se añade pepsina (3000 U/g pienso) a una solución de HCl y de esta manera el pH se reduce a 3. Las muestras se incuban luego a 40°C durante otros 5 minutos.

10 [0216] Las reacciones se detienen y se extraen ácido fítico y fosfatos de inositol mediante adición de HCl hasta una concentración final 0,5 M e incubación a 40°C durante 2 horas, seguida de un ciclo de congelación-descongelación y una incubación de 1 hora a 40°C.

15 [0217] El ácido fítico y fosfatos de inositol se separan mediante cromatografía iónica de alto rendimiento tal como describen en Chen et al. en Journal of Chromatography A (2003) vol. 1018, págs. 41-52 y se cuantifica tal como describen Skoglund et al. en J. Agric.Food Chem. (1997), vol. 45, págs. 431-436.

20 [0218] Se calcula entonces la degradación de fitato como la diferencia de fósforo unido al inositol-6-fosfato (IP6-P) entre las muestras de fitasa tratada y no tratada. El rendimiento relativo de la variante se calcula como el porcentaje de degradación de fitato por la fitasa de tipo salvaje.

Ejemplo 6: rendimiento en un ensayo en cerdos in vivo

25 [0219] Evaluación comparativa de los efectos de cantidades graduadas de la fitasa de tipo salvaje de *Buttiauxella* y una variante, en la digestibilidad fecal y la excreción de fósforo y calcio en cerdos en crecimiento.

30 [0220] Se usan sesenta y cuatro cerdos Large White x Landrace que tienen un peso corporal inicial de 43,55 ± 4,35 kg.

[0221] Los animales se alojan en corrales en una habitación de ambiente controlado. Cada corral tiene un suelo de alambre soldado recubierto de plástico y está equipado con dos tetinas para agua y cuatro comederos individualizados de acero inoxidable. La temperatura ambiente era 21-22° C y el porcentaje de humedad era del 50 %.

35 [0222] Los cerdos se alimentan de una dieta basal formulada para proporcionar fósforo (P) de origen exclusivamente vegetal durante un periodo adaptativo de 14 días. Después de ese periodo se reparte en 16 grupos iguales de 4 animales cada uno.

40 [0223] Son alimentados durante 12 días con la dieta basal o con dicha dieta suplementada con 1000 o 2000 U/kg de la fitasa de tipo salvaje de *Buttiauxella* o con 500, 1000 o 2000 U/kg de la variante designada 100 que tiene 2 enlaces disulfuro adicionales.

45 [0224] Un trazador indigerible (óxido de cromo) se añade en una concentración del 0,4 % a todas las dietas permitiendo el cálculo de la digestibilidad de P y calcio (Ca). El pienso se distribuye *ad libitum* en forma de triturado, bajo control de consumo de pienso de corral, y los animales tienen acceso libre a agua potable. La digestibilidad de Ca no se corrige para la ingesta de Ca con agua potable.

50 [0225] Las concentraciones fecales de P, Ca y Cr se miden en el 12º día del segundo periodo. Las heces se muestrearon individualmente, en aproximadamente la misma cantidad a la misma hora del día, durante los 3 últimos días que preceden a esa fecha.

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

60 [0226]

<110> Novozymes A/S

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

65 <130> 11707-EP-ETD

ES 2 758 795 T3

<140> EP 11711843.0-1223
 <141> 2011-03-25

5 <150> EP 10158026.4
 <151> 2010-03-26

<160> 28

10 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 1341
 <212> ADN

15 <213> *Buttiauxella gaviniae* DSM18930

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1338)

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(99)

25 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (100)..(1338)

30 <400> 1
 atg acg atc tct gcg ttt aac cac aaa aaa ctg acg ctt cac cct ggt 48
 Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn His Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
 -30 -25 -20

35 ctg ttc gta gca ctg agc gcc ata ttt tca tta ggc tct acg gca tat 96
 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 -15 -10 -5

40 gcc aat gac act ccc gct tca ggc tac cag gtt gaa aaa gtg gtt atc 144
 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 -1 1 5 10 15

45 ctc agc cgc cac ggt gtg cga gcc ccc acc aaa atg aca cag act atg 192
 Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 20 25 30

50 cgc gac gta aca ccc aat acc tgg cca gaa tgg cca gta aaa ctg ggt 240
 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 35 40 45

tat atc acg cca cgc ggt gag cat ctg att agc ctg atg ggc ggg ttt 288
 Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 50 55 60

55 tat cgc gag aag ttt caa caa cag ggc att tta tcg cag ggc agt tgc 336
 Tyr Arg Glu Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 65 70 75

60 ccc aca cca aac tca att tat gtc tgg gca gac gtt gat cag cgc acg 384
 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 80 85 90 95

65 ctt aaa act ggc gaa gct ttc ctg gca ggg ctt gct ccg caa tgt ggt 432
 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly
 100 105 110

tta act att cac cac caa cag aat ctt gaa aaa gcc gat ccg ctg ttc 480
 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 115 120 125

ES 2 758 795 T3

	cat ccg gtg aaa gcg ggc acc tgt tca atg gat aaa act cgg ctc caa	528
	His Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Arg Leu Gln	
5	130 135 140	
	cag gcc gtt gaa aaa gaa gct caa acg ccc att gag aat ctg aac cag	576
	Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Glu Asn Leu Asn Gln	
	145 150 155	
10	cac tat att ccc tct ctg gct ttg atg aac acg acc ctc aac ttt tcg	624
	His Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser	
	160 165 170 175	
15	acg tct gcc tgg tgt cag aaa cac agc gcg gat aaa agc tgt gat tta	672
	Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu	
	180 185 190	
20	gcg caa tcc atg ccg agc aag ctg tcg ata aaa gat aat ggc aac aaa	720
	Ala Gln Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys	
	195 200 205	
25	gtc gct ctc gat ggg gct gtt ggt ctt tca tcc act ctt gct gaa att	768
	Val Ala Leu Asp Gly Ala Val Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile	
	210 215 220	
30	ttc ctg ctg gaa tat gcg caa ggg atg ccg caa gcg gcc tgg ggg aag	816
	Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Lys	
	225 230 235	
35	att cat tca gag caa gat tgg gcg gag ttg ctg aaa ctg cat aac gcc	864
	Ile His Ser Glu Gln Asp Trp Ala Glu Leu Leu Lys Leu His Asn Ala	
	240 245 250 255	
40	cag ttt gat ttg atg gcg cgc aca cct tat atc gcc aga cat aac gga	912
	Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Asn Gly	
	260 265 270	
45	acg cct tta ttg cag gcc atc agc aac gcg ctg gac cca aac gcc acc	960
	Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asp Pro Asn Ala Thr	
	275 280 285	
50	gca agc aag ctg cct gat atc tcg ccg gac aat aag atc ctg ttt att	1008
	Ala Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile	
	290 295 300	
55	gcc gga cac gat acc aat atc gcc aac atc tca ggc atg ctc aac atg	1056
	Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ser Gly Met Leu Asn Met	
	305 310 315	
60	cgc tgg acg cta ccc gga caa cca gat aac act cct cca ggc ggc gct	1104
	Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala	
	320 325 330 335	
65	ttg atc ttt gaa cgc ctg gct gat aaa gct ggg aaa caa tat gtt agt	1152
	Leu Ile Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ala Gly Lys Gln Tyr Val Ser	
	340 345 350	
70	gtg agt atg gtg tat cag aca ctc gag cag ttg cgc gct caa aca ccg	1200
	Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ala Gln Thr Pro	
	355 360 365	
75	ctt agc ctt aag gaa ccc gca gga agt gtg cag cta aaa att cct ggc	1248
	Leu Ser Leu Lys Glu Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly	
	370 375 380	
80	tgt aat gac cag acg gct gaa gga tat tgc ccg ctg cca aca ttt aaa	1296
	Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Pro Thr Phe Lys	
	385 390 395	

ES 2 758 795 T3

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

1341

5

<210> 2
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> *Buttiauxella gaviniae* DSM18930

10

<400> 2

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

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

55

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

60

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

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

65

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

Ala Gln Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys

ES 2 758 795 T3

```

                195                200                205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3
<211> 1271
<212> ADN
<213> Buttiauxella agrestis DSM18931

<220>
<221> CDS
<222> (3)..(1268)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (3)..(29)

```

ES 2 758 795 T3

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (30)..(1268)

5 <400> 3
 ca ttt tca tta ggt tta acg gca tat gcc agc gac act ccc gct tca 47
 Phe Ser Leu Gly Leu Thr Ala Tyr Ala Ser Asp Thr Pro Ala Ser
 -5 -1 1 5

10 ggc tac cag att gaa aaa gtg gta ata ctc agc cgc cac ggt gtg cga 95
 Gly Tyr Gln Ile Glu Lys Val Val Ile Leu Ser Arg His Gly Val Arg
 10 15 20

15 gca ccc acc aaa atg aca cag acc atg cgc gac gta aca ccc aat tcc 143
 Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met Arg Asp Val Thr Pro Asn Ser
 25 30 35

20 tgg ccc gaa tgg ccg gta aaa ttg ggt tat atc acg cca cgc ggt gag 191
 Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu
 40 45 50

25 cat ctg att agc ctg atg ggc ggg ttt tat cgc cag aag ttt caa caa 239
 His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln
 55 60 65 70

aag ggc att tta tcg cag ggc agt tgc ccc aca cca aac tca att tat 287
 Lys Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr
 75 80 85

30 gtc tgg gca gac gtt gat cag cgc acg ctt aaa acg ggc gaa gct ttc 335
 Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe
 90 95 100

35 ctg gca ggg ctt gct ccg caa tgt ggt tta act att cac cac cag cag 383
 Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly Leu Thr Ile His His Gln Gln
 105 110 115

40 aat ctt gaa aaa gcc gat ccg ctg ttc cat ccg gtg aaa gcg ggc acc 431
 Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe His Pro Val Lys Ala Gly Thr
 120 125 130

45 tgt tca atg gat aaa act caa gtc cag cag gcc gtt gaa aaa gaa gct 479
 Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala
 135 140 145 150

caa atg ccc att gag aat ctg aac cag cac tat att ccc tct ctg gcc 527
 Gln Met Pro Ile Glu Asn Leu Asn Gln His Tyr Ile Pro Ser Leu Ala
 155 160 165

50 ttg atg aac acg act ctc aac ttt tcg acg tct gcc tgg tgc cag aaa 575
 Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys
 170 175 180

55 cac agc gcg gat aaa agc tgt gat tta gcg caa tcc atg ccg agc aag 623
 His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu Ala Gln Ser Met Pro Ser Lys
 185 190 195

60 ctg tcg ata aaa gat aat ggc aac aaa gtc gct ctt gat ggg gcc att 671
 Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile
 200 205 210

65 ggc ctt tcg tct acg ctt gct gaa att ttc ctg ctg gaa tat gcg caa 719
 Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln
 215 220 225 230

ggg atg ccg caa gcg gcg tgg ggg aat att cat tca gag caa gag tgg 767
 Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn Ile His Ser Glu Gln Glu Trp
 235 240 245

ES 2 758 795 T3

gcg tcg cta ttg aaa ctg cat aac acc cag ttt gat ttg atg gcg cgc 815
Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Thr Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg
250 255 260

5 aca cct tac atc gcc gca cat aac gga acg ccg tta ttg cag acc atc 863
Thr Pro Tyr Ile Ala Ala His Asn Gly Thr Pro Leu Leu Gln Thr Ile
265 270 275

10 agc aac gcg ctg gag ccg aaa gcc gac gta agc aaa ctg cct gat atc 911
Ser Asn Ala Leu Glu Pro Lys Ala Asp Val Ser Lys Leu Pro Asp Ile
280 285 290

15 tca tct gac aat aag atc ctg ttt att gcc gga cac gat acc aat att 959
Ser Ser Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Ile
295 300 305 310

20 gcc aat atc gca ggc atg ctc aac atg cgc tgg acg cta cca ggg caa 1007
Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln
315 320 325

ccc gat aac acc cca ccg ggc ggc gct tta gtc ttt gag cgt ttg gcc 1055
Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala
330 335 340

25 gat aag tca ggg aaa caa tat att agc gtg agc atg gtg tat cag act 1103
Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Ile Ser Val Ser Met Val Tyr Gln Thr
345 350 355

30 ctt gag cag ttg cgc gct caa aca cca ctt agc ctt aat gaa cca gcg 1151
Leu Glu Gln Leu Arg Ala Gln Thr Pro Leu Ser Leu Asn Glu Pro Ala
360 365 370

35 ggt agc gta cag cta aaa att cct ggc tgt aac gac cag acg gct gaa 1199
Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu
375 380 385 390

40 gga tac tgc cca ctg tcg acg ttc aca cgc gtg gtt agc caa agc gtg 1247
Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr Arg Val Val Ser Gln Ser Val
395 400 405

45 gaa cca ggc tgc cag cta ccg taa 1271
Glu Pro Gly Cys Gln Leu Pro
410

<210> 4
<211> 422
<212> PRT
50 <213> Buttiauxella agrestis DSM18931
<400> 4

Phe Ser Leu Gly Leu Thr Ala Tyr Ala Ser Asp Thr Pro Ala Ser Gly
55 -5 -1 1 5

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

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

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

Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Lys

ES 2 758 795 T3

				60					65					70			
5	Gly	Ile	Leu	Ser 75	Gln	Gly	Ser	Cys	Pro 80	Thr	Pro	Asn	Ser	Ile 85	Tyr	Val	
10	Trp	Ala	Asp 90	Val	Asp	Gln	Arg	Thr 95	Leu	Lys	Thr	Gly	Glu 100	Ala	Phe	Leu	
15	Ala	Gly 105	Leu	Ala	Pro	Gln	Cys 110	Gly	Leu	Thr	Ile	His 115	His	Gln	Gln	Asn	
20	Leu	Glu	Lys	Ala	Asp	Pro 125	Leu	Phe	His	Pro	Val 130	Lys	Ala	Gly	Thr	Cys 135	
25	Ser	Met	Asp	Lys	Thr 140	Gln	Val	Gln	Gln	Ala 145	Val	Glu	Lys	Glu	Ala	Gln 150	
30	Met	Pro	Ile	Glu 155	Asn	Leu	Asn	Gln	His 160	Tyr	Ile	Pro	Ser	Leu 165	Ala	Leu	
35	Met	Asn	Thr 170	Thr	Leu	Asn	Phe	Ser 175	Thr	Ser	Ala	Trp	Cys 180	Gln	Lys	His	
40	Ser	Ala 185	Asp	Lys	Ser	Cys	Asp 190	Leu	Ala	Gln	Ser	Met 195	Pro	Ser	Lys	Leu	
45	Ser	Ile	Lys	Asp	Asn	Gly 205	Asn	Lys	Val	Ala	Leu 210	Asp	Gly	Ala	Ile	Gly 215	
50	Leu	Ser	Ser	Thr 220	Leu	Ala	Glu	Ile	Phe	Leu 225	Leu	Glu	Tyr	Ala	Gln 230	Gly	
55	Met	Pro	Gln	Ala 235	Ala	Trp	Gly	Asn	Ile 240	His	Ser	Glu	Gln	Glu 245	Trp	Ala	
60	Ser	Leu	Leu	Lys 250	Leu	His	Asn	Thr 255	Gln	Phe	Asp	Leu	Met 260	Ala	Arg	Thr	
65	Pro	Tyr 265	Ile	Ala	Ala	His	Asn 270	Gly	Thr	Pro	Leu	Leu 275	Gln	Thr	Ile	Ser	
70	Asn	Ala	Leu	Glu	Pro	Lys 285	Ala	Asp	Val	Ser	Lys 290	Leu	Pro	Asp	Ile	Ser 295	
75	Ser	Asp	Asn	Lys	Ile 300	Leu	Phe	Ile	Ala	Gly 305	His	Asp	Thr	Asn	Ile 310	Ala	
80	Asn	Ile	Ala	Gly 315	Met	Leu	Asn	Met	Arg 320	Trp	Thr	Leu	Pro	Gly 325	Gln	Pro	
85	Asp	Asn	Thr 330	Pro	Pro	Gly	Gly	Ala 335	Leu	Val	Phe	Glu	Arg 340	Leu	Ala	Asp	

ES 2 758 795 T3

5 Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Ile Ser Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu
 345 350 355
 10 Glu Gln Leu Arg Ala Gln Thr Pro Leu Ser Leu Asn Glu Pro Ala Gly
 360 365 370 375
 15 Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly
 380 385 390
 20 Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu
 395 400 405
 25 Pro Gly Cys Gln Leu Pro
 410
 <210> 5
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Buttiauxells agrestis DSM18932
 30 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1338)
 35 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(99)
 40 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (100)..(1338)
 45 <400> 5
 atg acg ttc tct gcg ttt aac cgc aaa aaa ctg acg ctt cac cct ggt 48
 Met Thr Phe Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
 -30 -25 -20
 50 ctg ttc gta gca ctg agc gcc ata ttt tca tta ggc tct acg gcc tat 96
 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 -15 -10 -5
 55 gcc aac gac act ccc gct tca ggc tac cag gtt gaa aaa gtg gta atc 144
 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 -1 1 5 10 15
 60 ctc agc cgc cac ggg gtg cga gca ccc acc aaa atg aca cag acc atg 192
 Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 20 25 30
 65 cgc gac gta aca ccc aat acc tgg ccc gaa tgg cca gta aaa ttg ggt 240
 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 35 40 45
 70 tat atc acg cca cgc ggt gag cat ctg att agc ctg atg ggc ggg ttt 288
 Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 50 55 60
 75 tat cgc gag aag ttt caa caa cag ggc att tta tcg cag ggc agt tgc 336
 Tyr Arg Glu Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 65 70 75

ES 2 758 795 T3

	ccc gca cca aac tca att tat gtc tgg gca gac gtt gat cag cgc acg	384
	Pro Ala Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr	
	80 85 90 95	
5	ctt aaa act ggc gaa gct ttc ctg gca ggg ctt gct ccg caa tgt ggt	432
	Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly	
	100 105 110	
10	tta act att cac cac cag cag aat ctt gaa aaa gcc gat ccg ctg ttc	480
	Leu Thr Ile His His Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe	
	115 120 125	
15	cat ccg gtg aaa gcg ggc acg tgt tca atg gat aaa act cag gtc caa	528
	His Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln	
	130 135 140	
20	cag gcc gtt gaa aaa gaa gct caa acc ccc att gat aat ctg aat cag	576
	Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln	
	145 150 155	
25	acg tct gcc tgg tgt cag aaa cac agc gcg gat aaa agc tgt gat tta	672
	Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu	
	180 185 190	
30	gcg caa tcc atg ccg agc aag ctg tcg ata aaa gat aat ggc aac aaa	720
	Ala Gln Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys	
	195 200 205	
35	gtc gct ctc gac ggg gcc att ggc ctt tcg tct acg ctt gct gaa att	768
	Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile	
	210 215 220	
40	ttc ctg ctg gaa tat gcg caa ggg atg ccg caa gcg gcg tgg ggg aat	816
	Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn	
	225 230 235	
45	att cat tca gag caa gag tgg gcg tcg cta ctg aaa ctg cat aac gcc	864
	Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Ala	
	240 245 250 255	
50	cag ttt gat ttg atg gcg cgc aca cct tac atc gcc aca cat aac ggc	912
	Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Thr His Asn Gly	
	260 265 270	
55	acg cct tta ttg cag acc atc agc aac gcg ctg gag ccg aaa gcc gac	960
	Thr Pro Leu Leu Gln Thr Ile Ser Asn Ala Leu Glu Pro Lys Ala Asp	
	275 280 285	
60	gta agc aaa ctg cct ggt atc tca cct gac aat aag atc ctg ttt ctt	1008
	Val Ser Lys Leu Pro Gly Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Leu	
	290 295 300	
65	gcc ggg cac gat acc aat att gcc aat atc gca ggc atg ctc aac atg	1056
	Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met	
	305 310 315	
70	cgc tgg acg cta cca ggg caa ccc gat aac acc cct ccg ggc ggc gct	1104
	Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala	
	320 325 330 335	
75	tta gtc ttt gag cgt ttg gcc gat aag tca ggg aaa caa tat gtt agc	1152
	Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser	
	340 345 350	
80	gtg agc atg gtg tat cag act ctc gag cag ttg cga tcc caa aca cca	1200

ES 2 758 795 T3

Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 355 360 365
 5 ctt agc ctt aat caa cct gcg gga agc gtt cag cta aaa att cct ggc 1248
 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 370 375 380
 10 tgt aac gac cag acg gct gaa gga tac tgc cca ctg tcg aca ttc aca 1296
 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 385 390 395
 15 cgc gtg gtt agc caa agc gtg gaa ccc ggc tgc cag cta cag taa 1341
 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 400 405 410
 <210> 6
 <211> 446
 <212> PRT
 20 <213> Buttiauxells agrestis DSM18932
 <400> 6
 25 Met Thr Phe Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
 -30 -25 -20
 30 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 -15 -10 -5
 35 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 -1 1 5 10 15
 40 Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 20 25 30
 45 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 35 40 45
 50 Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 50 55 60
 55 Tyr Arg Glu Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 65 70 75
 60 Pro Ala Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 80 85 90 95
 65 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly
 100 105 110
 70 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 115 120 125
 75 His Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln
 130 135 140
 80 Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln
 145 150 155

ES 2 758 795 T3

5 His Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 160 165 170 175
 Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 180 185 190
 10 Ala Gln Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys
 195 200 205
 15 Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 210 215 220
 20 Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn
 225 230 235
 25 Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Ala
 240 245 250 255
 30 Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Thr His Asn Gly
 260 265 270
 35 Thr Pro Leu Leu Gln Thr Ile Ser Asn Ala Leu Glu Pro Lys Ala Asp
 275 280 285
 40 Val Ser Lys Leu Pro Gly Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Leu
 290 295 300
 45 Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met
 305 310 315
 50 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 320 325 330 335
 55 Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 340 345 350
 60 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 355 360 365
 65 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 370 375 380
 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 385 390 395
 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 400 405 410
 <210> 7
 <211> 446
 <212> PRT

ES 2 758 795 T3

<213> Buttiauxella

<400> 7

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

10 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30

15 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45

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

25 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 65 70 75 80

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

35 Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110

40 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 115 120 125

45 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His
 130 135 140

50 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160

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

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

65 His Tyr Ile Pro Phe Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 195 200 205

70 Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 210 215 220

75 Gly Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys
 225 230 235 240

80 Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 245 250 255

85 Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn

ES 2 758 795 T3

				260						265										270
5	Ile	His	Ser	Glu	Gln	Glu	Trp	Ala	Ser	Leu	Leu	Lys	Leu	His	Asn	Val				
			275					280					285							
10	Gln	Phe	Asp	Leu	Met	Ala	Arg	Thr	Pro	Tyr	Ile	Ala	Arg	His	Asn	Gly				
		290					295					300								
15	Thr	Pro	Leu	Leu	Gln	Ala	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu	Asn	Pro	Asn	Ala	Thr				
	305					310					315					320				
20	Glu	Ser	Lys	Leu	Pro	Asp	Ile	Ser	Pro	Asp	Asn	Lys	Ile	Leu	Phe	Ile				
					325					330					335					
25	Ala	Gly	His	Asp	Thr	Asn	Ile	Ala	Asn	Ile	Ala	Gly	Met	Leu	Asn	Met				
				340					345					350						
30	Arg	Trp	Thr	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Ala				
			355					360					365							
35	Leu	Val	Phe	Glu	Arg	Leu	Ala	Asp	Lys	Ser	Gly	Lys	Gln	Tyr	Val	Ser				
	370						375					380								
40	Val	Ser	Met	Val	Tyr	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Leu	Arg	Ser	Gln	Thr	Pro				
	385					390					395					400				
45	Leu	Ser	Leu	Asn	Gln	Pro	Ala	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Lys	Ile	Pro	Gly				
				405						410					415					
50	Cys	Asn	Asp	Gln	Thr	Ala	Glu	Gly	Tyr	Cys	Pro	Leu	Ser	Thr	Phe	Thr				
				420					425						430					
55	Arg	Val	Val	Ser	Gln	Ser	Val	Glu	Pro	Gly	Cys	Gln	Leu	Gln						
			435					440					445							
60	<210>	8																		
	<211>	446																		
	<212>	PRT																		
	<213>	Buttiauxella																		
	<400>	8																		
65	Met	Thr	Ile	Ser	Ala	Phe	Asn	Arg	Lys	Lys	Leu	Thr	Leu	His	Pro	Gly				
	1				5					10					15					
70	Leu	Phe	Val	Ala	Leu	Ser	Ala	Ile	Phe	Ser	Leu	Gly	Ser	Thr	Ala	Tyr				
				20					25					30						
75	Ala	Asn	Asp	Thr	Pro	Ala	Ser	Gly	Tyr	Gln	Val	Glu	Lys	Val	Val	Ile				
			35					40					45							
80	Leu	Ser	Arg	His	Gly	Val	Arg	Ala	Pro	Thr	Glu	Met	Thr	Gln	Thr	Met				
	50						55					60								

ES 2 758 795 T3

Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 65 70 75 80
 5
 Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 85 90 95
 10
 Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110
 15
 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 115 120 125
 20
 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His
 130 135 140
 25
 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160
 30
 His Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln
 165 170 175
 35
 Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln
 180 185 190
 40
 His Tyr Ile Pro Phe Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 195 200 205
 45
 Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 210 215 220
 50
 Gly Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys
 225 230 235 240
 55
 Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 245 250 255
 60
 Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn
 260 265 270
 65
 Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Val
 275 280 285
 70
 Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Asn Gly
 290 295 300
 75
 Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr
 305 310 315 320
 80
 Glu Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 325 330 335

ES 2 758 795 T3

Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met
 340 345 350

5 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 355 360 365

10 Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 370 375 380

15 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 385 390 395 400

20 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 405 410 415

25 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 435 440 445

30 <210> 9
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Buttiauxella

35 <400> 9

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

40 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30

45 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45

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

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

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

60 Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110

65 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 115 120 125

Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His
 130 135 140

ES 2 758 795 T3

5 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160

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

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

15 His Tyr Ile Pro Phe Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 195 200 205

20 Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 210 215 220

25 Gly Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys
 225 230 235 240

Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 245 250 255

30 Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn
 260 265 270

35 Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Val
 275 280 285

40 Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Asn Gly
 290 295 300

45 Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr
 305 310 315 320

Glu Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 325 330 335

50 Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met
 340 345 350

55 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 355 360 365

60 Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 370 375 380

65 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 385 390 395 400

Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 405 410 415

ES 2 758 795 T3

Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 420 425 430

5
 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 435 440 445

10
 <210> 10
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Buttiauxella

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

20
 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30

25
 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45

30
 Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 50 55 60

35
 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 65 70 75 80

40
 Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 85 90 95

45
 Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110

50
 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 115 120 125

55
 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His
 130 135 140

60
 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160

65
 His Tyr Ile Pro Phe Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 195 200 205

Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu

ES 2 758 795 T3

	210		215		220														
5	Gly 225	Leu	Ser	Met	Pro	Ser 230	Lys	Leu	Ser	Ile	Lys 235	Asp	Asn	Gly	Asn	Thr 240			
10	Val	Ala	Leu	Asp	Gly 245	Ala	Ile	Gly	Leu	Ser 250	Ser	Thr	Leu	Ala	Glu 255	Ile			
15	Phe	Leu	Leu	Glu 260	Tyr	Ala	Gln	Gly	Met 265	Pro	Gln	Ala	Ala	Trp 270	Gly	Asn			
20	Ile	His	Ser 275	Glu	Gln	Glu	Trp	Ala 280	Ser	Leu	Leu	Lys	Leu 285	His	Asn	Val			
25	Gln	Phe 290	Asp	Leu	Met	Ala	Arg 295	Thr	Pro	Tyr	Ile	Ala 300	Arg	His	Asn	Gly			
30	Thr 305	Pro	Leu	Leu	Gln	Ala 310	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu 315	Asn	Pro	Asn	Ala	Thr 320			
35	Glu	Ser	Lys	Leu	Pro 325	Asp	Ile	Ser	Pro	Asp 330	Asn	Lys	Ile	Leu	Phe 335	Ile			
40	Ala	Gly	His	Asp 340	Thr	Asn	Ile	Ala	Asn 345	Ile	Ala	Gly	Met	Leu 350	Asn	Met			
45	Arg	Trp	Thr 355	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro 360	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro 365	Gly	Gly	Ala			
50	Leu	Val 370	Phe	Glu	Arg	Leu	Ala 375	Asp	Lys	Ser	Gly	Lys 380	Gln	Tyr	Val	Ser			
55	Val 385	Ser	Met	Val	Tyr	Gln 390	Thr	Leu	Glu	Gln 395	Leu	Arg	Ser	Gln	Thr	Pro 400			
60	Leu	Ser	Leu	Asn	Gln 405	Pro	Ala	Gly	Ser	Val 410	Gln	Leu	Lys	Ile	Pro 415	Gly			
65	Cys	Asn	Asp	Gln 420	Thr	Ala	Glu	Gly	Tyr 425	Cys	Pro	Leu	Ser	Thr 430	Phe	Thr			
70	Arg	Val 435	Val	Ser	Gln	Ser	Val	Glu 440	Pro	Gly	Cys	Gln	Leu 445	Gln					
75	<210>	11																	
80	<211>	446																	
85	<212>	PRT																	
90	<213>	Buttiauxella																	
95	<400>	11																	
100	Met 1	Thr	Ile	Ser	Ala	Phe	Asn	Arg	Lys	Lys 10	Leu	Thr	Leu	His	Pro 15	Gly			

ES 2 758 795 T3

Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30
 5
 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45
 10
 Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 50 55 60
 15
 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 65 70 75 80
 20
 Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 85 90 95
 25
 Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110
 30
 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 115 120 125
 35
 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His
 130 135 140
 40
 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160
 45
 His Pro Val Lys Ala Gly Ile Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln
 165 170 175
 50
 Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln
 180 185 190
 55
 His Tyr Ile Pro Phe Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 195 200 205
 60
 Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 210 215 220
 65
 Gly Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys
 225 230 235 240
 70
 Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 245 250 255
 75
 Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn
 260 265 270
 80
 Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Val
 275 280 285

ES 2 758 795 T3

Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Asn Gly
 290 295 300

5 Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr
 305 310 315 320

10 Glu Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 325 330 335

15 Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met
 340 345 350

20 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 355 360 365

25 Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 370 375 380

30 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 385 390 395 400

35 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 405 410 415

40 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 420 425 430

45 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 435 440 445

<210> 12
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Buttiauxella

50 Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
 1 5 10 15

55 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30

60 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45

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

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

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

ES 2 758 795 T3

Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 5 100 105 110
 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 10 115 120 125
 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His
 15 130 135 140
 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 20 145 150 155 160
 His Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln
 25 165 170 175
 Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln
 30 180 185 190
 His Tyr Ile Pro Phe Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 35 195 200 205
 Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 40 210 215 220
 Gly Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Glu
 45 225 230 235 240
 Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 50 245 250 255
 Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn
 55 260 265 270
 Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Val
 60 275 280 285
 Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Asn Gly
 65 290 295 300
 Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr
 70 305 310 315
 Glu Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 75 325 330 335
 Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met
 80 340 345 350
 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 85 355 360 365

ES 2 758 795 T3

Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 370 375 380
 5
 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 385 390 395 400
 10
 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 405 410 415
 15
 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 420 425 430
 20
 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 435 440 445
 <210> 13
 <211> 446
 <212> PRT
 25 <213> Buttiauxella
 <400> 13
 30 Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
 1 5 10 15
 35 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30
 40 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45
 45 Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 50 55 60
 50 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 65 70 75 80
 55 Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 85 90 95
 60 Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110
 65 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 115 120 125
 70 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His
 130 135 140
 75 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160
 80 His Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln

ES 2 758 795 T3

				165					170					175			
5	Gln	Ala	Val	Glu 180	Lys	Glu	Ala	Gln	Thr 185	Pro	Ile	Asp	Asn	Leu 190	Asn	Gln	
10	His	Tyr	Ile 195	Pro	Phe	Leu	Ala	Leu 200	Met	Asn	Thr	Thr	Leu 205	Asn	Phe	Ser	
15	Thr	Ser 210	Ala	Trp	Cys	Gln	Lys 215	His	Ser	Ala	Asp	Lys 220	Ser	Cys	Asp	Leu	
20	Gly 225	Leu	Ser	Met	Pro	Ser 230	Lys	Leu	Ser	Ile	Lys 235	Asp	Asn	Gly	Asn	Lys 240	
25	Val	Ala	Leu	Cys	Gly 245	Ala	Ile	Gly	Leu 250	Ser	Ser	Thr	Leu	Ala	Glu 255	Ile	
30	Phe	Leu	Leu	Glu 260	Tyr	Ala	Gln	Gly	Met 265	Pro	Gln	Ala	Ala	Trp 270	Gly	Asn	
35	Ile	His	Ser 275	Glu	Gln	Glu	Trp	Ala 280	Ser	Leu	Leu	Lys	Leu 285	His	Asn	Val	
40	Gln	Phe 290	Asp	Leu	Met	Ala	Arg 295	Thr	Pro	Tyr	Ile	Ala 300	Arg	His	Asn	Gly	
45	Thr 305	Pro	Leu	Leu	Gln	Ala 310	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu 315	Asn	Pro	Asn	Ala	Thr 320	
50	Glu	Ser	Lys	Leu 325	Pro	Asp	Ile	Ser	Pro 330	Asp	Asn	Lys	Ile	Leu	Phe 335	Ile	
55	Ala	Gly	His	Asp 340	Thr	Asn	Ile	Ala	Asn 345	Ile	Ala	Gly	Met	Leu 350	Asn	Met	
60	Arg	Trp	Thr 355	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro 360	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro 365	Gly	Gly	Ala	
65	Leu 370	Val	Phe	Glu	Arg	Leu	Ala 375	Asp	Lys	Ser	Gly	Lys 380	Gln	Tyr	Val	Ser	
70	Val 385	Ser	Met	Val	Tyr	Gln 390	Thr	Leu	Glu	Gln	Leu 395	Arg	Ser	Gln	Thr	Pro 400	
75	Leu	Ser	Leu	Asn	Gln 405	Pro	Ala	Gly	Ser	Val 410	Gln	Leu	Lys	Ile	Pro 415	Gly	
80	Cys	Asn	Asp	Gln 420	Thr	Ala	Glu	Gly	Tyr 425	Cys	Pro	Leu	Ser	Thr 430	Phe	Thr	
85	Arg	Val 435	Val	Ser	Gln	Ser	Val	Glu 440	Pro	Gly	Cys	Gln	Leu 445	Gln			

ES 2 758 795 T3

<210> 14
 <211> 446
 5 <212> PRT
 <213> Buttiauxella
 <400> 14
 10 Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
 1 5 10 15
 15 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30
 20 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45
 25 Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 50 55 60
 30 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 65 70 75 80
 35 Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 85 90 95
 40 Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110
 45 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 115 120 125
 50 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His
 130 135 140
 55 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160
 60 His Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln
 165 170 175
 65 Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln
 180 185 190
 70 His Tyr Ile Pro Phe Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 195 200 205
 75 Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 210 215 220
 80 Gly Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys
 225 230 235 240

ES 2 758 795 T3

Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 245 250 255

5 Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn
 260 265 270

10 Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Val
 275 280 285

15 Tyr Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Asn Gly
 290 295 300

20 Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr
 305 310 315 320

25 Glu Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 325 330 335

30 Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met
 340 345 350

35 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 355 360 365

40 Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 370 375 380

45 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 385 390 395 400

50 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 405 410 415

55 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 420 425 430

60 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 435 440 445

<210> 15
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Buttiauxella

<400> 15

65 Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
 1 5 10 15

70 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30

75 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45

ES 2 758 795 T3

5 Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 50 55 60
 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 65 70 75 80
 10 Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 85 90 95
 15 Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110
 20 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 115 120 125
 25 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His
 130 135 140
 30 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160
 35 His Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln
 165 170 175
 40 Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln
 180 185 190
 45 His Tyr Ile Pro Phe Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 195 200 205
 50 Lys Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 210 215 220
 55 Gly Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys
 225 230 235 240
 60 Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 245 250 255
 65 Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn
 260 265 270
 Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Val
 275 280 285
 Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Asn Gly
 290 295 300
 70 Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr
 305 310 315 320

ES 2 758 795 T3

Glu Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 325 330 335
 5
 Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met
 340 345 350
 10 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 355 360 365
 15 Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 370 375 380
 20 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 385 390 395 400
 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 405 410 415
 25 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 420 425 430
 30 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 435 440 445
 35 <210> 16
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Buttiauxella
 40 <400> 16
 Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
 1 5 10 15
 45 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30
 50 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45
 55 Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 50 55 60
 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 65 70 75 80
 60 Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 85 90 95
 65 Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110
 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr

ES 2 758 795 T3

	115		120		125														
5	Leu	Lys	Thr	Gly	Glu	Ala	Phe	Leu	Ala	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Cys	His			
		130					135					140							
10	Leu	Thr	Ile	His	His	Gln	Gln	Asp	Ile	Lys	Lys	Ala	Asp	Pro	Leu	Phe			
	145					150					155					160			
15	His	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Thr	Cys	Ser	Met	Asp	Lys	Thr	Gln	Val	Gln			
				165						170					175				
20	Gln	Ala	Val	Glu	Lys	Glu	Ala	Gln	Thr	Pro	Ile	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln			
				180					185					190					
25	His	Tyr	Ile	Pro	Ser	Leu	Ala	Leu	Met	Asn	Thr	Thr	Leu	Asn	Phe	Ser			
			195					200					205						
30	Thr	Ser	Ala	Trp	Cys	Gln	Lys	His	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Cys	Asp	Leu			
		210					215					220							
35	Gly	Leu	Ser	Met	Pro	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Lys	Asp	Asn	Gly	Asn	Lys			
	225					230					235					240			
40	Val	Ala	Leu	Asp	Gly	Ala	Ile	Gly	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Ala	Glu	Ile			
				245						250					255				
45	Phe	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Gln	Ala	Ala	Trp	Gly	Asn			
				260					265					270					
50	Ile	His	Ser	Glu	Gln	Glu	Trp	Ala	Ser	Leu	Leu	Lys	Leu	His	Asn	Val			
			275					280					285						
55	Gln	Phe	Asp	Leu	Met	Ala	Arg	Thr	Pro	Tyr	Ile	Ala	Arg	His	Asn	Gly			
		290					295					300							
60	Thr	Pro	Leu	Leu	Gln	Ala	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu	Asn	Pro	Asn	Ala	Thr			
	305				310						315					320			
65	Glu	Ser	Lys	Leu	Pro	Asp	Ile	Ser	Pro	Asp	Asn	Lys	Ile	Leu	Phe	Ile			
				325						330					335				
70	Ala	Gly	His	Asp	Thr	Asn	Ile	Ala	Asn	Ile	Ala	Gly	Met	Leu	Asn	Met			
				340					345					350					
75	Arg	Trp	Thr	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Ala			
			355					360					365						
80	Leu	Val	Phe	Glu	Arg	Leu	Ala	Asp	Lys	Ser	Gly	Lys	Gln	Tyr	Val	Ser			
	370						375					380							
85	Val	Ser	Met	Val	Tyr	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Leu	Arg	Ser	Gln	Thr	Pro			
	385					390					395					400			

ES 2 758 795 T3

5 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 405 410 415
 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 420 425 430
 10 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 435 440 445
 15 <210> 17
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Buttiauxella
 20 <400> 17
 Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
 1 5 10 15
 25 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30
 30 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 50
 Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 50 60
 40 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 65 70 75 80
 Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 85 90 95
 45 Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110
 50 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Glu Gln Arg Thr
 115 120 125
 55 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His
 130 135 140
 60 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160
 His Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln
 165 170 175
 65 Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln
 180 185 190

ES 2 758 795 T3

Arg Tyr Ile Pro Phe Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 195 200 205
 5 Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 210 215 220
 10 Gly Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys
 225 230 235 240
 15 Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 245 250 255
 20 Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn
 260 265 270
 25 Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Val
 275 280 285
 30 Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Asn Gly
 290 295 300
 35 Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr
 305 310 315 320
 40 Glu Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 325 330 335
 45 Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met
 340 345 350
 50 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 355 360 365
 55 Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 370 375 380
 60 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 385 390 395 400
 65 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 405 410 415
 70 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 420 425 430
 75 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 435 440 445
 80 <210> 18
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Buttiauxella

ES 2 758 795 T3

<400> 18

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

5 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30

10 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45

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

20 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 65 70 75 80

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

30 Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110

35 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 115 120 125

40 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His
 130 135 140

45 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160

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

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

60 His Tyr Ile Pro Phe Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 195 200 205

65 Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 210 215 220

70 Gly Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys
 225 230 235 240

75 Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 245 250 255

80 Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn
 260 265 270

ES 2 758 795 T3

Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Val
 275 280 285

5
 Gln Phe Asp Leu Met Glu Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Lys Gly
 290 295 300

10
 Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr
 305 310 315

15
 Glu Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 325 330 335

20
 Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met
 340 345 350

25
 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 355 360 365

30
 Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 370 375 380

35
 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 385 390 395 400

40
 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 405 410 415

45
 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 420 425 430

50
 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 435 440 445

55
 <210> 19
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Buttiauxella

60
 <400> 19

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

65
 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30

70
 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45

75
 Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 50 55 60

80
 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly

ES 2 758 795 T3

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

ES 2 758 795 T3

5 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 355 360 365
 10 Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 370 375 380
 15 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 385 390 395 400
 20 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 405 410 415
 25 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 420 425 430
 30 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 435 440 445
 <210> 20
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Buttiauxella
 <400> 20
 35 Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
 1 5 10 15
 40 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30
 45 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45
 50 Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 50 55 60
 55 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 65 70 75 80
 60 Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 85 90 95
 Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110
 65 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 115 120 125
 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His
 130 135 140

ES 2 758 795 T3

Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160
 5 His Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln
 165 170 175
 10 Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln
 180 185 190
 15 His Tyr Ile Pro Phe Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 195 200 205
 20 Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Glu Leu
 210 215 220
 25 Gly Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Glu
 225 230 235 240
 30 Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 245 250 255
 35 Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn
 260 265 270
 40 Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Val
 275 280 285
 45 Gln Phe Asp Leu Met Ala Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Asn Gly
 290 295 300
 50 Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr
 305 310 315 320
 55 Glu Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 325 330 335
 60 Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asp Met
 340 345 350
 65 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 355 360 365
 70 Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 370 375 380
 75 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 385 390 395 400
 80 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 405 410 415
 85 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr

ES 2 758 795 T3

		420						425						430		
5	Arg	Val	Val	Ser	Gln	Ser	Val	Glu	Pro	Gly	Cys	Gln	Leu	Gln		
		435						440					445			
	<210>	21														
	<211>	446														
10	<212>	PRT														
	<213>	Buttiauxella														
	<400>	21														
15	Met	Thr	Ile	Ser	Ala	Phe	Asn	Arg	Lys	Lys	Leu	Thr	Leu	His	Pro	Gly
	1			5						10					15	
20	Leu	Phe	Val	Ala	Leu	Ser	Ala	Ile	Phe	Ser	Leu	Gly	Ser	Thr	Ala	Tyr
			20						25					30		
25	Ala	Asn	Asp	Thr	Pro	Ala	Ser	Gly	Tyr	Gln	Val	Glu	Lys	Val	Val	Ile
			35					40					45			
30	Leu	Ser	Arg	His	Gly	Val	Arg	Ala	Pro	Thr	Lys	Met	Thr	Gln	Thr	Met
	50						55					60				
35	Arg	Asp	Val	Thr	Pro	Asn	Thr	Trp	Pro	Glu	Trp	Pro	Val	Lys	Leu	Gly
	65					70					75					80
40	Tyr	Ile	Thr	Pro	Arg	Gly	Glu	His	Leu	Ile	Ser	Leu	Met	Gly	Gly	Phe
					85					90					95	
45	Tyr	Arg	Gln	Lys	Phe	Gln	Gln	Gln	Gly	Ile	Leu	Ser	Gln	Gly	Ser	Cys
			100						105					110		
50	Pro	Thr	Pro	Asn	Ser	Ile	Tyr	Val	Trp	Ala	Asp	Val	Asp	Gln	Arg	Thr
			115					120					125			
55	Leu	Lys	Thr	Gly	Glu	Ala	Phe	Leu	Ala	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Cys	His
	130						135					140				
60	Leu	Thr	Ile	His	His	Gln	Gln	Asp	Ile	Lys	Lys	Ala	Asp	Pro	Leu	Phe
	145					150					155					160
65	His	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Ile	Cys	Ser	Met	Asp	Lys	Thr	Gln	Val	Gln
				165						170					175	
70	Gln	Ala	Val	Glu	Lys	Glu	Ala	Gln	Thr	Pro	Ile	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln
			180						185					190		
75	His	Tyr	Ile	Pro	Phe	Leu	Ala	Leu	Met	Asn	Thr	Thr	Leu	Asn	Phe	Ser
		195						200					205			
80	Thr	Ser	Ala	Trp	Cys	Gln	Lys	His	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Cys	Asp	Leu
	210					215						220				

ES 2 758 795 T3

Gly Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Thr
 225 230 235 240
 5 Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 245 250 255
 10 Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn
 260 265 270
 15 Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Val
 275 280 285
 20 Gln Phe Asp Leu Met Glu Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Lys Gly
 290 295 300
 Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr
 305 310 315 320
 25 Glu Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 325 330 335
 30 Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met
 340 345 350
 35 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 355 360 365
 40 Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 370 375 380
 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 385 390 395 400
 45 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 405 410 415
 50 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 420 425 430
 55 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 435 440 445
 <210> 22
 <211> 446
 60 <212> PRT
 <213> Buttiauxella
 <400> 22
 65 Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
 1 5 10 15
 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr

ES 2 758 795 T3

				20					25					30			
5	Ala	Asn	Asp	Thr	Pro	Ala	Ser	Gly	Tyr	Gln	Val	Glu	Lys	Val	Val	Ile	
			35					40					45				
10	Leu	Ser	Arg	His	Gly	Val	Arg	Ala	Pro	Thr	Lys	Met	Thr	Gln	Thr	Met	
		50					55					60					
15	Arg	Asp	Val	Thr	Pro	Asn	Thr	Trp	Pro	Glu	Trp	Pro	Val	Lys	Leu	Gly	
	65					70					75					80	
20	Tyr	Ile	Thr	Pro	Arg	Gly	Glu	His	Leu	Ile	Ser	Leu	Met	Gly	Gly	Phe	
					85					90					95		
25	Tyr	Arg	Gln	Lys	Phe	Gln	Gln	Gln	Gly	Ile	Leu	Ser	Gln	Gly	Ser	Cys	
				100					105					110			
30	Pro	Thr	Pro	Asn	Ser	Ile	Tyr	Val	Trp	Ala	Asp	Val	Asp	Gln	Arg	Thr	
			115					120					125				
35	Leu	Lys	Thr	Gly	Glu	Ala	Phe	Leu	Ala	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Cys	His	
		130					135					140					
40	Leu	Thr	Ile	His	His	Gln	Gln	Asp	Ile	Lys	Lys	Ala	Asp	Pro	Leu	Phe	
	145					150					155					160	
45	His	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Ile	Cys	Ser	Met	Asp	Lys	Thr	Gln	Val	Gln	
				165						170					175		
50	Gln	Ala	Val	Glu	Lys	Glu	Ala	Gln	Thr	Pro	Ile	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln	
				180					185					190			
55	His	Tyr	Ile	Pro	Phe	Leu	Ala	Leu	Met	Asn	Thr	Thr	Leu	Asn	Phe	Ser	
			195					200					205				
60	Thr	Ser	Ala	Trp	Cys	Gln	Lys	His	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Cys	Asp	Leu	
		210					215					220					
65	Gly	Leu	Ser	Met	Pro	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Lys	Asp	Asn	Gly	Asn	Glu	
	225					230					235					240	
70	Val	Ser	Leu	Asp	Gly	Ala	Ile	Gly	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Ala	Glu	Ile	
				245						250					255		
75	Phe	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Gln	Ala	Ala	Trp	Gly	Asn	
				260					265					270			
80	Ile	His	Ser	Glu	Gln	Glu	Trp	Ala	Ser	Leu	Leu	Lys	Leu	His	Asn	Val	
			275					280					285				
85	Gln	Phe	Asp	Leu	Met	Glu	Arg	Thr	Pro	Tyr	Ile	Ala	Arg	His	Lys	Gly	
		290					295					300					

ES 2 758 795 T3

5 Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr
 305 310 315 320

10 Glu Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 325 330 335

15 Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met
 340 345 350

20 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 355 360 365

25 Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 370 375 380

30 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 385 390 395 400

35 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 405 410 415

40 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 420 425 430

45 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 435 440 445

50 <210> 23
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Buttiauxella

55 <400> 23

60 Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
 1 5 10 15

65 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30

70 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45

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

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

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

ES 2 758 795 T3

Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110

5 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Thr Asp Val Asp Gln Arg Thr
 115 120 125

10 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His
 130 135 140

15 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160

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

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

25 His Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 195 200 205

30 Lys Ser Pro Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 210 215 220

35 Gly Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Glu
 225 230 235 240

Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 245 250 255

40 Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn
 260 265 270

45 Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Val
 275 280 285

50 Gln Phe Asp Leu Met Glu Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Lys Gly
 290 295 300

55 Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr
 305 310 315 320

Glu Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 325 330 335

60 Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met
 340 345 350

65 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 355 360 365

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

ES 2 758 795 T3

	370					375										380	
5	Val	Ser	Met	Val	Tyr	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Leu	Arg	Ser	Gln	Thr	Pro	
	385					390					395					400	
10	Leu	Ser	Leu	Asn	Gln	Pro	Ala	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Lys	Ile	Pro	Gly	
				405						410					415		
15	Cys	Asn	Asp	Gln	Thr	Ala	Glu	Gly	Tyr	Cys	Pro	Leu	Ser	Thr	Phe	Thr	
				420					425					430			
20	Arg	Val	Val	Ser	Gln	Ser	Val	Glu	Pro	Gly	Cys	Gln	Leu	Gln			
			435					440					445				
25	<210>	24															
	<211>	446															
	<212>	PRT															
	<213>	Buttiauxella															
30	Met	Thr	Ile	Ser	Ala	Phe	Asn	Arg	Lys	Lys	Leu	Thr	Leu	His	Pro	Gly	
	1			5					10					15			
35	Leu	Phe	Val	Ala	Leu	Ser	Ala	Ile	Phe	Ser	Leu	Gly	Ser	Thr	Ala	Tyr	
			20						25					30			
40	Ala	Asn	Asp	Thr	Pro	Ala	Ser	Gly	Tyr	Gln	Val	Glu	Lys	Val	Val	Ile	
			35					40					45				
45	Leu	Ser	Arg	His	Gly	Val	Arg	Ala	Pro	Thr	Lys	Met	Thr	Gln	Thr	Met	
	50						55					60					
50	Arg	Asp	Val	Thr	Pro	Asn	Thr	Trp	Pro	Glu	Trp	Pro	Val	Lys	Leu	Gly	
	65					70				75						80	
55	Tyr	Ile	Thr	Pro	Arg	Gly	Glu	His	Leu	Ile	Ser	Leu	Met	Gly	Gly	Phe	
				85					90					95			
60	Tyr	Arg	Gln	Lys	Phe	Gln	Gln	Gln	Gly	Ile	Leu	Ser	Gln	Gly	Ser	Cys	
			100						105					110			
65	Pro	Thr	Pro	Asn	Ser	Ile	Tyr	Val	Trp	Thr	Asp	Val	Asp	Gln	Arg	Thr	
			115					120					125				
70	Leu	Lys	Thr	Gly	Glu	Ala	Phe	Leu	Ala	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Cys	His	
		130					135					140					
75	Leu	Thr	Ile	His	His	Gln	Gln	Asp	Ile	Lys	Lys	Ala	Asp	Pro	Leu	Phe	
	145					150					155					160	
80	His	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Ile	Cys	Ser	Met	Asp	Lys	Thr	Gln	Val	Gln	
				165						170					175		

ES 2 758 795 T3

Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln
 180 185 190
 5
 His Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 195 200 205
 10
 Lys Ser Pro Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 210 215 220
 15
 Gly Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Glu
 225 230 235 240
 20
 Val Ser Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 245 250 255
 Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn
 260 265 270
 25
 Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Leu Leu Leu Lys Leu His Asn Val
 275 280 285
 30
 Tyr Phe Asp Leu Met Glu Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Lys Gly
 290 295 300
 35
 Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr
 305 310 315 320
 40
 Glu Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 325 330 335
 Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met
 340 345 350
 45
 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 355 360 365
 50
 Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 370 375 380
 55
 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 385 390 395 400
 60
 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 405 410 415
 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 420 425 430
 65
 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 435 440 445

ES 2 758 795 T3

<210> 25
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Buttiauxella
 5
 <400> 25
 Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
 1 5 10 15
 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45
 Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 50 55 60
 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 65 70 75 80
 Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 85 90 95
 Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110
 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Thr Asp Val Glu Gln Arg Thr
 115 120 125
 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His
 130 135 140
 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160
 His Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln
 165 170 175
 Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln
 180 185 190
 Arg Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 195 200 205
 Lys Ser Pro Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Asn Cys Asp Leu
 210 215 220
 Ala Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Glu
 225 230 235 240
 Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 245 250 255

ES 2 758 795 T3

5 Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn
 260 265 270
 10 Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Val
 275 280 285
 15 Gln Phe Asp Leu Met Glu Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Lys Gly
 290 295 300
 20 Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr
 305 310 315 320
 25 Glu Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile
 325 330 335
 30 Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met
 340 345 350
 35 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 355 360 365
 40 Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 370 375 380
 45 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 385 390 395 400
 50 Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 405 410 415
 55 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 420 425 430
 60 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 435 440 445
 65 <210> 26
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Buttiauxella
 <400> 26
 Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
 1 5 10 15
 70 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30
 75 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45

ES 2 758 795 T3

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

5 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 65 70 75 80

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

Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110

15 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Glu Gln Arg Thr
 115 120 125

20 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His
 130 135 140

25 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160

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

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

35 Arg Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Ile Leu Asn Phe Ser
 195 200 205

40 Lys Ser Pro Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 210 215 220

45 Gly Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Glu
 225 230 235 240

50 Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 245 250 255

Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly Asn
 260 265 270

55 Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Val
 275 280 285

60 His Phe Asp Leu Met Glu Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Lys Gly
 290 295 300

65 Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr
 305 310 315 320

Glu Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile

ES 2 758 795 T3

				325						330						335
5	Ala	Gly	His	Asp 340	Thr	Asn	Ile	Ala	Asn 345	Ile	Ala	Gly	Met	Leu 350	Asn	Met
10	Arg	Trp	Thr 355	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp 360	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly 365	Gly	Ala
15	Leu	Val 370	Phe	Glu	Arg	Leu	Ala 375	Asp	Lys	Ser	Gly	Lys 380	Gln	Tyr	Val	Ser
20	Val	Ser 385	Met	Val	Tyr	Gln 390	Thr	Leu	Glu	Gln	Leu	Arg 395	Ser	Gln	Thr	Pro 400
25	Leu	Ser	Leu	Asn 405	Gln	Pro	Ala	Gly	Ser	Val 410	Gln	Leu	Lys	Ile	Pro 415	Gly
30	Cys	Asn	Asp	Gln 420	Thr	Ala	Glu	Gly	Tyr 425	Cys	Pro	Leu	Ser	Thr 430	Phe	Thr
35	Arg	Val 435	Val	Ser	Gln	Ser	Val	Glu 440	Pro	Gly	Cys	Gln	Leu 445	Gln		
	<210>	27														
	<211>	446														
	<212>	PRT														
	<213>	Buttiauxella														
	<400>	27														
40	Met	Thr	Ile	Ser 5	Ala	Phe	Asn	Arg	Lys 10	Lys	Leu	Thr	Leu	His 15	Pro	Gly
45	Leu	Phe	Val 20	Ala	Leu	Ser	Ala	Ile	Phe 25	Ser	Leu	Gly	Ser	Thr 30	Ala	Tyr
50	Ala	Asn	Asp 35	Thr	Pro	Ala	Ser	Gly 40	Tyr	Gln	Val	Glu	Lys 45	Val	Val	Ile
55	Leu	Ser 50	Arg	His	Gly	Val	Arg 55	Ala	Pro	Thr	Lys	Met 60	Thr	Gln	Thr	Met
60	Arg	Asp 65	Val	Thr	Pro	Asn 70	Thr	Trp	Pro	Glu	Trp 75	Pro	Val	Lys	Leu	Gly 80
65	Tyr	Ile	Thr	Pro	Arg 85	Gly	Glu	His	Leu	Ile 90	Ser	Leu	Met	Gly	Gly 95	Phe
70	Tyr	Arg	Gln	Lys 100	Phe	Gln	Gln	Gln	Gly 105	Ile	Leu	Ser	Gln	Gly 110	Ser	Cys
75	Pro	Thr	Pro 115	Asn	Ser	Ile	Tyr	Val 120	Trp	Thr	Asp	Val	Asp 125	Gln	Arg	Thr

ES 2 758 795 T3

Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His
 130 135 140
 5
 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160
 10 His Pro Val Lys Ala Gly Ile Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln
 165 170 175
 15 Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln
 180 185 190
 20 Arg Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Ile Leu Asn Phe Ser
 195 200 205
 25 Lys Ser Pro Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 210 215 220
 30 Gly Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Glu
 225 230 235 240
 35 Val Ala Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile
 245 250 255
 40 Phe Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly Asn
 260 265 270
 45 Ile His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Ser Leu Leu Lys Leu His Asn Val
 275 280 285
 50 His Phe Asp Leu Met Glu Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Lys Gly
 290 295 300
 55 Thr Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr
 305 310 315 320
 60 Glu Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Phe
 325 330 335
 65 Ala Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met
 340 345 350
 70 Arg Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala
 355 360 365
 75 Leu Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser
 370 375 380
 80 Val Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro
 385 390 395 400

ES 2 758 795 T3

Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly
 405 410 415
 5 Cys Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr
 420 425 430
 10 Arg Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln
 435 440 445
 <210> 28
 <211> 446
 15 <212> PRT
 <213> Buttiauxella
 <400> 28
 20 Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
 1 5 10 15
 25 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30
 30 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45
 35 Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 50 55 60
 40 Arg Asp Val Thr Pro Tyr Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 65 70 75 80
 45 Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 85 90 95
 50 Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110
 55 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Glu Gln Arg Thr
 115 120 125
 60 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Glu Cys His
 130 135 140
 65 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asp Ile Lys Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160
 70 His Pro Val Lys Ala Gly Ile Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln
 165 170 175
 75 Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln
 180 185 190
 80 Arg Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Ile Leu Asn Phe Ser
 195 200 205

ES 2 758 795 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Método para producir una variante de fitasa, donde:

a) la variante de fitasa tiene al menos un 80 % de identidad con los aminoácidos 1-413 de la fitasa progenitora de la SEC ID N° 2, los aminoácidos 1-413 de la fitasa progenitora de la SEC ID N° 4 y/o los aminoácidos 1-413 de la fitasa progenitora de la SEC ID N° 6 cuando se alinean con la secuencia de aminoácidos respectiva utilizando el programa Needle con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización de abertura de gap de 10,0, y una penalización de extensión de gap de 0,5; y

b) el método comprende establecer al menos un puente disulfuro en comparación con la SEC ID N° 2, donde el número de puentes de disulfuro establecido es 1, 2 o 3, donde dicho puente de disulfuro no está entre los cuatro de origen natural en las posiciones 79/110,135/410,180/189 y 384/393

donde el un puente disulfuro está establecido en la posición F) 61C/102C;

donde los dos puentes disulfuro establecidos usan las siguientes combinaciones de pares de posición: A+F, B+F, C+F, D+F, E+F y F+G, donde A significa 143C/201C, B significa 33C/179C, C significa 54C/101C, D significa 93C/48C, E significa 33C/178C, F significa 61C/102C y G significa 164C/251C;

donde los tres puentes disulfuro establecidos usan las combinaciones siguientes de pares de posiciones:

A+B+F, A+C+F, A+D+F, A+E+F, A+F+G, B+C+F, B+D+F, B+E+F, B+F+G, C+D+F, C+E+F, C+F+G, D+E+F, D+F+G y E+F+G, donde A significa 143C/201C, B significa 33C/179C, C significa 54C/101C, D significa 93C/48C, E significa 33C/178C, F significa 61C/102C y G significa 164C/251C,

y donde la variante tiene una termoestabilidad mejorada y/o perfil de temperatura mejorado en comparación con la fitasa progenitora.

2. Método de producción de una variante de fitasa según la reivindicación 1, donde el número de puentes disulfuro establecido es 1 y donde el puente disulfuro está establecido en la posición F) 61C/102C.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 que comprende además una modificación en al menos una posición seleccionada de las siguientes: 1, 9, 10, 18, 22, 25, 26, 37, 38, 66, 71, 81, 89, 92, 94, 109, 111, 119, 120, 121, 131, 134, 141, 142, 144, 152, 155, 160, 164, 171, 176, 178, 188, 190, 192, 193, 206, 207, 209, 211, 214, 215, 219, 222, 239, 235, 243, 245, 248, 253, 255, 256, 257, 260, 261, 268, 270, 277, 283, 285, 287, 288, 293, 296, 303, 306, 307, 308, 314, 318, 328, 337, 345, 350, 364, 371, 372, 396, 399, 406 y/o 413.

4. Método según cualquiera la reivindicación 3, que comprende una modificación adicional seleccionada de las siguientes:

N1S, S1N, I9V, V9I, V10I, K26E, N37Y, T38S, S38T, E66Q, Q66E, K71Q, Q71K, T81A, A81T, A89T, D92E, E109Q, H111G, D119N, I120L, K121E, T134I, T134V, R141Q, Q141R, V142L, L142V, T144I, T152M, M152T, E155D, D155E, H160R, S164F, F164S, T171I, T176K, A178P, S188N, D190E, A192G, G192A, L193Q, K207E, K207T, A209S, D211C, I214V, V214I, A235V, K239N, N239K, E245D, D245E, E248S, E248L, S248L, S248E, A255T, T255A, V255A, V255T, Q256H, Q256Y, A261 E, R268A, R268T, A268R, A268T, T268A, T268R, N270K, A277T, T277A, D283N, D283E, E283N, E283D, N283D, N283E, N285K, K285N, D287T, T287D, A288E, A288V, V288E, V288A, E288A, E288V, D293G, P296S, S296P, I303L, I303F, L303L, F303L, L303I, S314A, A314S, N318D, I337V, V337I, S345A, A345S, V350I, I350V, A364S, A364S, S364A, K371N, N371K, E372Q, E372Q, Q372E, P396S, S396P, T399K, K399T, E406V, V406E, P413Q y/o Q413P y/o de las siguientes combinaciones D92E/H160R, A261E/N270K, T134I/K207T, D190E/K207E/N318D, T134I/K207T/A261 E/N270K, T134I/K207E/A209S/A261 E/N270K, A89T/T134I/F164S/T176K/A178P/K207E/A261 E/N270K, A89T/T134I/F164S/T176K/A178P/K207E/A209S/S248L/Q256Y/A261E/N270K, A89T/D92E/H160R/F164S/T176 K/A178P/S188N/G192A/K207E/A261 E/N270K, D92E/T134I/H160R/F164S/T170I/T76K/A188P/K207E/A235V/Q256H/A261E/N270K, A89T/T134I/H160R/F164S/T170I/T76K/A188P/K207E/A235V/Q256H/A261E/N270K/I303F, y/o N37Y/D92E/T134I/H160R/F164S/T171I/T176K/A188P/K207E/A235V/Q256H/A261 E/N270K.

5. Método según la reivindicación 1, donde la parte madura de la fitasa de la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4 o la SEC ID N° 6, o una parte madura de cualquiera de las siguientes secuencias de GENESEQP: AEH25051(SEC ID N° 7), AEH25056(SEC ID N° 8), AEH25057(SEC ID N° 9), AEH25058(SEC ID N° 10), AEH25059(SEC ID N° 11), AEH25060(SEC ID N° 12), AEH25061(SEC ID N° 13), AEH25062(SEC ID N° 14), AEH25063(SEC ID N° 15), AEH25064(SEC ID N° 16), AEH25065(SEC ID N° 17), AEH25066(SEC ID N° 18), AEH25067(SEC ID N° 19), AEH25068(SEC ID N° 20), AEH25069(SEC ID N° 21), AEH25070(SEC ID N° 22), AEH25071(SEC ID N° 23), AEH25072(SEC ID N° 24), AEH25073(SEC ID N° 25), AEH25074(SEC ID N° 26), AEH25075(SEC ID N° 27) o AEH25076(SEC ID N° 28) se usa como progenitora/esqueleto para producir una variante de fitasa.

6. Variante de fitasa, donde la variante

a) tiene al menos un 80 % de identidad con los aminoácidos 1-413 de la fitasa progenitora SEC ID N° 2, los aminoácidos 1-413 de la fitasa progenitora de la SEC ID N° 4 y/o los aminoácidos 1-413 de la fitasa progenitora de la SEC ID N° 6 cuando se alinean con la secuencia de aminoácidos respectiva utilizando el programa Needle con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización de abertura de gap de

- 10,0 y una penalización de extensión de gap de 0,5; y
 b) comprende 1, 2 o 3 puentes disulfuro establecidos en comparación con la SEC ID N° 2, donde dicho puente disulfuro no está entre los cuatro de origen natural en las posiciones 79/110,135/410,180/189 y 384/393,
- 5 donde el puente disulfuro establecido está en la posición F) 61C/102C, donde los dos puentes disulfuro establecidos usan las siguientes combinaciones de pares de posiciones: A+F, B+F, C+F, D+F, E+F y F+G, donde A significa 143C/201C, B significa 33C/179C, C significa 54C/101C, D significa 93C/48C, E significa 33C/178C, F significa 61C/102C y G significa 164C/251C; donde los tres puentes disulfuro establecidos usan las siguientes combinaciones de pares de posición: A+B+F, A+C+F, A+D+F, A+E+F, A+F+G, B+C+F, B+D+F, B+E+F, B+F+G, C+D+F, C+E+F, C+F+G, D+E+F, D+F+G y E+F+G, donde A significa 143C/201C, B significa 33C/179C, C significa 54C/101C, D significa 93C/48C, E significa 33C/178C, F significa 61C/102C y G significa 164C/251C; y donde la variante tiene una termoestabilidad mejorada y/o el perfil de temperatura mejorado como en comparación con la fitasa progenitora.
- 10
- 15 7. Variante de fitasa según la reivindicación 6, donde el número de puentes disulfuro establecido es 1 y donde el puente disulfuro está establecido en la posición F) 61C/102C.
8. Variante de fitasa, según la reivindicación 6, comprende además la modificación en al menos una posición seleccionada de las siguientes: 1, 9, 10, 18, 22, 25, 26, 37, 38, 66, 71, 81, 89, 92, 94, 109, 111, 119, 120, 121, 131, 134, 141, 142, 144, 152, 155, 160, 164, 171, 176, 178, 188, 190, 192, 193, 206, 207, 209, 211, 214, 215, 219, 222, 239, 235, 243, 245, 248, 253, 255, 256, 257, 260, 261, 268, 270, 277, 283, 285, 287, 288, 293, 296, 303, 306, 307, 308, 314, 318, 328, 337, 345, 350, 364, 371, 372, 396, 399, 406 y/o 413.
- 20
- 25 9. Variante de fitasa, según las reivindicaciones 6 a 8, que comprende otra modificación seleccionada de las siguientes:
- 30 N1S, S1N, I9V, V9I, V10I, K26E, N37Y, T38S, S38T, E66Q, Q66E, K71Q, Q71K, T81A, A81T, A89T, D92E, E109Q, H111G, D119N, I120L, K121E, T134I, T134V, R141Q, Q141R, V142L, L142V, T144I, T152M, M152T, E155D, D155E, H160R, S164F, F164S, T171I, T176K, A178P, S188N, D190E, A192G, G192A, L193Q, K207E, K207T, A209S, D211C, I214V, V214I, A235V, K239N, N239K, E245D, D245E, E248S, E248L, S248L, S248E, A255T, T255A, V255A, V255T, Q256H, Q256Y, A261E, R268A, R268T, A268R, A268T, T268A, T268R, N270K, A277T, T277A, D283N, D283E, E283N, E283D, N283D, N283E, N285K, K285N, D287T, T287D, A288E, A288V, V288E, V288A, E288A, E288V, D293G, P296S, S296P, I303L, I303F, L303F, F303L, L303I, S314A, A314S, N318D, I337V, V337I, S345A, A345S, V350I, I350V, A364S, A364S, S364A, K371N, N371K, E372Q, E372Q, Q372E, P396S, S396P, T399K, K399T, E406V, V406E, P413Q y/o Q413P y/o de las siguientes combinaciones D92E/H160R, A261E/N270K, T134I/K207T, D190E/K207E/N318D, T134I/K207T/A261E/N270K, T134I/K207E/A209S/A261E/N270K, A89T/T134I/F164S/T176K/A178P/K207E/A261E/N270K, A89T/T134I/F164S/T176K/A178P/K207E/A209S/S248L/Q256Y/A261 E/N270K, A89T/D92E/H160R/F164S/T176K/A178P/S188N/G192A/K207E/A261E/N270K, D92E/T134I/H160R/F164S/T170I/T176K/A188P/K207E/A235V/Q256H/A261 E/N270K, A89T/T134I/H160R/F164S/T170I/T176K/A188P/K207E/A235V/Q256H/A261E/N270K/I30 3F, y/o N37Y/D92E/T134I/H160R/F164S/T171I/T176K/A188P/K207E/A235V/Q256H/A261E/N27 0K.
- 35
- 40
- 45 10. Polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la variante de fitasa según la reivindicación 6.
11. Constructo de ácido nucleico que comprende el polinucleótido según la reivindicación 10 operativamente enlazado a una o varias secuencias de control que dirige la producción del polipéptido en un huésped de expresión.
- 50
12. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 11.
- 55 13. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 10 y/o el vector de expresión según la reivindicación 12.
14. Método para producir la variante de fitasa según la reivindicación 6, que comprende
 (a) cultivar la célula huésped según la reivindicación 13 para producir un sobrenadante que comprende la fitasa; y
 (b) recuperar la fitasa.
- 60
15. Composición que comprende al menos una variante de fitasa según la reivindicación 6 y
 (a) al menos una vitamina liposoluble;
 (b) al menos una vitamina hidrosoluble; y/o
 (c) al menos un oligoelemento.
- 65

- 5 16. Composición según la reivindicación 15 que comprende además al menos una enzima seleccionada del grupo siguiente de enzimas: amilasa, fitasa, fosfatasa, xilanasa, galactanasa, alfa-galactosidasa, proteasa, fosfolipasa y/o beta-glucanasa.
17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 15 y 16 que es un aditivo de pienso de animales.
- 10 18. Método para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, donde la variante de fitasa según la reivindicación 6 se añade al pienso.
- 15 19. Uso de la variante de fitasa según la reivindicación 6 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 15-17 en pienso para animales; en la preparación de pienso para animales; para mejorar el valor nutricional de pienso para animales; para reducir los niveles de fitato en abono animal; para el tratamiento de proteínas vegetales; o para liberar fósforo de un sustrato de fitasa.
- 20 20. Método para producir un producto de fermentación que comprende fermentar un material de carbohidratos en presencia de la variante de fitasa según la reivindicación 6.
21. Método para producir etanol que comprende fermentar un material de carbohidratos en presencia de la variante de fitasa según la reivindicación 6 y producir etanol.

Fig. 1

Numeración	1	10	20
AEH25057	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25059	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25058	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25067	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25071	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25072	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25074	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25076	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25075	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25073	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25070	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25069	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25066	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25060	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25068	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25063	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25065	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25062	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25061	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25056	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTEM
AEH25051	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
AEH25064	MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
SEQ4	-----FSLGLTAYAS	DT	PASGYQTEKVVILSRHGVRAPTKM
SEQ6	MTFSAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM
SEQ2	MTISAFNHKKLTLHPGLFVALSAIFSLG	STAYANDT	PASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKM

.*****:*****:*

Fig. 1 - continuación

Numeración	30	40	50	60	70	80
AEH25057	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25059	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25058	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25067	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25071	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25072	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25074	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25076	TQTMRDVT	PYTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25075	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25073	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25070	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25069	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25066	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25060	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25068	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25063	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25065	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25062	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25061	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25056	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25051	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
AEH25064	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
SEQ4	TQTMRDVT	PN S WPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQ K GILSQGSCPTPNSIYV		
SEQ6	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYR E KFQQGILSQGSCP A PNSIYV		
SEQ2	TQTMRDVT	PNTWPEWP	VKLG	YITPRGEHLISLMGGFYR E KFQQGILSQGSCPTPNSIYV		
	*****	:	*****	:	****	:*****:*****

Fig. 1 - continuación

Numeración	90	100	110	120	130	140
AEH25057		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGVCSMDKTQVQQAVE		
AEH25059		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVE		
AEH25058		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE		
AEH25067		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVE		
AEH25071		WTDVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVE		
AEH25072		WTDVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVE		
AEH25074		WADVEQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVE		
AEH25076		WADVEQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVE		
AEH25075		WTDVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVE		
AEH25073		WTDVEQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE		
AEH25070		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVE		
AEH25069		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVE		
AEH25066		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE		
AEH25060		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE		
AEH25068		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE		
AEH25063		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE		
AEH25065		WADVEQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE		
AEH25062		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE		
AEH25061		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE		
AEH25056		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE		
AEH25051		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE		
AEH25064		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLT	IHHQQD	IKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE		
SEQ4		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAP	QCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE			
SEQ6		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAP	QCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVE			
SEQ2		WADVDQRTLKTGEAFLAGLAP	QCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGTCSMDKTRLQQA			
		*: *: *****: * *****: : ***** *****: *****				

Fig. 1- continuación

Numeración	150	160	170	180	190	200
AEH25057	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPFLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNK
AEH25059	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPFLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNK
AEH25058	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPFLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNT
AEH25067	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPFLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNT
AEH25071	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPSLALMNTTLN	FSKSPWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNE
AEH25072	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPSLALMNTTLN	FSKSPWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNE
AEH25074	KEAQT	PIDN	LNQRY	IPSLALMNTTLN	FSKSPWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNE
AEH25076	KEAQT	PIDN	LNQRY	IPSLALMNTTLN	FSKSPWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNE
AEH25075	KEAQT	PIDN	LNQRY	IPSLALMNTTLN	FSKSPWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNE
AEH25073	KEAQT	PIDN	LNQRY	IPSLALMNTTLN	FSKSPWCQKHSADK	KNCDLALSMPSKLS IKDNGNE
AEH25070	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPFLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNE
AEH25069	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPFLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNT
AEH25066	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPFLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNK
AEH25060	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPFLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNE
AEH25068	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPFLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCELGLSMPSKLS IKDNGNE
AEH25063	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPFLALMNTTLN	FSKSAWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNK
AEH25065	KEAQT	PIDN	LNQRY	IPFLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNK
AEH25062	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPFLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNK
AEH25061	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPFLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNK
AEH25056	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPFLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNK
AEH25051	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPFLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNK
AEH25064	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPSLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCDLGLSMPSKLS IKDNGNK
SEQ4	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPSLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCDLAQSMPKLS IKDNGNK
SEQ6	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPSLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCDLAQSMPKLS IKDNGNK
SEQ2	KEAQT	PIDN	LNQHY	IPSLALMNTTLN	FSTSAWCQKHSADK	SCDLAQSMPKLS IKDNGNK
	****	**	*****	****	*****	*****

Fig. 1 - continuación

Numeración	210	220	230	240	250	260
AEH25057		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIA			
AEH25059		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIA			
AEH25058		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIA			
AEH25067		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIA			
AEH25071		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMERTPYIA			
AEH25072		VSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMERTPYIA			
AEH25074		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQVAVWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMERTPYIA			
AEH25076		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQVAVWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMERTPYIA			
AEH25075		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQVAVWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMERTPYIA			
AEH25073		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMERTPYIA			
AEH25070		VSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMERTPYIA			
AEH25069		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMERTPYIA			
AEH25066		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMERTPYIA			
AEH25060		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMERTPYIA			
AEH25068		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIA			
AEH25063		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIA			
AEH25065		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIA			
AEH25062		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIA			
AEH25061		VALCGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIA			
AEH25056		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIA			
AEH25051		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIA			
AEH25064		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIA			
SEQ4		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHN T QFDLMARTPYIA			
SEQ6		VALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	IHSEQEWASLLKLHN A QFDLMARTPYIA			
SEQ2		VALDGA V GLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGN	K IHSEQ D W A EL L LKLHN A QFDLMARTPYIA			
		: **:******.***:*****:* * * * * . * * * *				

Fig. 1- continuación

Numeración	270	280	290	300	310	320
AEH25057		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25059		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25058		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25067		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25071		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25072		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25074		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25076		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25075		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25073		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25070		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25069		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25066		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25060		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25068		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25063		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25065		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25062		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25061		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25056		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25051		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
AEH25064		RHNGTPLLQ	AISNALNP	NATESKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
SEC4		A HNGTPLLQ	T ISNAL E P	K ADVSKLP	D IS S DNKIL	FIAGHDTN
SEC6		T HNGTPLLQ	T ISNAL E P	K ADVSKLP	G ISPDNKIL	F LAGHDTN
SEC2		RHNGTPLLQ	AISNAL D P	N AT A SKLP	DISPDNKIL	FIAGHDTN
						I S G MLNMRWTLPGQP
						*****.*.*.*.* * ** *

Fig. 1- continuación

Numeración	330	340	350	360	370	380
AEH25057		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25059		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25058		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25067		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25071		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25072		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25074		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25076		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25075		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25073		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25070		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25069		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25066		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25060		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25068		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25063		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25065		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25062		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25061		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25056		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25051		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
AEH25064		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
SEQ4		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRAQTPLSLNEPAGSVQLKIPGCNDQ			
SEQ6		DNT	PPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQ			
SEQ2		DNT	PPGGALVFERLADKAGKQYVSVSMVYQTLEQLRAQTPLSLKEPAGSVQLKIPGCNDQ			
		*****	:*****	:****	:*****	:*****
		*****	:*****	:*****	:*****	:*****

Fig. 1- continuación

	Numeración	390	400	410
AEH25057		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25059		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25058		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25067		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25071		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25072		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25074		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25076		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25075		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25073		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25070		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25069		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25066		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25060		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25068		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25063		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25065		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25062		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25061		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25056		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25051		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
AEH25064		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
SEC4		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLP		
SEC6		TAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ		
SEC2		TAEGYCPLPTFKRVVSQSVEPGCQLQ		

***** ** ***** *****

Fig. 2

Programa: needle
 Matriz: BLOSUM62
 Penalización inicial de gap: 10,0
 Penalización de extensión de gap: 0,5
 Número de residuos idénticos: 315
 Longitud de la secuencia más corta: 413
 % Identidad: 315/413 = 76,3 %

SEQ2_mature	1		NDTPASGYQVEKVVILS	17
			:: .. : : : : :	
UNIPROTQ6U677	1	MTISLFTHSPTRLKCMPLAFIAASMLTTASYASETEPSGYQLEKVVILS		50
SEQ2_mature	18	RHGVRAPTKMTQTMRDVTNPNTWPEWPVKLGYITPRGEHLISLMGGFYREK		67
		: :		
UNIPROTQ6U677	51	RHGVRAPTKMTQTMRDVTPNAWPEWPVKLGYITPRGEHLVSLMGGFYRQK		100
SEQ2_mature	68	FQQQGILSQGSCPTPNSIYVWADVVDQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQ		117
		: :		
UNIPROTQ6U677	101	FQQLGILSKGRCPTANDVYVWADVVDQRTLKTGEAFLAGLAPECHLSIHHQ		150
SEQ2_mature	118	QNLEKADPLFHPVKAGTCSMDKTRLQQAVEKEAQTP IENLNQHYI PSLAL		167
		: :		
UNIPROTQ6U677	151	QDIKQADPLFHPVKAGVCTMEKTQVQQAVEQQAGMPIDQLNQHYRPAAL		200
SEQ2_mature	168	MNTTLNFEFSAWCQKHSADKSCDLAQSMPSKLSIKDNGNKVALDGAVALS		217
		: :		
UNIPROTQ6U677	201	MSSVLNFPKSTYCCQHSADQTCDLAQAMPSKLSIKDNGNKVALDGAVALS		250
SEQ2_mature	218	STLAEIFLLEYAQGMPQAAWGKIHSEQDWAELLKLHNAQFDLMARTPYIA		267
		: :		
UNIPROTQ6U677	251	STLAEIFLLEYAQGMPDAAWGKIHSEQDWNALLTLHNAQFDLMSRTPYIA		300
SEQ2_mature	268	RHNGTPLLQAISNALDPNATASKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANISGML		317
		: :		
UNIPROTQ6U677	301	KHNGTPLLQTIIVSAINSQPSSRELPELSADNKILFPAGHDTNIANIAGMF		350
SEQ2_mature	318	NMRWTLPGQPDNTPPGGALIFERLADKAGKQYVSVSMVYQTLQLRAQTP		367
		: :		
UNIPROTQ6U677	351	GMSWALPGQPDNTPPGGALVFERWSDKTGKKYVSVQMMYQTLAQLRNQTP		400
SEQ2_mature	368	LSLKEPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLPTFKRVVSQSEEPGCQLQ		413
		: :		
UNIPROTQ6U677	401	LTLDKPAGSVALKIPGCDDQTAEGYCLDFTFTRLAKQNELVECQ		444