

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 255 281**

51 Int. Cl.:

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.1999 E 99935340 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **01.05.2013 EP 1090129**

54

Título: **Sobreexpresión de genes de fitasa en sistemas de levadura**

30

Prioridad:

25.06.1998 US 104769

45

Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
04.06.2013

73

Titular/es:

CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.
(100.0%)
20 THORNWOOD DRIVE, SUITE 105
ITHACA, NY 14850, US

72

Inventor/es:

LEI, XINGEN

74

Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 255 281 T5

DESCRIPCIÓN

Sobreexpresión de genes de fitasa en sistemas de levadura

Campo de la invención

- La presente invención se refiere a un método de producción de fitasa en levadura, a cepas de levadura que expresan fitasa heteróloga y a la fitasa heteróloga producida por levadura.

Antecedentes de la invención

- Las fitasas, un grupo específico de monoéster fosfatasa, son necesarias para iniciar la liberación de fosfato ("P") a partir de fitato (hexafosfato de mioinositol), la forma de almacenamiento principal del P en alimentos o piensos cereales (Reddy, N.R. *et al.*, "Phytates in Legumes and Cereals", Advances in Food Research, 28: 1 (1982)). Debido a que los animales con un solo estómago como cerdos y aves de corral, así como seres humanos, tienen poca actividad fitasa en sus tractos gastrointestinales, casi todo el P de fitato ingerido es indigerible. Esto da como resultado la necesidad de suplementar con P inorgánico, un nutriente costoso y no renovable, las dietas para estos animales. Más indeseablemente, el P de fitato inutilizado excretado a través del abono de estos animales se convierte en contaminación por P del ambiente (Cromwell, G.L. *et al.*, "P – A Key Essential Nutrient, Yet a Possible Major Pollutant- Its Central Role in Animal Nutrition", Biotechnology in the Feed Industry; Proceedings Alltech 7th Annual Symposium, pág. 133 (1991)). Además, el fitato quela oligoelementos esenciales como cinc y produce deficiencias de nutrientes tales como retardo de crecimiento y mental en niños que ingieren principalmente alimentos de origen vegetal sin eliminación de fitato.

- Se han clonado y secuenciado dos fitasas, *phyA* y *phyB*, a partir de NRRL3135 de *Aspergillus niger* (Ehrlich, K.C. *et al.*, "Identification and Cloning of a Second Phytase Gene (*phys*) from *Aspergillus niger* (*ficuum*)", Biochem. Biophys. Res. Commun., 195: 53-57 (1993); Piddington, C.S. *et al.*, "The Cloning and Sequencing of the Genes Encoding Phytase (*phy*) and pH 2.5-optimum Acid Phosphatase (*aph*) from *Aspergillus niger* var. *awamori*", Gene, 133: 56-62 (1993)). Recientemente, se han aislado nuevos genes de fitasa a partir de *Aspergillus terreus* y *Myceliophthora thermophila* (Mitchell *et al.*, "The Phytase Subfamily of Histidine Acid Phosphatases: Isolation of Genes for Two Novel Phytases From the Fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*", Microbiology, 143: 245-252, (1997)), *Aspergillus fumigatus* (Pasamontes *et al.*, "Gene Cloning, Purification, and Characterization of a Heat-Stable Phytase from the Fungus *Aspergillus fumigatus*", Appl. Environ. Microbiol., 63: 1696-1700 (1997)), *Emericella nidulans* y *Talaromyces thermophilus* (Pasamontes *et al.*, "Cloning of the Phytase from *Emericella nidulans* and the Thermophilic Fungus *Talaromyces thermophilus*", Biochim. Biophys. Acta, 1353: 217-223 (1997)), y maíz (Maugenest *et al.*, "Cloning and Characterization of a cDNA Encoding a Maize Seedling Phytase", Biochem. J., 322: 511-517 (1997)).

- Se han aislado y/o purificado diversos tipos de enzimas fitasa a partir de *Enterobacter sp. 4* (Yoon *et al.*, "Isolation and Identification of Phytase-Producing Bacterium, *Enterobacter sp. 4*, and Enzymatic Properties of Phytase Enzyme", Enzyme and Microbial Technology 18: 449-454 (1996)), *Klebsiella terrigena* (Greiner *et al.*, "Purification and Characterization of a Phytase from *Klebsiella terrigena*", Arch. Biochem. Biophys. 341: 201-206 (1997)), y *Bacillus sp. DS11* (Kim *et al.*, "Purification and Properties of a Thermostable Phytase from *Bacillus sp. DS11*", Enzyme and Microbial Technology 22: 2-7 (1998)). Se han estudiado las propiedades de estas enzimas. Además, se ha reseñado la estructura cristalina de *phyA* de *Aspergillus ficuum* (Kostrewa *et al.*, "Crystal Structure of Phytase from *Aspergillus ficuum* at 2.5 Å Resolution", Nature Structure Biology 4: 185-190 (1997)). Greiner *et al.*, Arch. of Biochemistry and Biophysics 303, pp. 107-113, 1993 divulga la purificación y caracterización de dos fitasas de *E. coli*, una de las cuales supuestamente tiene propiedades químicas y cinéticas similares a una fosfatasa ácida a pH 2,5 caracterizada por Dassa *et al.*, J. Biol. Chem. 257, pp. 6669-6676, 1982.

- Hartingsveldt *et al.* introdujeron el gen *phyA* en *A. niger* y obtuvieron un aumento de diez veces de la actividad fitasa, en comparación con el tipo silvestre ("Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*", Gene 127: 87-94 (1993)). Se ha mostrado que la fitasa microbiana suplementaria de esta fuente en las dietas para cerdos y aves de corral es eficaz en la mejora de la utilización de P de fitato y cinc (Simons *et al.*, "Improvement of Phosphorous Availability By Microbial Phytase in Broilers and Pigs", Br. J. Nutr., 64: 525 (1990); Lei, X.G. *et al.*, "Supplementing Corn-Soybean Meal Diets With Microbial Phytase Linearly Improves Phytate P Utilization by Weaning Pigs", J. Anim. Sci., 71: 3359 (1993); Lei, X.G. *et al.*, "Supplementing Corn-Soybean Meal Diets With Microbial Phytase Maximizes Phytate P Utilization by Weaning Pigs", J. Anim. Sci., 71: 3368 (1993); Cromwell, G.L. *et al.*, "P- A Key Essential Nutrient, Yet a Possible Mayor Pollutant- Its Central Role In Animal Nutrition", Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings Alltech 7th Annual Symposium, pág. 133 (1991)). Sin embargo, los gastos del suministro limitado de fitasa comercial disponible y la inestabilidad de la actividad de la enzima ante el calor de peletización de pienso imposibilita su uso práctico en la industria animal (Jongbloed, A.W. *et al.*, "Effect of Pelleting Mixed Feeds on Phytase Activity and Apparent Absorbability of Phosphorous and Calcium in Pigs", Animal Feed Science and Technology, 28: 233-242 (1990)). Además, la fitasa producida a partir de *A. niger* no es presuntamente la fuente más segura para la fabricación de alimentos humanos.

La levadura puede utilizarse para producir eficazmente enzimas mientras crece en medios sencillos y económicos.

Con una secuencia señal apropiada, la enzima puede secretarse a los medios para una recogida conveniente. Algunos sistemas de expresión de levadura tienen la ventaja añadida de ser bien aceptados en la industria alimentaria y son productores seguros y eficaces de productos alimentarios.

- 5 *Pichia pastoris* es una levadura metilotrófica capaz de metabolizar metanol como su única fuente de carbono. Este sistema es bien conocido por su capacidad de expresar niveles altos de proteínas heterólogas. Debido a que es un eucariota, *Pichia* tiene muchas de las ventajas de los sistemas de expresión eucariótica superiores tales como procesamiento, plegamiento y modificación postranscripcional de proteínas.

Por tanto, existe la necesidad de desarrollar un sistema eficaz y sencillo para producir económicamente fitasa para aplicación a la industria de alimentos y piensos.

10 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método de producción de fitasa en levadura que comprende proporcionar un gen *appA* aislado a partir de células bacterianas, codificando dicho gen *appA* una proteína o polipéptido con actividad fitasa, expresar dicho gen *appA* en una cepa de levadura y aislar la proteína o polipéptido expresado.

- 15 La presente invención se refiere también a una proteína o polipéptido obtenible mediante dicho método y que tiene actividad fitasa, con una actividad óptima en el intervalo de temperatura de 57-65°C a un pH de 2,5 a 3,5 o de 5,5. El pH óptimo a 2,5 a 3,5 es particularmente importante para la fitasa porque ese es el pH del estómago de los animales.

- 20 La invención proporciona adicionalmente una cepa de levadura que comprende un gen *appA* aislado a partir de células bacterianas, codificando dicho gen *appA* una proteína o polipéptido con actividad fitasa y que está ligado funcionalmente a un promotor capaz de expresar fitasa en levadura, en la que dicha proteína o polipéptido tiene una termoestabilidad aumentada cuando se expresa en una célula hospedadora de levadura en comparación con la de dicha proteína o polipéptido expresado en una célula hospedadora no de levadura.

- 25 Es aún otro aspecto de la invención un vector que comprende un gen *appA* aislado a partir de células bacterianas, codificando dicho gen una proteína o polipéptido con actividad fitasa; un promotor ligado funcionalmente al gen *appA*, siendo dicho promotor capaz de iniciar la transcripción en levadura; y un origen de replicación capaz de mantener el vector en levadura, en el que dicha proteína o polipéptido tiene una termoestabilidad aumentada cuando se expresa en una célula hospedadora de levadura en comparación con la de dicha proteína o polipéptido expresado en una célula hospedadora no de levadura.

- 30 La invención incluye también un método de conversión de fitato en inositol y fosfato inorgánico. El gen *appA* aislado a partir de células bacterianas expresa una proteína o polipéptido con actividad fitasa en una célula hospedadora. La proteína o polipéptido se pone después en contacto con fitato para catalizar la conversión de fitato en inositol y fosfato inorgánico.

Breve descripción de los dibujos

- 35 La Figura 1 muestra un análisis PAGE-SDS de proteína soluble preparada a partir de *E. coli* transformada con el gen de fitasa inducido con IPTG. Las células se hicieron crecer 4 horas antes de recoger. Carril 1: marcador; carriles 2 y 3: transformantes de pEP1 (la proteína expresada era de aproximadamente 55 kDa); carril 4: transformante con sólo el vector de expresión pET25b(+).

- 40 La Figura 2 muestra el análisis de transferencia Western de la proteína fitasa expresada en *E. coli*. El anticuerpo se creó contra fitasa nativa purificada de *A. niger*. Cada carril contenía 50 µg de proteína intracelular total. Carriles 1 y 2: recombinantes después y antes de la inducción; carriles 3 y 4: control (sólo el vector de expresión) después y antes de la inducción.

- 45 La Figura 3 es una imagen de barrido de análisis de transferencia Northern del ARNm de *PhyA* en *E. coli*. Se utilizó una sonda de 1,4 kb de *PhyA*. Cada carril contenía 20 µg de ARN total. Carriles 1 y 2: ARN aislado a partir de las células control (sólo el vector de expresión) antes y después de la inducción; carriles 3 y 4: ARN aislado a partir de los recombinantes que contienen *PhyA* antes y después de la inducción.

La Figura 4 es un curso cronológico de la expresión inducida de fitasa (pEP1) en BL21 (DE3) de *E. coli*. Las células se indujeron cuando la DO₆₀₀ alcanzó 0,5. Se cuantificó la proteína soluble, preparada en cada momento, mediante análisis PAGE-SDS.

- 50 La Figura 5 muestra un análisis PAGE-SDS de la proteína fitasa extracelular expresada mediante *S. lividans* transformada con fitasa después de crecer durante 72 horas. Se centrifugaron las células durante 15 minutos a 8.000 x g, y se sometió el sobrenadante a electroforesis en gel. Carril 1: marcador; carril 2: control con sólo el vector de expresión; carril 3: la colonia positiva expresó fitasa y el tamaño era de aproximadamente 57 kDa.

La Figura 6 muestra el análisis de transferencia Western de la fitasa expresada por *S. lividans* utilizando un anticuerpo de fitasa creado contra fitasa nativa purificada de *A. niger*. Se cargó cada carril con 20 µg de medio

proteico (sobrenadante). Carril 1: sobrenadante del cultivo celular control transformado con vector; carril 2: sobrenadante del cultivo inoculado con la colonia positiva.

La Figura 7 representa un análisis PAGE-SDS de la fitasa extracelular expresada por *S. cerevisiae*. Cada carril se cargó con 50 µg de medio proteico (sobrenadante). Carriles 1 a 3: sobrenadante del cultivo inoculado con la colonia positiva recogido a 5, 10 y 25 horas después de la inducción, respectivamente; carriles 4 a 6: sobrenadante del cultivo celular control transformado con vector recogido a 5, 10 y 25 horas después de la inducción, respectivamente; carril 7: marcador (kDa). La fitasa expresada era de aproximadamente 110 kDa (confirmado por transferencia Western).

La Figura 8 es un curso cronológico de la actividad fitasa extracelular expresada por *S. cerevisiae* transformada con el constructo pYPP1 después de inducción por galactosa. Se analizó la actividad en el sobrenadante del medio recogido.

La Figura 9 muestra el análisis de transferencia Western de la fitasa extracelular expresada por *S. cerevisiae* antes y después de desglucosilación (Endo H), utilizando un anticuerpo de fitasa creado contra fitasa nativa purificada de *A. niger*. Carril 1: patrones de PAGE-SDS preteñidos (kDa) de Bio-Rad; carriles 2 y 3: 10 y 20 µg de proteína fitasa desglucosilada, respectivamente; carril 4: fitasa glicosilada (20 µg de proteína).

La Figura 10 es una imagen de barrido de análisis de transferencia Northern para ARN total aislado a partir de células de *S. cerevisiae* transformadas. Carril 1: control (con sólo el vector de expresión pYES2); carriles 2 y 3: transformantes de pYPP1.

La Figura 11 es un curso cronológico de la actividad fitasa de *phyA* extracelular producida mediante transformantes de *Pichia pastoris* Mut^s (KM71) y Mut⁺ (X33) después de la inducción.

La Figura 12 representa un análisis PAGE-SDS de la fitasa sobreexpresada en *Pichia* con el constructo de pPICZαA-PhyA en KM71 (MUT^s). Carril 1: escala de proteínas. Carril 2: 40 µl de sobrenadante de AK1 (una colonia mostró 21.700 mU/ml de fitasa extracelular), recogido 108 horas después de la inducción. Carril 3: 40 µl del sobrenadante de una cepa de control que sobreexpresa albúmina sérica humana (HAS, 6,7 kDa) a un nivel de 1 g/l. Carril 4: 40 µl del sobrenadante del control KM71.

La Figura 13 representa los efectos de la desglucosilación por Endo H sobre la termoestabilidad de la fitasa expresada en *Pichia*. Se midió la actividad fitasa después de calentar las enzimas durante 15 minutos a 37°C u 80°C en tampón citrato 0,2 M, pH 5,5.

La Figura 14 es una imagen de barrido de análisis Northern del ARNm de *phyA* expresado por las cepas transformadas de *Pichia pastoris* (KM71 y X33). Se utilizó una sonda de *phyA* de 1,3 kb para transferencia. Carriles 1 y 2: el transformante de KM71 antes y después de la inducción; carriles 3 y 4: el transformante de X33 después y antes de la inducción.

La Figura 15 muestra el pH óptimo de la fitasa extracelular expresada por *Pichia* (X33). Se utilizaron tampones de glicina-HCl 0,2 M para pH 1,5, 2,5, 3,5; citrato de sodio 0,2 M para pH 4,5, 5,5, 6,5 y Tris-HCl 0,2 M para pH 7,5 y 8,5.

La Figura 16 muestra la temperatura óptima de la fitasa extracelular expresada por *Pichia* (X33). Los ensayos se realizaron en tampón citrato 0,2 M, pH 5,5.

La Figura 17 representa la liberación de fósforo libre a partir de soja mediante la fitasa expresada en *Pichia* (X33). Se suspendieron cinco gramos de soja en 25 ml de citrato 0,2 M, pH 5,5, con diferentes cantidades de la enzima. Se realizó la incubación durante 4 horas a 37°C y se determinó el fósforo liberado en el sobrenadante.

La Figura 18 muestra un curso cronológico de la expresión de la actividad fitasa extracelular de cinco transformantes de *Pichia pastoris* que contenían el gen *appA* de *E. coli*.

La Figura 19 muestra gráficamente la relación entre el pH del medio y la expresión de actividad fitasa por *Pichia pastoris*.

La Figura 20 es un análisis PAGE-SDS de la fitasa de *E. coli* sobreexpresada en *Pichia pastoris*. Carril 1: escala de proteínas; carriles 2 a 4: sobrenadantes recogidos de los cultivos de las colonias positivas 23, 22 y 11, respectivamente, 118 horas después de la inducción.

La Figura 21 muestra gráficamente el pH óptimo de la fitasa de *E. coli* sobreexpresada por *Pichia pastoris*.

La Figura 22 muestra gráficamente la temperatura óptima de la fitasa de *E. coli* sobreexpresada por *Pichia pastoris*.

La Figura 23 muestra la cantidad de fósforo libre liberado a partir de harina de soja por la fitasa de *E. coli* sobreexpresada por *Pichia pastoris*.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento de producción de fitasa en levadura. Según este método, se expresa un gen *appA* aislado a partir de células bacterianas en una cepa de levadura, codificando dicho gen *appA* una proteína o polipéptido con actividad fitasa, y se aísla la proteína o polipéptido expresado.

- 5 Las enzimas que catalizan la conversión de fitato en inositol y fósforo inorgánico son ampliamente conocidas como fitasas. Los microorganismos productores de fitasa comprenden bacterias tales como *Bacillus subtilis* (Paver *et al.*, J. Bacteriol. 151, 1102 (1982), que se incorpora por la presente como referencia) y *Pseudomonas* (Cosgrove, Austral. J. Biol. Sci. 23: 1207 (1970), que se incorpora por la presente como referencia); levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae* (Nayini *et al.*, Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 17: 24 (1984), que se incorpora por la presente como referencia) y hongos tales como *Aspergillus terreus* (Yamada *et al.*, Agric. Biol. Chem., 32: 1275 (1986), que se incorpora por la presente como referencia) y *Aspergillus ficuum* (van Gorcom *et al.*, solicitud de patente europea 89/202.436, que se incorpora por la presente como referencia).

- 15 Las fitasas están también presentes endógenamente en muchas especies de plantas. Loewus, en "Plant Biology" vol. 9, "Inositol Metabolism in Plants" (eds. D. J. Morre, W.F. Boss, F.A. Loewus) 13 (1990); y Gellatly *et al.*, Plant Physiology (suplemento) 93: 562 (1990), que se incorporan por la presente como referencia; citan el aislamiento y caracterización de un clon de ADNc de fitasa obtenido a partir de tubérculos de patata. Gibson *et al.*, J. Cell. Biochem., 12C: L407 (1988) y Christen *et al.*, J. Cell Biochem., 12C: L402 (1988), que se incorporan a la presente como referencia, citan la síntesis de fitasa endógena durante la germinación de semillas de soja.

- 20 Preferiblemente, la proteína o polipéptido con actividad fitasa se secreta por la célula en los medios de crecimiento. Esto permite unos mayores niveles de expresión y un aislamiento más fácil del producto. La proteína o polipéptido con actividad fitasa se acopla a una secuencia señal capaz de dirigir la proteína fuera de la célula. Preferiblemente, la secuencia señal se escinde de la proteína.

El gen *appA* puede ajustarse en fase con un elemento potenciador transcripcional.

Se aíslan proteínas que codifican el gen *appA* con actividad fitasa a partir de una célula bacteriana.

- 25 Es un gen *appA* preferido el gen *appA* aislado a partir de *E. coli*. El gen, originalmente definido como gen de fosfoanhidrido fosfohidrolasa periplásmica de *E. coli* (*appA*), contiene 1.298 nucleótidos (número de acceso a GeneBank M58708). Se encontró primero que el gen codificaba una proteína fosfatasa ácida de pH óptimo de 2,5 (EcAP) en *E. coli*. La fosfatasa ácida es un monómero con una masa molecular de 44.644 Da. La EcAP madura contiene 410 aminoácidos (Dassa, J. *et al.*, "The Complete Nucleotide Sequence of the Escherichia Coli Gene AppA Reveals Significant Homology Between pH 2.5 Acid Phosphatase and Glucose-1 Phosphatase", J. Bacteriology, 172: 5497-5500 (1990), que se incorpora por la presente como referencia). Ostanin *et al.* sobreexpresaron *appA* en BL21 de *E. coli* utilizando un vector pT7, y aumentaron su actividad fosfatasa ácida en aproximadamente 400 veces (440 mU/mg de proteína) (Ostanin, K. *et al.*, "Overexpression, Site-Directed Mutagenesis, and Mechanism of Escherichia Coli Acid Phosphatase", J. Biol. Chem., 267: 22830-22836 (1992), que se incorpora por la presente como referencia). El producto del gen *appA* no era anteriormente conocido por tener actividad fitasa.

- El gen *appA* puede expresarse en cualquier sistema de expresión procariótico o eucariótico. Puede utilizarse una variedad de sistemas hospedador-vector para expresar la(s) secuencia(s) codificadoras de proteína. Los vectores preferidos incluyen un vector viral, plásmido, cósmido o un oligonucleótido. Principalmente, el sistema vector debe ser compatible con la célula hospedadora utilizada. Los sistemas hospedador-vector incluyen, pero sin limitación, los siguientes: bacterias transformadas con ADN de bacteriófago, ADN de plásmido o ADN de cósmido; microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura; sistemas de células de mamífero infectadas con virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus, etc.); sistemas de células de insecto infectadas con virus (por ejemplo, baculovirus); y células de planta infectadas con bacterias. Los elementos de expresión de estos vectores varían en su potencia y especificidades. Dependiendo del sistema hospedador-vector utilizado, puede utilizarse uno cualquiera de una serie de elementos de transcripción y traducción adecuados.

- Los hospedadores para expresar *appA* incluyen especies de levadura, que pueden utilizarse como células hospedadoras según la presente invención. Las células hospedadoras de levadura preferidas incluyen diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Pueden utilizarse también otras levaduras como *Kluyveromyces*, *Torulaspora* y *Schizosaccharomyces*. En una realización preferida, la cepa de levadura utilizada para sobreexpresar la proteína es *Saccharomyces cerevisiae*.

- En otra realización preferida de la presente invención, la cepa de levadura es una cepa de levadura metilotrófica. Las levaduras metilotróficas son aquellos géneros de levadura capaces de utilizar metanol como fuente de carbono para la producción de los recursos energéticos necesarios para mantener la función celular y que contienen un gen para la expresión de alcohol oxidasa. Las levaduras metilotróficas típicas incluyen miembros de los géneros *Pichia*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Candida* y *Karwinskia*. Estos géneros de levadura pueden utilizar metanol como única fuente de carbono. En una realización más preferida, la cepa de levadura metilotrófica es *Pichia pastoris*.

La presente invención proporciona también una proteína o polipéptido con actividad fitasa. AppA se expresa en

Pichia y *Saccharomyces cerevisiae*, teniendo la proteína resultante una actividad extracelular mucho más alta y un pH óptimo mucho más preferido de 2,5 a 3,5.

Es una realización preferida de la invención una proteína o polipéptido que tiene actividad fitasa con actividad óptima en un intervalo de temperatura de 57 a 65°C. Es una realización más preferida una proteína o polipéptido que tiene actividad fitasa en la que su intervalo de temperatura para actividad óptima es de 58 a 62°C.

Es aún otra realización preferida una proteína o polipéptido que tiene actividad fitasa en la que la proteína retiene al menos un 40% de su actividad después de calentar la proteína durante 15 minutos a 80°C. Es más preferida una proteína o polipéptido que tiene actividad fitasa en la que la proteína retiene al menos un 60% de su actividad después de calentar la proteína durante 15 minutos a 60°C.

- 10 La proteína purificada puede obtenerse mediante diversos métodos. La proteína o polipéptido de la presente invención se produce preferiblemente en forma purificada (preferiblemente al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente 90% pura) mediante técnicas convencionales. Típicamente, la proteína o polipéptido de la presente invención se secreta en el medio de crecimiento de células hospedadoras recombinantes. Como alternativa, la proteína o polipéptido de la presente invención se produce, pero no se secreta en el medio de crecimiento. En dichos casos, para aislar la proteína, se propaga la célula hospedadora que porta un plásmido recombinante, se lisa mediante sonicación, calor o tratamiento térmico, y se centrifuga el homogeneizado para retirar los desechos celulares. Se somete después el sobrenadante a precipitación secuencial con sulfato de amonio. Se somete la fracción que contiene el polipéptido o proteína de la presente invención a filtración en gel en una columna de dextrano o poli(acrilamida) de tamaño apropiado para separar las proteínas. Si es necesario, la fracción de proteína puede purificarse adicionalmente por HPLC.

- 20 La presente invención proporciona también una cepa de levadura que comprende un gen *appA* aislado a partir de células bacterianas, codificando dicho gen *appA* una proteína o polipéptido con actividad fitasa y estando ligado funcionalmente a un promotor capaz de expresar fitasa en levadura, en la que dicha proteína o polipéptido tiene una termoestabilidad aumentada cuando se expresa en una célula hospedadora de levadura en comparación con la de dicha proteína o polipéptido expresado en una célula hospedadora no de levadura.

- Es aún otro aspecto de la invención un vector para expresar fitasa en levadura. El vector porta un gen *appA* aislado a partir de células bacterianas, codificando dicho gen una proteína o polipéptido con actividad fitasa. El gen *appA* puede clonarse en cualquier vector que se replique autónomamente o se integre en el genoma de levadura. El número de copias de plásmidos replicantes autónomos, por ejemplo plásmidos YEp, puede ser alto, pero su estabilidad mitótica puede ser insuficiente (Bitter *et al.*, "Expression and Secretion Vectors for Yeast", Meth. Enzymol. 153: 516-544 (1987), que se incorpora por la presente como referencia). Pueden contener la secuencia de plásmido 2 mu responsable de la replicación autónoma, y una secuencia de *E. coli* responsable de la replicación en *E. coli*. Los vectores contienen preferiblemente un marcador genético para la selección de transformantes de levadura, y un gen de resistencia a antibiótico para la selección en *E. coli*. Los vectores episomiales que contienen las secuencias ARS y CEN aparecen como una sola copia por célula, y son más estables que los vectores YEp. Se utilizan vectores integrativos cuando se integra un fragmento de ADN como una o múltiples copias en el genoma de levadura. En este caso, el ADN recombinante es estable y no necesita selección (Struhl *et al.*, "High-Frequency Transformation of Yeast: Autonomous Replication of Hybrid DNA Molecules", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1035-1039 (1979); Powels *et al.*, "Cloning Vectors I-IV" y siguientes, Elsevier (1985); Sakai *et al.*, "Enhanced Secretion of Human Nerve Growth Factor from *Saccharomyces cerevisiae* Using an Advanced δ -Integration System", Biotechnology 9: 1382-1385 (1991), que se incorporan por la presente como referencia). Algunos vectores tienen un origen de replicación que funciona en la célula hospedadora seleccionada. Los orígenes de replicación adecuados incluyen 2 μ , ARS1 y 25 μ M. Los vectores tienen sitios de endonucleasa de restricción para la inserción del gen de fusión y secuencias promotoras, y marcadores de selección. Los vectores pueden modificarse mediante retirada o adición de sitios de restricción, o retirada de otros nucleótidos indeseados.

- El gen *appA* puede disponerse bajo el control de cualquier promotor (Stetler *et al.*, "Secretion of Active, Full- and Half-Length Human Secretory Leukocyte Protease Inhibitor by *Saccharomyces cerevisiae*", Biotechnology 7: 55-60, (1989), que se incorpora por la presente como referencia). Puede elegirse un promotor de levadura constitutivo o regulado. Las secuencias promotoras adecuadas para vectores de levadura incluyen, entre otros, promotores de metalotioneína, 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem. 255: 2073 (1980), que se incorpora por la presente como referencia) u otras enzimas glicolíticas (Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149 (1968); y Holland *et al.*, Biochem. 17: 4900 (1978), que se incorporan por la presente como referencia) tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructolanasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa. Otros vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levadura se describen adicionalmente en el documento EP-A-73.657 de Hitzeman, que se incorpora por la presente como referencia. Otra alternativa es el promotor ADH2 reprimible por glucosa descrito por Russell *et al.*, J. Biol. Chem. 258: 2674 (1982) y Beier *et al.*, Nature 300: 724 (1982), que se incorporan por la presente como referencia.

- Puede elegirse un promotor de levadura constitutivo o regulado. Los promotores fuertes, por ejemplo, del gen fosfoglicerato quinasa (PGK), de otros genes que codifican enzimas glicolíticas y del gen de factor alfa, son

constitutivos. Cuando se utiliza un promotor constitutivo, se sintetiza el producto durante el crecimiento celular. El promotor ADH2 está regulado con etanol y glucosa, los promotores GAL-1-10 y GAL7 con galactosa y glucosa, el promotor PHO5 con fosfato, y el promotor de metalotionina con cobre. Los promotores de shock térmico, a los que pertenece el promotor HSP150, se regulan mediante la temperatura. Pueden utilizarse también promotores híbridos.

- 5 Se utiliza un promotor regulado cuando la expresión continua del producto deseado es dañina para las células hospedadoras. En lugar de promotores de levadura, puede utilizarse un promotor procariótico fuerte tal como el promotor T7, pero en este caso la cepa de levadura ha de transformarse con un gen que codifique la polimerasa respectiva. Para la terminación de la transcripción, se utiliza el terminador HSP150, o cualquier otro terminador funcional. Aquí, los promotores y terminadores se denominan elementos de control. La presente invención no está
10 limitada a ningún vector, promotor ni terminador específico.

El vector puede portar también un marcador detectable. Los marcadores detectables son a menudo genes de resistencia a antibiótico o genes capaces de complementar cepas de levadura que tienen deficiencias metabólicas bien caracterizadas tales como mutantes deficientes en triptófano o histidina. Los marcadores detectables preferidos incluyen URA3, LEU2, HIS3, TRP1, HIS4, ARG4 o genes de resistencia a antibiótico.

- 15 El vector puede tener también un origen de replicación capaz de replicación en una célula bacteriana. La manipulación de vectores es más eficaz en cepas bacterianas. Los orígenes de replicación bacterianos preferidos son ColE1, Ori u oriT.

- Puede utilizarse una secuencia líder de la levadura o de genes de fitasa u otras fuentes para soportar la secreción de enzima fitasa expresada en el medio. La presente invención no está limitada a ningún tipo específico de
20 secuencia líder o péptido señal.

- Las secuencias líder adecuadas incluyen la secuencia líder de factor alfa de levadura, que puede emplearse para dirigir la secreción de la fitasa. La secuencia líder de factor alfa se inserta a menudo entre la secuencia promotora y la secuencia génica estructural (Kurjan *et al.*, Cell 30: 933 (1982); Bitter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5330 (1984); patente de EE.UU. nº 4.546.082 y la solicitud de patente publicada europea nº 324.274, que se incorporan
25 por la presente como referencia). Otra secuencia líder adecuada es MF alfa 1 de *S. cerevisiae* (factor alfa), sintetizada como una preproforma de 165 aminoácidos, que comprende un péptido señal o prepéptido de 19 aminoácidos seguido por un péptido "líder" o propéptido de 64 aminoácidos, que comprende tres sitios de glicosilación ligados por N seguidos por (LysArg(Asp/Glu,Ala)2-3 factor alfa)4 (Kurjan *et al.*, Cell 30: 933-943 (1982), que se incorpora por la presente como referencia). La parte señal-líder de preproMF alfa 1 se ha empleado
30 ampliamente para obtener la síntesis y secreción de proteínas heterólogas en *S. cerevisiae*. El uso de péptidos señal/líder homólogos de levadura es conocido por la patente de EE.UU. nº 4.546.082, las solicitudes de patente europea nº 116.201, 123.294, 123.544, 163.529 y 123.289, y la solicitud de patente DK nº 3614/83, que se incorporan por la presente como referencia. En la solicitud de patente europea nº 123.289, que se incorpora por la presente como referencia, se describe la utilización del precursor de factor a de *S. cerevisiae*, mientras que el
35 documento WO 84/01153, que se incorpora por la presente como referencia, indica la utilización de péptido señal de invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*, y la solicitud de patente alemana DK 3614/83, que se incorpora por la presente como referencia, indica la utilización del péptido señal PH05 de *Saccharomyces cerevisiae* para la secreción de proteínas extrañas.

- La señal-líder de factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* (MF alfa 1 o MF alfa 2) puede utilizarse también en un
40 proceso de secreción de proteínas heterólogas expresadas en levadura (patente de EE.UU. nº 4.546.082, solicitudes de patente europea nº 16.201, 123.294, 123.544 y 163.529, que se incorporan por la presente como referencia). Al condensar una secuencia de ADN que codifica la secuencia señal/líder MF alfa 1 de *S. cerevisiae* en el extremo 5' del gen, se demostró la secreción de la proteína deseada y el procesamiento de la proteína deseada. El uso del péptido señal de amilasa salivar de ratón (o un mutante del mismo) para proporcionar la secreción de proteínas
45 heterólogas expresadas en levadura se ha descrito en las solicitudes PCT publicadas nº WO 89/02463 y WO 90/10075, que se incorporan por la presente como referencia.

- La patente de EE.UU. nº 5.726.038 describe el uso del péptido señal de la proteasa aspártica 3 de levadura, que es capaz de proporcionar una secreción mejorada de proteínas expresadas en levadura. Son conocidas por los expertos en la técnica otras secuencias líder adecuadas para facilitar la secreción de polipéptidos recombinantes a
50 partir de hospedadores de levadura. Puede modificarse una secuencia líder cerca de su extremo 3' para contener uno o más sitios de restricción. Esto facilitará la fusión de las secuencias líder con el gen estructural.

- Los protocolos de transformación de levadura son conocidos por los expertos en la técnica. Se describe uno de dichos protocolos por Hinnen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929 (1978), que se incorpora por la presente como referencia. El protocolo de Hinnen *et al.* selecciona transformantes de Trp en un medio selectivo, en el que el
55 medio selectivo consiste en 0,67% de base nitrogenada de levadura, 0,5% de casaminoácidos, 2% de glucosa, adenina 10 µg/ml y uracilo 20 µg/ml.

El gen *appA* puede mantenerse en un vector de expresión estable, un cromosoma artificial o mediante integración en el cromosoma de célula hospedadora de levadura. La integración en el cromosoma puede conseguirse mediante clonación del gen *appA* en un vector que se recombinará en un cromosoma de levadura. Los vectores adecuados

pueden incluir secuencias nucleotídicas que son homólogas de secuencias nucleotídicas en el cromosoma de levadura. Como alternativa, el gen *appA* puede localizarse entre sitios de recombinación tales como elementos transponibles, que pueden movilizar el gen en el cromosoma.

- La presente invención proporciona también un método de producción de fitasa al proporcionar un gen *appA* aislado a partir de células bacterianas que codifica una proteína o polipéptido con actividad fitasa, y al expresar el gen en una célula hospedadora que es una cepa de levadura. Preferiblemente, el gen *appA* se aísla a partir de *Escherichia coli*. Las cepas de levadura preferidas son *Saccharomyces*, *Kluveromyces*, *Torulaspora* y *Schizosaccharomyces*, en particular la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

- Se proporciona también un método para convertir fitato en inositol y fósforo inorgánico. Se aísla un gen *appA* a partir de células bacterianas utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Se expresa después una proteína o polipéptido con actividad fitasa a partir del gen en una célula hospedadora. La proteína o polipéptido resultante se mezcla o se pone en contacto con fitato. Esta técnica es especialmente útil para tratar fitato en alimentos o piensos animales.

El gen *appA* preferido se aísla a partir de *Escherichia coli*.

- Aunque la enzima fitasa producida en un sistema de levadura liberaba P de fitato a partir de maíz y soja tan eficazmente como la fitasa comercial actualmente, parecía ser más termoestable. Este sistema de sobreexpresión de fitasa en levadura puede utilizarse para proporcionar fitasa termoestable para uso en las industrias de alimentos y piensos.

Ejemplos

- Ejemplo 1-** Materiales y métodos para la sobreexpresión de *PhyA* en *E. coli*, *S. lividans* y un sistema de *Saccharomyces*.

- Gen de fitasa, cepas hospedadoras y plásmidos de expresión. El gen de fitasa, *phyA*, fue amablemente proporcionado por el Dr. E.J. Mullaney del USDA. El gen (número de acceso a GenBank M94550) estaba contenido en el plásmido pMD4.21 en la cepa HB101 de *E. coli*. Un fragmento SphI de 2,7 kb de ADN de *A. niger* contenía la región de codificación de la fitasa desglucosilada y sus secuencias flanqueantes 5' y 3'. El plásmido que contenía la secuencia de péptido señal, Spxy, del gen de xilanasasa activa de *Aureobasidium pullulans* (número de acceso a GenBank U10298) fue amablemente proporcionado por el Dr. X.L. Li de la Universidad de Georgia. La cepa DH5 α de *E. coli* se utilizó como hospedador inicial para todos los plásmidos recombinantes. Para expresar *phyA* en *E. coli*, se utilizaron el vector de expresión pET25b(+) (Novagen, Madison, WI) y el hospedador de expresión BL21 (DE3) pLysS. Para expresar *phyA* en TK24 de *S. lividans*, se utilizó el plásmido pSES1 (Jung, E.D., et al., "DNA Sequences and Expression in *Streptomyces Lividans* glucanase Gene and an Endoglucanase Gene from *Thermomonospora Fusca*", *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3032-3043 (1993), que se incorpora por la presente como referencia) para construir el plásmido lanzadera (del Dr. D.B. Wilson de la Universidad de Cornell, y él lo obtuvo del Dr. D.A. Hopwood, Instituto John Innes, Norwich; Inglaterra). Para expresar *phyA* en levadura, se utilizaron el vector de expresión pYES2 y la cepa INVScI de hospedador *S. cerevisiae* (Invitrogen, San Diego, CA).

- Construcciones y transformaciones de módulo de plásmido. Se enumeran en la Tabla 1 todos los plásmidos contruidos y los correspondientes hospedadores. Se amplificó un fragmento PCR de 1,4 kb del gen *phyA* a partir de pMD4.21 utilizando dos cebadores: cadena arriba 5'-CGG AAT TCG TCA CCT CCG GAC T-3' (SEC N° ID 1) y cadena abajo 5'-CCC AAG CTT CTA AGC AAA ACA CTC-3' (SEC N° ID 2). El fragmento resultante contenía la secuencia que codifica la fitasa desglucosilada de *A. niger*, *PhyA*, y el sitio de restricción *EcoRI* e *HindIII* cadena arriba y cadena abajo, respectivamente. Después de la purificación con el kit GeneClean II (BioL01, Inc., La Jolla, CA), se insertó el fragmento en pET25b(+) y se transformó el constructo resultante pEP1 (6893 pb) en BL21 (DE3) pLysS después de la confirmación inicial en células DH5 α . La expresión estaba bajo el control del promotor T7, seguido de la secuencia líder (pel B) que codifica 21 aminoácidos, y *phyA*. Se utilizó el hospedador transformado sólo con el vector pET25(+) como control.

Tabla 1. Vectores de expresión, constructos y sus cepas hospedadoras utilizadas en el estudio

Plásmido	Hospedador	Descripción ¹	Referencia ²
pET25b(+)	DH5 α y BL21 (DE3) pLysS de <i>E. coli</i>	Vector de expresión	Novagen
pEP1	BL21 (DE3) pLysS de <i>E. coli</i>	pET25b α (+) + gen <i>phyA</i>	Este artículo
pSES2	DH5 α de <i>E. coli</i> y TK24 de <i>S. lividans</i>	Vector de expresión	Jung et al. ² , 1993
pSPP1	DH5 α de <i>E. coli</i> y TK24 de <i>S. lividans</i>	PSSES2 + Spe2 + <i>phyA</i>	Este artículo
pYES2	DH5 α de <i>E. coli</i> e INVScI de <i>S. cerevisiae</i>	Vector de expresión	Invitrogen
pYEP1	DH5 α de <i>E. coli</i> e INVScI de <i>S. cerevisiae</i>	pYES2 + Spe2 + <i>phyA</i>	Este artículo
pYXP1	DH5 α de <i>E. coli</i> e INVScI de <i>S. cerevisiae</i>	pYES2 + Spxy + <i>phyA</i>	Este artículo
pYPP1	DH5 α de <i>E. coli</i> e INVScI de <i>S. cerevisiae</i>	pYES2 + Sphy + <i>phyA</i>	Este artículo

¹ Spe2 es el péptido señal de E2 de endoglucanasa de *T. fusca* (Wilson, D.B. "Biochemistry and Genetics of Actinomycete Cellulases", Crit. Rev. Biotechnol., 12: 45-63 (1992), que se incorpora por la presente como referencia); Spxy es el péptido señal de xilanasa de *A. pullulans* (Li y Ljungdahl, "Cloning, Sequencing and Regulation of a Xylanase Gene from the Fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2331-1", Appl. Environ. Microbiol., 60: 3160-3166 (1994); Li y Ljungdahl, "Expression of *Aureobasidium pullulans* xynA in, and Secretion of the Xylanase from, *Saccharomyces cerevisiae*", Appl. Environ. Microbiol., 62: 209-213 (1996), que se incorporan por la presente como referencia); y Sphy es el péptido señal de *phyA* de *A. niger* (Hartingsveldt *et al.*, "Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*", Gene 127: 87-94 (1993), que se incorpora por la presente como referencia).

² Jung, E.D. *et al.*, "DNA Sequences and Expression in *Streptomyces lividans* glucanase Gene and an Endoglucanase Gene from *Thermomonospora Fusca*", Appl. Environ. Microbiol., 59: 3032-3043 (1993), que se incorpora por la presente como referencia).

La construcción del plásmido para la expresión de *phyA* en *S. lividans* se inició con la síntesis de un fragmento que contenía el promotor pLT1 y el péptido señal Spe2 (Lao, G. *et al.*, "DNA Sequences of Three Beta-1,4-endoglucanase Genes from *Thermomonospora Fusca*", J. Bacteriol., 173: 3397-3407 (1991), que se incorpora por la presente como referencia) por PCR. Un cebador cadena arriba, 5'- CAG CTA TGA CCA TGA TTA CGC C-3' (SEC N° ID 3) y un cebador cadena abajo 5'-CCT AGA ACG GGA ATT CAT TGG CCG CC-3' (SEC N° ID 4) contenían sitios de restricción *PstI* y *EcoRI*, respectivamente. Se amplificó el fragmento a partir de pBW2 (Jung, E.D. *et al.*, "DNA Sequences and Expression in *Streptomyces lividans* of an Exoglucanase Gene and an Endoglucanase Gene From *Thermomonospora Fusca*", Appl. Environ. Microbiol., 59: 3032-3042 (1993), que se incorpora por la presente como referencia), y después se digirió con *PstI* y *EcoRI*, mientras que el constructo pEP1 y el plásmido pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, CA) se digirieron con *EcoRI* e *HindIII*, y *PstI* e *HindIII*, respectivamente. Se purificaron posteriormente los tres fragmentos digeridos utilizando el kit GeneClean II y se ligaron en un único constructo recombinante que contenía los sitios de restricción deseados de *PstI* y *KpnI* (de pBluescript SK+), el promotor pLT1 y el péptido líder Spe2 de E2 de endoglucanasa (551 pb, Lao, G. *et al.*, "DNA Sequences of Three Beta-1,4-endoglucanase Genes from *Thermomonospora Fusca*", J. Bacteriol., 173: 3397-3407 (1991), que se incorpora por la presente como referencia) y el gen *phyA* (1365 pb). Después de digerir el constructo con *PstI* y *KpnI*, se insertó el fragmento resultante en el vector de expresión pSES1, y se transformó el plásmido lanzadera formado (pSPP1, 9131 pb) en protoplastos del hospedador *S. lividans* según Hopwood *et al.* (Hopwood, D.A. *et al.*, "Genetic Manipulation of *Streptomyces*-A Laboratory Manual", Fundación John Innes, Norwich, Inglaterra (1985), que se incorpora por la presente como referencia). Igualmente, se preparó un control transformando *S. lividans* con el vector de expresión pSES2.

Se construyeron tres plásmidos lanzadera con tres secuencias de péptido señal diferentes para expresar *phyA* en el sistema de levadura (véase la Tabla 2). El primer plásmido se originó a partir de un fragmento de pSPP1 digerido con *HindIII*, incluyendo el promotor pLT1, la secuencia líder Spe2 y la secuencia de región de codificación de *phyA*. Se ligó el fragmento al sitio *HindIII* de pYES2 tratado con fosfatasa alcalina intestinal de ternero, y se denominó al plásmido pYEP1 (7783 pb) después de confirmar su orientación correcta. El segundo plásmido contenía Spxy, una secuencia de péptido señal del gen de xilanasa de *A. pullulans* (Li, X.L. *et al.*, "Cloning, Sequencing and Regulation of a Xylanase Gene From the Fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1", Appl. Environ. Microbiol., 60: 3160-3166 (1994); Li, X.L. *et al.*, "Expression of *Aureobasidium pullulans* XynA in, and Secretion of the Xylanase From, *Saccharomyces cerevisiae*", Appl. Environ. Microbiol., 62: 209-213 (1996), que se incorporan por la presente como referencia), y el gen *phyA*. Se ajustó Spxy con *phyA* mediante extensión de superposición (Horton, R.M., "In vitro Recombination and Mutagenesis of DNA: SOEing Together Tailor-Made Genes", PCR Protocols: Currents Methods and Applications, 251-261 (1993), que se incorpora por la presente como referencia) con dos etapas sucesivas de PCR. Una fue para amplificar la secuencia de Spxy de pCE4 (Li, X.L. *et al.*, "Expression of *Aureobasidium Pullulans* XynA in, and Secretion of the Xylanase From, *Saccharomyces cerevisiae*", Appl. Environ. Microbiol., 62: 209-213 (1996), que se incorpora por la presente como referencia) utilizando el cebador cadena arriba (5'- CCC AAG CTT GAT CAC ATC CAT TCA -3') (SEC N° ID 5) con un sitio de restricción *HindIII* (cebador 1) y un cebador cadena abajo superpuesto (5'-CGG GGA CTG CTA GCG CAC GTT CGA T- 3', cebador 2) (SEC N° ID 6). La otra PCR fue para amplificar la región de codificación de *phyA* de pEP1 utilizando el cebador cadena arriba superpuesto (5'- ATC GAA CGT GCG CTA GCA GCA GTC CCC G -3', cebador 3) (SEC N° ID 7) y el cebador cadena abajo (5'- GCT CTA GAC TAA GCA AAA CAC TCC- 3', cebador 4) (SEC N° ID 8) con un sitio de restricción *XbaI*. La segunda etapa de PCR se realizó para fusionar los dos fragmentos generados por las dos PCR anteriores utilizando los dos fragmentos purificados como moldes y los cebadores 1 y 4. El fragmento resultante contenía los sitios de restricción *HindIII* y *XbaI* y se clonó en pSES2. Este plásmido se denominó pYXP1 (7219 pb). El tercer plásmido contenía la secuencia del péptido señal (Sphy) de *phyA* y la región de codificación de *phyA*, excluyendo el intrón entre ellas (Hartingsveldt, W. van., *et al.*, "Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*", Gene 127: 87-94 (1993), que se incorpora por la presente como referencia). Se utilizaron dos cebadores, incluyendo 70 pb del cebador cadena arriba que contenían el péptido señal con un sitio de restricción *KpnI* introducido por ingeniería genética y un cebador cadena abajo que era el mismo utilizado para la construcción de pYXP1 (cebador 4) para amplificar el fragmento deseado a partir de pEP1. Se digirió el producto de PCR con *KpnI* y *XbaI* y se clonó en pSES2, dando como resultado un plásmido denominado pYPP1 (7176 pb). Se

transformaron los tres constructos anteriores en *S. cerevisiae* mediante el método de Ito *et al.*, "Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations", *J. Bacteriol.*, 153: 163-168 (1983), que se incorpora por la presente como referencia.

Tabla 2. Péptidos señal utilizados para la expresión de *phyA* en *S. cerevisiae*

Tamaño de constructo (pb)	Péptido	Gen	Organismo	Actividad fitasa ¹ (mUF/ml)
pYEP1 7783	Spe2 (93 pb)	E2 de celulasa Xilanasa A	<i>T. fusca</i>	0,80
pYXP1 7219	Spxy (102 pb)	PhyA de fitasa	<i>A. pullulans</i>	No detect.
pYPP1 7176	Sphy (57 pb)		<i>A. niger</i>	146
pSES1 ² 7224			<i>S. cerevisiae</i>	No detect.

¹ La actividad fitasa se detectó en el sobrenadante del cultivo celular de medio Sabouraud-rafinosa 15 horas después de inducir añadiendo galactosa. Véase el texto para la definición de unidades de fitasa

² Vector de expresión para *S. cerevisiae*, utilizado como control

- 5 Medio de crecimiento e inducción de la expresión génica. Se hicieron crecer los transformantes en el sistema de *E. coli* en 50 ml de medio LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina a 30°C. Después de que el valor de DO₆₀₀ del medio alcanzara 0,5 a 0,6, se indujo la expresión génica de fitasa añadiendo IPTG (b-D-tiogalactopiranosido de isopropilo) al medio a una concentración final de 1 mM. Tres horas después de la inducción, se recogieron las células mediante centrifugación a 8.000 x g durante 15 minutos, se lavaron con 1 x PBS y se lisaron mediante lisozima. Se prepararon las fracciones soluble e insoluble de las células y se suspendió una muestra que contenía 500 µg de proteína total (Lowry, O.H. *et al.*, "Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent", *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275 (1951), que se incorpora por la presente como referencia) en el mismo volumen de tampón 2 x SDS, y se analizó mediante PAGE-SDS (Laemmli, U.K., "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature (Londres)*, 227: 680-685 (1970), que se incorpora por la presente como referencia).
- 10
- 15 Se hizo crecer *S. lividans* recombinante en caldo TSB con 5 µg/ml de tiostreptón a 30°C (Jung, E.D. *et al.*, "DNA Sequences and Expression in *Streptomyces lividans* of an Exoglucanase Gene and an Endoglucanase Gene from *Thermomonospora Fusca*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3032-3043 (1993), que se incorpora por la presente como referencia). Después de 72 horas de incubación, se recogieron las células y el medio y se prepararon para PAGE-SDS (Wilson, D.B. "Biochemistry and Genetics of Actinomycete Cellulases", *Crit. Rev. Biotechnol.*, 12: 45-63 (1992), que se incorpora por la presente como referencia).
- 20

Se hicieron crecer inicialmente los transformantes de *S. cerevisiae* en medio Sabouraud-rafinosa (al 4%) (100 ml) sin uracilo durante 48 horas, se añadió después galactosa estéril al medio (al 2%) para inducir la expresión de fitasa. Se recogieron muestras de medio y células en diversos momentos, y se prepararon muestras extracelulares e intracelulares como se describe por Li y Ljungdahl, "Expression of *Aureobasidium pullulans xynA* in, and Secretion of the Xylanase from, *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 209-213 (1996), que se incorpora por la presente como referencia. Cuando fue necesario, se concentró el sobrenadante de las fracciones de cultivo celular expresado con células agitadas de Amicon (Beverly, MA) utilizando membranas YM10 (corte de PM de 10.000). Se ensayaron otros medios en consecuencia.

- 25
- 30 Ensayo de proteína enzimática y actividad. Se cuantificaron las cantidades de proteína fitasa expresada en diversas condiciones mediante densitometría relativa de bandas específicas en PAGE-SDS, utilizando el sistema IS-1000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA). Se determinó la actividad fitasa en las muestras de medios y células como se describe anteriormente (Piddington, C.S. *et al.*, "The Cloning and Sequencing of the Genes Encoding Phytase (*phy*) and pH 2.5-optimum Acid Phosphatase (*aph*) from *Aspergillus niger* var. *awamori*", *Gene*, 133: 56-62 (1993), que se incorpora por la presente como referencia) y se ensayó el fosfato inorgánico liberado mediante el método de Chen, P.S. *et al.*, "Microdetermination of P", *Anal. Chem.*, 28: 1756-1758 (1956), que se incorpora por la presente como referencia. Se definió una unidad de fitasa (UF) como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de fosfato inorgánico a partir de fitato de sodio por minuto a 37°C.
- 35

- 40 Análisis de transferencia Western (inmunotransferencia). Se recogieron la fracción soluble de la masa celular de *E. coli* transformada con fitasa y el sobrenadante del medio de transformantes de *S. lividans* y *S. cerevisiae* como para PAGE-SDS. Después de la electroforesis, se transfirieron las proteínas a membrana de nitrocelulosa Protran® (Schleicher & Schuell, Keene, NH, EE.UU.) en Tris-HCl 20 mM (pH 8,3), 20% de metanol y 0,1% de SDS, utilizando una celda Mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories). Se realizó la transferencia durante una noche a 50 V constantes, y la temperatura del tampón inicial fue de 4°C. Se sometieron después las membranas a análisis de transferencia Western. Se utilizó una IgG policlonal de conejo (amablemente proporcionada por el Dr. A.H.J. Ullah del USDA).

Dilución: 1:5.000) contra fitasa nativa purificada de *A. niger* como primer anticuerpo. Se finalizó la transferencia utilizando el kit Immuno-Blot Assay (Bio-Rad Laboratories) que contenía un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante.

Aislamiento y análisis de ARN total. Se aisló el ARN total con reactivo TRIzol™ (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) a partir de transformantes de *E. coli* y *S. cerevisiae* 3 y 15 horas después de la inducción, respectivamente. Se separaron después las muestras de ARN (10 µg por carril) mediante electroforesis en gel de formaldehído-agarosa (al 1,5% p/v) y se transfirieron a membranas Hyblot (National Labnet, Woodbridge, NJ) (Davis *et al.*, "Basic Methods in Molecular Biology", 2ª ed., Ed. Appleton and Lange, Norwalle, CT. (1994), que se incorpora por la presente como referencia). Se preparó un fragmento *EcoRI-HindIII* de 1,4 kb en el plásmido pEP1 y se marcó con cebador aleatorio con ³²P utilizando un kit de marcaje de ADN seguido de purificación en columna G-50 (Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ), y después hibridó con las membranas de ARN transferido en una estufa de hibridación (Hybaid, Middlesex, RU). Se expusieron las membranas hibridadas a examen en Fuji Imaging Plate y se analizaron mediante Bio-Imaging Analyzer (Kohshin Graphic Systems, Fuji, Japón).

Ejemplo 2. Expresión de *PhyA* en *E. coli*

Cuatro horas después de la inducción, se observó una banda específica (~55 kDa) en PAGE-SDS (al 12,5%) de la fracción celular soluble, en comparación con el control transformado sólo con vector de expresión (véanse las Figuras 1 y 2). Esta banda representaba un 3,8% de la proteína soluble total de esta fracción. Correspondientemente, el análisis Northern mostró la sobreexpresión de ARNm de *phyA* en estos transformantes de gen fitasa y no se observó señal en las células control (véase la Figura 3).

Para optimizar la expresión de proteína fitasa, se estudiaron el curso cronológico y los efectos de una serie de factores sobre la expresión. Estos factores incluían la temperatura de incubación (30 y 37°C), el pH del medio (4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 y 9,0), la anaerobiosis (añadir aceite mineral estéril sobre las células en crecimiento), el nivel de fosfato inorgánico en el medio (Dassa, E. *et al.*, "The Acid Phosphatases with Optimum pH of 2.5 of *Escherichia coli*". *J. Bio. Chem.*, 257: 6669-6676 (1982), que se incorpora por la presente como referencia) y el fitato de sodio (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 mM). Los resultados indicaron que la expresión de proteína fitasa se acumulaba linealmente con el tiempo durante las primeras seis horas después de la inducción (véase la Figura 4). Después de ello, la expresión permaneció relativamente sin cambios aunque las células bacterianas siguieran creciendo. Sólo el pH del medio y la concentración de fitato de sodio afectaron significativamente a la expresión de proteína fitasa. Se mostró una proteína máxima a pH 6,0 y fitato de sodio 0,3 mM, en que la proteína fitasa aumentó de 3,8 a 9,6% de la proteína soluble total.

No se observó actividad fitasa extracelular ni intracelular. Esto puede no ser completamente inesperado porque la fitasa nativa de *A. niger* es una glicoproteína con un tamaño de 70-80 kDa (Hartingsveldt *et al.*, "Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*", *Gene* 127: 87-94 (1993), que se incorpora por la presente como referencia). La proteína expresada en el sistema *E. coli* de este estudio tenía un tamaño de aproximadamente 55 kDa. Presuntamente, la falta de glicosilación de la proteína y cualquier otra modificación postraducciona necesaria durante la secreción imposibilitarían la actividad fitasa.

Ejemplo 3- Expresión de *PhyA* en *S. lividans*

Se han expresado genes heterólogos en *S. lividans*, y los productos resultantes se han secretado en el medio con actividad enzimática (Ghangas, G.S. *et al.*, "Cloning of the *Thermomonospora Fusca* Endoglucanase E2 Gene in *Streptomyces lividans*: Affinity Purification and Functional Domains of the Cloned Gene Product", *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2521-2526 (1988); Wilson, D.B., "Biochemistry and Genetics of Actinomycete Cellulases", *Crit. Rev. Biotechnol.* 12: 45-63 (1992); Jung, E.D. *et al.*, "DNA Sequences and Expression in *Streptomyces lividans* of an Exoglucanase Gene and an Endoglucanase Gene from *Thermomonospora fusca*", *Environ. Microbiol.*, 59: 3032-3043 (1993), que se incorporan por la presente como referencia). De forma similar, el gen *phyA* se expresó en *S. lividans* y se introdujo la proteína en el medio, como muestra una banda específica en las muestras de medio analizadas por PAGE-SDS (véanse las Figuras 5 y 6). Esto sugería que el péptido señal del gen E2 de endoglucanasa de *T. fusca* era capaz de conducir la proteína fitasa fuera de la célula. Esta proteína tenía 57 kDa y representaba un 16,2% de la proteína total en el medio. Cambiar el pH del medio a 6,0 y añadir fitato de sodio 0,3 mM al medio mejoró el rendimiento de proteína a un 20,3% de la proteína total. Debido a que la proteína fitasa se secretaba al medio a un nivel tan alto, debería ser fácil de purificar y utilizar eficazmente para una variedad de fines tales como producir anticuerpo de fitasa. De nuevo, no se encontró actividad fitasa aumentada ni en el medio ni en las células lisadas. Aunque el tamaño de proteína aumentó un poco (2-3%), en comparación con el expresado en *E. coli*, presuntamente debido a la glicosilación de la proteína fitasa en este sistema de expresión, siguió sin haber actividad fitasa.

Ejemplo 4- Expresión de *PhyA* en *S. cerevisiae*

Se utilizaron tres péptidos señal diferentes para comparar la eficacia en la conducción de la proteína expresada fuera de las células (véase la Tabla 2). La actividad fitasa aumentó sustancialmente en el medio de Sabouraud-rafínosa en el que crecen los transformantes de pYEP1 y pYPP1, pero no pYXP1. Se mostró proteína fitasa visible

por PAGE-SDS 20 horas después de la inducción (Figura 7).

Se determinó la expresión de transformantes de pYEP1 y pYPP1 en tres tipos diferentes de medio: Sabouraud-
 rafinosa (Li, X.L., *et al.*, "Expression of *Aureobasidium pullulans* XynA in, and Secretion of the Xylanase From, *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 209-213 (1996), que se incorpora por la presente como
 5 referencia), Sabouraud-glicerol y un medio YEPD para fines generales modificado. En cuanto a los transformantes
 de pYEP1, se expresó una actividad fitasa similar en el medio Sabouraud-rafinosa y Sabouraud, pero no hubo
 actividad detectada en el medio YEPD. En contraposición, la actividad fitasa en el medio cultivado con
 transformantes de pYPP1 varió en gran medida con los diferentes tipos de medio. La actividad se potenció a 375
 mU/ml cuando se utilizó medio Sabouraud-glicerol. La actividad aumentó adicionalmente a 1.675 mU/ml cuando se
 10 cambió el medio a YEPD (véase la Tabla 3). Aunque el medio YEPD era mucho más barato que el medio
 Sabouraud-rafinosa, el rendimiento de fitasa aumentó más de diez veces. Por tanto, el supuesto péptido señal del
 gen de fitasa fúngica conseguía la expresión más eficaz de la actividad fitasa extracelular. Casi toda la proteína
 producida se secretaba en el medio YEPD, porque se detectaba muy poca actividad en las células de levadura. El
 curso cronológico de la expresión de fitasa en este sistema se mostró en la Figura 8.

Tabla 3. Actividad fitasa expresada a partir de transformante con pYPP1 en diferentes medios

Medio	Horas después de inducción (mU/ml) ¹		
	0	10	15
Sabouraud-rafinosa	22	136	146
Sabouraud-glicerol	6	174	375
YEPD	18	1238	1675

¹ Se detectó la actividad fitasa en el sobrenadante de cultivo celular de los tres medios 0, 10 y 15 horas
 después de inducir añadiendo galactosa. Véase el texto para la definición de unidades de fitasa

Una variedad de microorganismos, incluyendo bacilos, levaduras y hongos filamentosos, tienen actividad fitasa,
 mientras que la cepa NRRL3135 de *A. niger* produce la mayor actividad (340 mU/ml, Shieh, T.R. *et al.*, "Survey of
 Microorganisms for the Production of Extracellular Phytase", *Appl. Environ. Microbiol.*, 16: 1348-1351 (1968), que se
 incorpora por la presente como referencia). CAS 2863 de *Schwanniomyces castellii* tiene la mayor actividad fitasa
 20 entre 21 cepas de levadura (140 mU/ml, Lambrechts, C. *et al.*, "Utilization of Phytate by Some Yeasts",
Biotechnology Letters, 14: 61-66 (1992), que se incorpora por la presente como referencia). Claramente, la cepa de
 levadura recombinante transformada con pYPP1 en el presente estudio produjo mucha mayor actividad fitasa (1.675
 mU/ml) que *A. niger* (4 veces) y CBS 2683 de *S. castellii* (11 veces). Puede obtenerse la producción de fitasa
 máxima en el sistema optimizando las condiciones de incubación y modificando los módulos de plásmido (Demolder,
 J.W. *et al.*, "Efficient Synthesis of Secreted Murine Interleukin-2 by *Saccharomyces cerevisiae*: Influence of 3'-
 25 Untranslated Regions and Codon Usage", *Gene*, 111: 207-213 (1992), que se incorpora por la presente como
 referencia).

El alto nivel de expresión de actividad fitasa en *S. cerevisiae* era debido lo más probablemente a la suficiente
 glicosilación de la proteína fitasa y otras modificaciones postraduccionales por la levadura. Después de concentrar el
 30 medio sobrenadante y someter a análisis de PAGE-SDS, había una banda de aproximadamente 110 kDa (véanse
 las Figuras 7 y 9), que era mayor que el tamaño de la proteína nativa de *A. niger* (Hartingsveldt, W. van. *et al.*,
 "Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*", *Gene*
 127: 87-94 (1993), que se incorpora por la presente como referencia). El análisis Northern confirmó la
 sobreexpresión específica de ARNm de *phyA* (véase la Figura 10). Estos resultados indicaron que el sistema de
 35 levadura era eficaz para sobreexpresar activamente la enzima fitasa extracelular. El sistema de levadura tiene
 diversas ventajas frente a las bacterias u otros sistemas tales como *A. niger* (Hartingsveldt, W. van. *et al.*, "Cloning,
 Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*", *Gene* 127: 87-94
 (1993), que se incorpora por la presente como referencia). Lleva a cabo modificaciones postraduccionales,
 incluyendo plegamiento apropiado, glicosilación, formación de puentes disulfuro y proteólisis, durante la
 40 translocación de las proteínas a través del retículo endoplasmático y la membrana celular. La secreción de proteínas
 está facilitada por péptidos señal cortos hidrófobos en las regiones N-terminales de los precursores de proteína (Li,
 X.L. *et al.*, "Expression of *Aureobasidium pullulans* XynA in, and Secretion of the Xylanase From, *Saccharomyces*
cerevisiae", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 209-213 (1996), que se incorpora por la presente como referencia). Las
 proteínas secretadas por las células de levadura están protegidas de la agregación y la degradación por proteasa.
 45 Lo más importante, las proteínas enzimáticas producidas por *S. cerevisiae* se purifican fácilmente porque secreta
 sólo unas pocas proteínas. Considerando la bien conocida seguridad de los productos de levadura tanto para seres
 humanos como para animales, el sistema es de gran potencial para la industria de alimentos humanos y piensos
 animales.

Ejemplo 5- Propiedades de la fitasa PhyA sobreexpresada en *Saccharomyces cerevisiae*

Se concentró la fitasa sobreexpresada a partir de transformantes de plásmido pYPP1 y se utilizó para estudiar sus
 50 propiedades (véase la Tabla 4). La enzima mostró dos intervalos de pH óptimos: 2 a 2,5 y 5,0 a 5,5. Sin embargo, la

actividad enzimática a pH 2 a 2,5 era sólo un 60% de la actividad a pH 5 a 5,5. No se detectó actividad a pH 1 ni 8. El pH óptimo fue virtualmente el mismo que para la fitasa de *A. niger* (Simons *et al.*, "Improvement of Phosphorous Availability By Microbial Phytase in Broilers and Pigs", *Br. J. Nutr.*, 64: 525 (1990), que se incorpora por la presente como referencia), por tanto, se esperaba la función activa en la hidrólisis de P de fitato en los tractos gastrointestinales. La temperatura óptima de la enzima era de 60°C, mientras que la corriente en el mercado producida por Gist-Brocades es de 55°C (BASF, 1996). Permanecía más de un 80% de la actividad a 50 a 55°C, pero se detectó poca actividad a 75 u 80°C. Al calentar la enzima durante 15 min a 37°C y a 80°C, la actividad restante de la fitasa de levadura expresada de la presente invención fue de 100 y 63%, respectivamente, y para la fitasa de Gist-Brocades fue de 100 y 52%, respectivamente. Las diferencias entre las dos fuentes enzimáticas a cualquier temperatura dada fueron significativas (véase la Tabla 5). Por tanto, la fitasa de levadura parece ser más termoestable que el producto de fitasa comercial actual.

Tabla 4. Características de la fitasa sobreexpresada en levadura¹

pH óptimo ²										
pH		1,0	2,0	2,5	3,0	4,0	5,0	5,5	6,0	8,0
Actividad (%)	relativa	0,5 ^e ±0,2	59,7 ^c ±3	64,8 ^c ±6	48,1 ^d ±4	81,0 ^b ±5	100,0 ^a ±1	95,0 ^a ±6	66,3 ^c ±1	0,8 ^e ±0,4
Temperatura óptima ³										
°C		25	37	45	50	55	60	75	80	
Actividad (%)	relativa	24,2 ^e ±0,8	44,6 ^d ±3	63,9 ^c ±8	83,6 ^b ±2	89,8 ^b ±4	100,0 ^a ±4	0,6 ^f ±0,1	0,9 ^f ±0,2	

¹ Los datos son medias de actividad relativa ± desviación estándar (n= 4). Las medias en una fila con diferentes letras de superíndice difieren (p< 0,05). Se utilizó el modelo lineal general del sistema de análisis estadístico (1988) para analizar los efectos del tratamiento principal, mientras que se utilizaron los diseños completos aleatorios y test de t de Bonferroni para la comparación de medias de tratamientos múltiples. El nivel de significación se fijó a p <0,05.

² Se ensayó la actividad a 37°C (véase el contexto para la definición de unidad de fitasa). Se utilizaron diferentes tampones: tampón glicina-HCl 0,2 mM para pH 1,0 a 3,5; tampón citrato de sodio 0,2 mM para pH 4,0 a 6,5; y tampón Tris-HCl 0,2 mM para pH superior a 7.

³ Se determinó la temperatura óptima a pH 5,5 (tampón citrato de sodio 0,2 mM)

Tabla 5. Comparación de la termoestabilidad de fitasa sobreexpresada en levadura y fitasa de Gist-Brocades producida por *A. niger*^{1,2}

Actividad relativa (%)	37°C	80°C
Fitasa de levadura	100 ^a ±1	63 ^b ±1
Fitasa de <i>A. niger</i>	100 ^x ±3	52 ^v ±2
p ³ <		0,03

¹ Los datos son medias de actividad relativa ± desviación estándar (n= 3). Las medias en una fila con diferentes letras de superíndice difieren (p< 0,05). Se utilizó el modelo lineal general del sistema de análisis estadístico (1988) para analizar los efectos del tratamiento principal, mientras que se utilizaron los diseños completos aleatorios y test de t de Bonferroni para la comparación de medias de tratamientos múltiples. El nivel de significación se fijó a p <0,05.

² Se calentó la enzima durante 15 minutos a diferentes temperaturas antes de hacer reaccionar a 37°C y pH 5,5

³ Significación (valores de P) del ensayo t entre la actividad de las dos fitasas a cada condición de temperatura

Aunque no está claro cómo dicha mejora en la termoestabilidad está relacionada con diferentes modificaciones postraduccionales (plegado, escisión, glicosilación, etc.). (Li, X.L. *et al.*, "Expression of *Aureobasidium pullulans* XynA in, and Secretion of the Xylanase From, *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 209-213 (1996), que se incorpora por la presente como referencia), es ciertamente ventajoso tener una enzima fitasa más termoestable que puede ser esperanzadoramente resistente al calor durante la peletización del pienso, que es un problema con la fitasa de Gist-Brocades actual.

Ejemplo 6- Hidrólisis *in vitro* de P de fitato de maíz, soja y trigo molido por fitasa expresada por levadura

La fitasa expresada por levadura liberaba P de fitato a partir de harina de maíz y soja tan eficazmente como la fitasa de Gist-Brocades basándose en la actividad por unidad (véase la Tabla 6). Como se esperaba, la hidrólisis de P de fitato era una función del tiempo y la dosificación de actividad. La fitasa expresada por levadura era también eficaz

- para liberar P de fitato a partir de trigo molido, indicando su gran potencial en la fermentación del pan. Debido a que el trigo molido utilizado en este estudio contenía mucha mayor actividad fitasa intrínseca que la harina de trigo utilizada habitualmente, se esperaba un efecto mucho mayor de la fitasa expresada en levadura sobre la mejora de la hidrólisis de P de fitato de harina y en la liberación de oligoelementos, cuando se utilice en una panadería (Hall, M.N. *et al.*, "The Early Days of Yeast Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993), que se incorpora por la presente como referencia).

Tabla 6. Fósforo libre liberado a partir de harina de maíz, soja (SMB) y trigo molido por fitasa sobreexpresada en levadura y fitasa fúngica de *A. niger* *in vitro*¹

Fitasa de levadura	0	100	250	500	1000	250 (fitasa fúngica)	(fitasa fúngica)
Maíz: 1 hora	0,23 ^d ± 0,03	0,64 ^c ± 0,08	1,14 ^b ± 0,18	1,46 ^a ± 0,04	1,54 ^a ± 0,04	1,16 ^b ± 0,15	
	0,36 ^c ± 0,02	1,26 ^b ± 0,04	1,60 ^a ± 0,03	1,66 ^a ± 0,06	1,72 ^a ± 0,04		
4 horas	0,68 ^d ± 0,01	1,18 ^{cd} ± 0,02	1,62 ^c ± 0,18	2,48 ^b ± 0,32	3,13 ^a ± 0,19	1,68 ^a ± 0,04	
	0,73 ^d	1,67 ^c	2,69 ^b	3,41 ^a	3,71 ^a		
SBM: 1 hora						1,68 ^c ± 0,2	
4 horas						2,78 ^b	
Trigo molido:							
1 hora	3,56 ± 0,39		4,11 ± 0,64	4,67 ² ± 0,05			
	5,63 ± 0,5		6,02 ± 0,48	6,38 ² ± 0,07			
4 horas							

¹ Cada muestra de 5 g se agitó en 20 ml de tampón citrato de sodio 0,2 mM a 37°C durante 1 ó 4 horas. Se obtuvo el sobrenadante centrifugando durante 15 minutos a 8.000 g. Después de pasar a través de un papel de filtro Whatman 541, se sometió la muestra a ensayo de P libre mediante el método de Chen, P.S. *et al.*, "Microdetermination of P", *Anal. Chem.*, 28: 1756-1758 (1956), que se incorpora por la presente como referencia. Los datos en la tabla son medias de actividad relativa ± desviación estándar (n= 4). Se utilizó el Modelo Lineal General del Sistema de Análisis Estadístico (1988) para analizar los efectos del tratamiento principal, mientras que se utilizaron los diseños completos aleatorios y test de t de Bonferroni para la comparación de medias de tratamientos múltiples. El nivel de significación se fijó a p < 0,05. Existía una diferencia significativa entre 1 y 4 horas para cada pienso a cada dosis de enzima analizado mediante test t. Las medias en una fila con diferentes letras de superíndice difieren (p < 0,05)

² n=2

- Se comparó la sobreexpresión de fitasa de *Aspergillus niger* (*phyA*) en *Escherichia coli*, *Streptomyces lividans* y *Saccharomyces cerevisiae* para desarrollar un sistema eficaz y sencillo para producir económicamente fitasa. Se expresó en *E. coli* una proteína intracelular soluble de 55 kDa, que representaba un 9,6% de la proteína soluble total, utilizando el sistema pET25b(+). Se expresó en *S. lividans* una proteína extracelular de 57 kDa, que representaba un 20,3% de la proteína total en el medio, utilizando un plásmido lanzadera que contenía el promotor pLT1 y el péptido líder Spell de E2 de endoglucanasa. No se mostró aumento de la actividad fitasa en ningún sistema de expresión, presuntamente debido a la falta de glicosilación y otras modificaciones postraduccionales necesarias. En contraposición, se produjo una alta actividad fitasa extracelular en *S. cerevisiae* transformada con el gen *phyA*. Se compararon tres péptidos señal diferentes y tres tipos diferentes de medio para identificar el mejor vector de expresión y condición. El uso del péptido señal Sphy del gen *phyA* y medio YEPD produjo la actividad fitasa extracelular mayor. La fitasa sobreexpresada en levadura era de aproximadamente 110 kDa, tenía dos óptimos de pH: 2,0 a 2,5 y 5,5 a 6,0, y la temperatura óptima era de 60°C.

Ejemplo 7- Métodos y materiales para la expresión de *phyA* en *Pichia*

- Hospedador y vector. Se adquirió un kit de expresión en *Pichia* EasySelect™ en Invitrogen (San Diego, CA). El kit proporciona hospedadores y vectores para expresar el gen de forma intracelular o extracelular en cepas Mut⁺ o Mut^s (de utilización de metanol normal o lenta). Se utilizó X33 como cepa Mut⁺ y KM71 como cepa Mut^s. Se utilizaron dos vectores, pPICZ B (3,3 kb) y pPICZαA (3,6 kb), ambos utilizan AOX1 como promotor.

- Construcción de los vectores de expresión. Para comparar el efecto de diferentes péptidos señal sobre la expresión de *PhyA* en el sistema de *Pichia*, se prepararon dos constructos. En primer lugar, se ligó un fragmento EcoRI-KpnI de 1,4 kb, que contiene la secuencia *PhyA* que codifica la proteína fitasa madura, en pPICZαA. En este plásmido (pPICZα-*phyA*), *PhyA* estaba conducido por un factor alfa, un péptido señal utilizado muy generalmente de *Saccharomyces cerevisiae*. En segundo lugar, se ligó un fragmento KpnI-XbaI de 1,4 kb de pYPP1 en el vector (la región de codificación de *phyA* estaba conducida por su propio péptido señal, que era muy eficaz para secretar la fitasa expresada en *Saccharomyces cerevisiae*).

Transformación y expresión. Se linealizaron los constructos confirmados mediante PmeI y se transformaron en

GS115 y KM71 mediante el EasyComp™ proporcionado por el kit. Se utilizó Neocin™ para seleccionar las colonias positivas. Después de inocular una sola colonia en 10 ml de medio MGY y hacer crecer hasta DO₆₀₀ de 2-6 a 30°C, se recogieron las células mediante centrifugación y se resuspendieron en 10 ml de medio MMY (que contenía 0,5% de metanol). Se recogieron las muestras cada 12 ó 24 h después de la inducción. Se separaron las células del sobrenadante y se lisaron con perlas de vidrio en tampón de ruptura. Se ensayó la actividad fitasa en el sobrenadante y las células como se describe anteriormente. Se realizaron PAGE-SDS y transferencia Western para determinar el tamaño y la cantidad relativa de la proteína expresada.

Ejemplo 8- Actividad fitasa de PhyA en *Pichia*

Se transformó el constructo de expresión utilizando factor alfa como péptido señal para *phyA* en dos cepas de *Pichia*. KM71 es una cepa de utilización lenta de metanol, mientras que X33 es una *Pichia* de tipo silvestre que utiliza eficazmente el metanol. Se realizaron el examen e incubación en matraces agitados de 10 ml a 29-30°C. Para los transformantes de KM71, 19 de 20 colonias recogidas tenían actividad fitasa extracelular mayor de 6 unidades/ml de sobrenadante de cultivo después de inducción durante 24 horas. La colonia nº 13 mostró la actividad mayor, de 26 unidades/ml después de incubación durante 108 horas. Para los transformantes de X33, todas las colonias (20/20) tenían más de 10 unidades/ml después de inducción durante 24 horas. Una de las colonias (nº 101) produjo una actividad fitasa de 65 unidades/ml de sobrenadante. Se resumió en la Figura 11 un estudio del curso cronológico de la expresión de fitasa en KM71 y X33. A pesar de la diferencia de estas dos cepas en la utilización de metanol y, por lo tanto, la capacidad de expresar fitasa, se encontró que el factor alfa se procesaba correctamente por las células de levadura. Además, casi toda la proteína expresada se secretó en el medio, ya que no se encontró más de un 5% de la actividad total expresada intracelularmente.

Se estudiaron los efectos del fósforo inorgánico y del pH de los medios sobre la expresión de fitasa en los medios (BMGY y BMMY) utilizando un *phyA* recombinante de X33 (nº 101). El medio que contenía fosfato 50 mM produjo la actividad fitasa mayor, 66 unidades/ml a 168 horas después de inducción. Al incluir fosfato 50 mM en los medios, se estudió también el efecto de diferentes pH de este tampón (3, 4, 5, 6, 7 y 8) sobre la expresión. Cuando el pH era 6, este transformante X33 produjo 75 unidades de fitasa/ml de sobrenadante. Basándose en la concentración de proteína y el análisis PAGE-SDS, se estimó que el rendimiento de expresión de proteína fitasa estaba entre 3 y 4 mg/ml.

Ejemplo 9- Propiedades de la fitasa PhyA expresada en *Pichia*

Tamaño molecular y desglicosilación de la fitasa expresada. Después de someter el sobrenadante del medio inoculado con el transformante de *phyA* a PAGE-SDS, se observó una fuerte banda aproximadamente a 95 kDa (Figura 12). Ésta fue casi la única proteína observada en el sobrenadante. La fitasa expresada reaccionaba eficazmente con el anticuerpo policlonal de conejo creado contra fitasa nativa purificada a partir de *A. niger*. Esto indicaba que la inmunorreactividad de la fitasa expresada era esencialmente la misma que la de la fitasa nativa de *A. niger*. El tamaño se redujo a 50 kDa mediante desglicosilación utilizando Endo H. El anticuerpo de *phyA* reaccionó también con la fitasa desglicosilada. Además, la desglicosilación, realizada en condiciones nativas, redujo la actividad fitasa aproximadamente un 15%, indicando que la glicosilación era importante para la actividad de las fitasas. Además, la glicosilación afectó a la termoestabilidad de las enzimas (Figura 13).

Análisis Northern. Como se mostró en la Figura 14, una sonda de ADN de *phyA* de 1,3 kb hibridó con el ARNm de los transformantes inducidos tanto de KM71 (nº 13) como de X33 (nº 101). Se observó también respuesta de los transformantes antes de la inducción. Probablemente, la expresión de *phyA* en este sistema no estaba controlada estrictamente al nivel de la transcripción.

pH y temperatura óptimos e hidrólisis de fósforo de fitato. De forma similar a la fitasa de *A. niger*, la fitasa expresada tenía dos pH óptimos, 2,5 y 5,5 (Figura 15). La temperatura óptima de la fitasa expresada era de 60°C (Figura 16). Cuando se incubó la fitasa expresada con muestras de soja a 100, 200, 400, 800 mU/g de muestra a 37°C, el fósforo se liberaba de modo lineal con la dosis de fitasa (Figura 17).

Ejemplo 10- Métodos y materiales para la sobreexpresión del gen *appA* de *E. coli* en *Saccharomyces cerevisiae*

Gen y proteína. Este gen, definido originalmente como gen de fosfoanhídrido fosfohidrolasa periplásmica de *E. coli* (*appA*), contiene 1.298 nucleótidos (número de acceso a GenBank: M58708). Se encontró primero que el gen codificaba una proteína fosfatasa ácida de pH óptimo de 2,5 (EcAP) en *E. coli*. La fosfatasa ácida es un monómero con una masa molecular de 44.644 Da. La EcAP madura contiene 410 aminoácidos (Dassa, J. *et al.*, "The Complete Nucleotide Sequence of the Escherichia Coli Gene *appA* Reveals Significant Homology Between pH 2.5 Acid Phosphatase and Glucose-1 Phosphatase", *J. Bacteriology*, 172: 5497-5500 (1990), que se incorpora por la presente como referencia). Ostanin, K. *et al.*, "Overexpression, Site-Directed Mutagenesis, and Mechanism of Escherichia Coli Acid Phosphatase", *J. Biol. Chem.*, 267: 22830-22836 (1992), que se incorpora por la presente como referencia), sobreexpresaron *appA* en BL21 de *E. coli* utilizando un vector pT7, y aumentaron su actividad fosfatasa ácida en aproximadamente 400 veces (440 mU/mg proteína).

Se adquirieron el gen y una cepa de *E. coli* CU 1869 (Nº 47092) hospedadora en la ATCC. El gen, un inserto de 1,3 kb, se transformó en la cepa BL21 de *E. coli* (nº 87441) utilizando un vector de expresión pAPPA1 (Ostanin, K. *et al.*,

“Overexpression, Site-Directed Mutagenesis, and Mechanism of Escherichia Coli Acid Phosphatase”, *J. Biol. Chem.*, 267: 22830-22836 (1992), que se incorpora por la presente como referencia).

Hospedador y vector. El vector para sobreexpresar el gen *appA* en *Saccharomyces cerevisiae* fue pYES2 y el hospedador fue INVScI (Invitrogen, San Diego, CA).

- 5 Construcción del vector de expresión. Inicialmente, se aisló un fragmento XbaI de 1,3 kb a partir de pAPPA1. El fragmento contenía el gen *appA* con su propio péptido señal. Después de ligarse al sitio XbaI de pYES2, se transformó el constructo (pYES2-*appA*) en *Saccharomyces cerevisiae*. Pero no aumentó la actividad fitasa en las partes extra ni intracelulares, en comparación con los controles, y pAPPA y pYPP1 (PhyA y sus péptido señal en pYES2) se cotransformaron en la cepa de levadura. De nuevo, no se detectó aumento en la actividad fitasa debido a pAPPA1 en los medios o las células de levadura.

- 15 Se sintetizaron dos cebadores para construir el péptido señal del gen PhyA con la región de codificación del gen *appA*. Uno era de 80 pb de longitud y contenía el péptido señal PhyA y un sitio KpnI en el extremo 5': GGG GTA CCA TGG GCG TCT CTG CTG TTC TAC TTC CTT TGT ATC TCC TGT CTG GAG TCA CCT CCG GAC AGA GTG AGC CGG AG (SEC N° ID 9). El otro cebador era de 24 pb de longitud, con un sitio EcoRI en su extremo 3': GGG AAT TCA TTA CAA ACT GCA GGC (SEC N° ID 10). Se realizó la PCR durante 25 ciclos, con 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de reasociación a 58°C y 1 min de extensión de cadena a 72°C. Se amplificó el fragmento de 1,3 kb, se digirió y se ligó en pYES2. Después de confirmar el inserto mediante cartografía de restricción, se transformó el constructo (pYES2-SphyA-*appA*) en INVScI mediante el método de acetato de litio.

- 20 Expresión. Se inocularon los transformantes seleccionados en medio YEPD. Se indujo la expresión añadiendo galactosa al cultivo después de que la DO₆₀₀ alcanzara 2, como se describe anteriormente. Se recogieron las células 15 ó 20 h después de la inducción.

- 25 Ensayo de actividad. Se ensayó la actividad fosfatasa ácida a 37°C en tampón HCl-glicina 25 mM (pH 2,5) utilizando fosfato de p-nitrofenilo como sustrato (solución madre 250 mM). Se añadió 1,7 ml de tampón de reacción a muestras de 0,1 ml. Después de incubar durante 5 min en baño de agua a 37°C, se añadieron 0,2 ml del sustrato precalentado y se mezclaron. Se transfirió la solución de reacción a una cubeta precalentada y se incubó durante 2 min en un compartimento espectrofotométrico a 37°C. Se leyó continuamente el p-nitrofenol liberado durante 5 min a 405 nm para el cálculo de la actividad enzimática.

- 30 Estudio *in vitro*. Se suspendió harina de soja (5,0 g) en 20 ml de tampón citrato 20 mM, pH 5,5, se mezcló con 200 mU de fitasa y se incubó a 37°C durante 4 h con agitación continua. Después de enfriar en hielo durante 10 min, se transfirió la suspensión a un tubo de centrífuga y se centrifugó durante 15 min a 15.000 x g. Se utilizó el sobrenadante para determinar el fósforo libre.

Ejemplo 11- Cuantificación de la actividad fitasa a partir de la sobreexpresión del gen *appA* de *E. coli* en *Saccharomyces cerevisiae*

- 35 La actividad fosfatasa ácida intracelular en la *E. coli* que sobreexpresaba *appA* (pAPPA1) fue de 440 mU/mg de proteína. Se encontró una actividad fitasa intracelular sin precedentes mayor de 4.900 mU/mg de proteína en la cepa transformada. Sin embargo, había sólo una actividad fitasa mínima en el control (BL21). Por tanto, este gen de fosfatasa ácida codifica también una fitasa. La secuencia del gen *appA* se alineó con la de PhyA y se encontró que estos dos genes compartían un 23% de identidad.

- 40 La transformación de INVScI con el constructo de pYES2-Sphy-*appA* (conducido por el péptido señal de PhyA) produjo un actividad fitasa extracelular en el sobrenadante que fue 2.000 veces mayor que las del tipo silvestre o del transformante que contiene gen *appA* más su propio péptido señal (véase la Tabla 7).

Tabla 7. Actividad fitasa extracelular en transformantes del gen *appA* con diferentes péptidos señal

Constructo	Señal	Actividad (U/ml)	Actividad (mU/mg proteína)
pYES- <i>appA</i>	<i>appA</i>	Indetect.	Indetect.
pYES2-SphyA- <i>appA</i>	PhyA	1.158	445

- 45 Se presentan en la Tabla 8 los efectos del medio (YEPD), fósforo inorgánico, fitato, pH y temperatura sobre la expresión de la actividad fitasa por pYES2-SphyA-*AppA*. La mayor actividad fue 2.286 mU/ml (633 mU/mg de proteína) en las condiciones óptimas.

Tabla 8. Efecto de las diferentes condiciones en el medio YEPD sobre la expresión de actividad fitasa de pYES2-SphyA-*appA* en levadura

Condiciones del medio	Actividad (mU/ml)
Fósforo, mg/100 ml	
0	1402
1	714
5	722
10	456
Fitato de sodio, g/100 ml	
0	870
0,1	1019
1,0	1748
pH	
5,0	892
7,0	996
8,0	2286
Temperatura °C	
25	312
30	1036
37	996

La termoestabilidad de la actividad fitasa extracelular sobreexpresada producida por el transformante de levadura fue mayor que la de la fitasa intracelular producida por *E. coli* transformada con pAPPA1 (véase la Tabla 9). El calentamiento de la fitasa extracelular durante 15 min a 80°C dio como resultado un 30% de pérdida de su actividad fitasa, mientras que se perdió casi toda la actividad fitasa de *E. coli* en las mismas condiciones.

5 Tabla 9. Efecto del calentamiento de diferentes fuentes de fitasa a 80°C durante 15 min sobre sus actividades

Fitasa	Actividad relativa después de calentamiento, %
<i>appA</i> en <i>E. coli</i>	0,1
<i>appA</i> en <i>S. cerevisiae</i>	69
PhyA en <i>S. cerevisiae</i>	66
fitasa de BASF	50

Se presentan en la Tabla 10 las comparaciones del efecto sobre la liberación de fósforo a partir de harina de soja por las fitasas (200 mU) de *E. coli*, AppA sobreexpresado en levadura y BASF. Los resultados indican que las tres fuentes de fitasas liberaron fósforo de fitasa eficazmente a partir de harina de soja.

Tabla 10. Fósforo libre liberado a partir de harina de soja mediante diferentes fuentes de fitasas	
Fitasa	Fósforo (mg/g)
<i>appA</i> en <i>E. coli</i>	1,11
<i>appA</i> en <i>S. cerevisiae</i>	0,69
BASF	0,87

- 10 El gen *appA* de *E. coli* (fosfatasa ácida), cuando se expresa en *Saccharomyces cerevisiae*, produce una actividad fitasa extracelular en los medios que era más de 2.000 veces mayor que el control. La fitasa sobreexpresada libera eficazmente el fósforo de fitato a partir de la harina de soja, y parece ser más termoestable que la fitasa comercial actualmente disponible o la fitasa intracelular producida en *E. coli* por el mismo gen (*appA*).

- 15 Ejemplo 12- Métodos y materiales para sobreexpresar el gen *appA* de *E. coli* que codifica una fosfatasa ácida/fitasa en *Pichia pastoris*

Gen y proteína. Se obtuvieron el gen *appA* y la cepa CU 1867 de *E. coli* (nº 47092) hospedadora de la ATCC. Se transformó el gen, un inserto de 1,3 kb, en la cepa BL21 de *E. coli* (nº 87441) utilizando un vector de expresión pAPPAl (Ostainin, K. *et al.*, "Overexpression, Site-Directed Mutagenesis, and Mechanism of Escherichia Coli Acid Phosphatase", *J. Biol. Chem.*, 267: 22830-22836 (1992), que se incorpora por la presente como referencia).

- 20 Hospedador y vector. Se obtuvo un kit de expresión de *Pichia EasySelect*™ en Invitrogen (San Diego, CA). El kit proporciona hospedadores y vectores para expresar el gen intracelular o extracelularmente en una cepa de tipo silvestre (X-33). Se utilizaron dos vectores, pPICZ B (3,3 kb) y pPICZαA (3,6 kb), ambos utilizan AOX1 como promotor.

Construcción del vector de expresión. Se utilizaron dos cebadores para amplificar el gen *appA* de pAPPA1 y se produjeron dos sitios de restricción EcoRI y KpnI en los extremos 5' y 3', respectivamente.

Cebador cadena arriba: GGA ATT CCA GAG TGA GCC GGA (SEC N° ID 11)

Cebador cadena abajo: GGG GTA CCT TAC AAA CTG CAC G (SEC N° ID 12)

5 Molde: pAPPA1. ADN aislado de ATCC 87441.

Se realizó la PCR durante 30 ciclos, con 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min de reasociación a 55°C, y 1 min de extensión de cadena a 72°C. Se amplificó un fragmento de 1.245 pares de bases, se digirió con EcoRI y KpnI y se ligó (a 16°C durante una noche) en pPICZ B (3,3 kb) y pPICZαA (3,6 kb). Se confirmó el ligamiento mediante cartografía de restricción después de transformar los constructos en DH5α.

10 Transformación del constructo en *Pichia* (X33). Para cada transformación, se prepararon y linealizaron 100 µg de ADN de plásmido mediante digestión con PmeI. Después de la linealización, se purificó el ADN y se resuspendió en 10 µl de agua estéril desionizada. Se utilizó realmente la mitad del ADN para cada transformación. Se utilizaron tanto electroporación como el kit químico EasyComp (Invitrogen) para transformar el ADN en X33. En el caso de electroporación, se utilizaron un Electro Cell Manipulator (ECM 600, Gentromics, BTX Instrument Division, San Diego, CA 92121) y cubetas de 2 mm. La resistencia fue de 186 ohmios, el voltaje de carga de 1,5 kilovoltios y la duración real de carga fue de aproximadamente 7 milisegundos. Se incubaron las células electroporadas en placas de agar YPD que contenían 100 mg de zeocina/ml a 30°C durante 2-4 días para el crecimiento de colonias. En el caso de transformación química, las células se hicieron crecer en placas de agar YPDS que contenían 100 mg de zeocina/ml. En comparación con la electroporación, el método químico tenía menor eficacia de transformación.

20 Expresión. Se inocularon colonias individuales en 10 ml de medio MGY (tubo de 30 ml) y se hicieron crecer (16-18 h) hasta DO₆₀₀ de 5-6 a 28-30°C en un incubador agitado (200 rpm). Se recogieron las células mediante centrifugación (2.000 rpm) y se resuspendieron en 10 ml de medio BMMY (que contenía 0,5% de metanol) para inducir la expresión. Se recogieron las muestras (200 µl) cada 12 ó 24 horas después de la inducción. Se añadió metanol (al 100%) a 100 µl cada 24 horas para mantener una concentración de 0,5-1% en los medios.

25 Ensayos. Se separaron las células de los medios (sobrenadante) y se lisaron con perlas de vidrio en tampón de ruptura. Se ensayaron la actividad fitasa extracelular en el sobrenadante y la actividad fitasa intracelular en las células lisadas como se describe anteriormente (tampón citrato 0,2 M, pH 5,5 a 37°C, utilizando fitato de sodio 10 mM). Se ensayó la actividad fosfatasa ácida a 37°C en tampón HCl-glicina 25 mM (pH 2,5) utilizando fosfato de p-nitrofenilo como sustrato (solución madre 250 mM). Se añadieron 1,7 ml de tampón de reacción a muestras de 0,1 ml. Se leyó continuamente el p-nitrofenol liberado durante 5 min a 405 nm para el cálculo de la actividad enzimática. Se realizó un PAGE-SDS (al 12%) para determinar el tamaño y la cantidad relativa de la proteína expresada. Se determinaron el pH y la temperatura óptimos de la fitasa expresada como se describe en los resultados.

35 Estudio *in vitro*. Se suspendió harina de soja (5,0 g) en 20 ml de tampón citrato 20 mM, pH 5,5, se mezcló con niveles diferentes de fitasa y se incubó a 37°C durante 4 h con agitación continua. Después de enfriar en hielo durante 10 min, se transfirió la suspensión a un tubo de centrífuga y se centrifugó durante 15 min a 15.000 x g. Se utilizó el sobrenadante para determinar el fósforo libre.

Ejemplo 13- Examen de actividad fitasa de colonia para *Pichia pastoris* que sobreexpresa el gen *appA* de *E. coli*

40 X33 de *Pichia* de tipo silvestre produce una actividad fitasa intracelular (<0,03 U/mg de proteína) o extracelular (<0,05 U/ml) mínima. Las células X33 transformadas con el gen *appA* insertado en pPICZB (sin el factor α y presuntamente produce fitasa intracelular) no mostraron ningún aumento de la actividad fitasa (extracelular 0,2 U/ml e intracelular 0,05 U/mg de proteína).

45 Transformar células X33 de *Pichia* con el constructo de pPICZαA-*appA* (conducido por el péptido señal del factor α) produjo actividad fitasa extracelular en los medios. Inicialmente, se examinaron 72 colonias. Sólo dos colonias tenían actividad <1 U/ml 40 horas después de la inducción. La mayoría de las colonias tenían actividad en el intervalo de 10 a 20 U/ml 40 horas después de la inducción. Todas las 70 colonias tenían actividad fitasa >80 U/ml 118 horas después de la inducción. La actividad fitasa más alta detectada hasta ahora fue de 215 U/ml 192 horas después de la inducción (véase la Tabla 11).

Tabla 11. Intervalo de actividad fitasa extracelular en colonias X33 transformadas con pPICZαA-*appA* 40 y 118 horas después de la inducción

Número de colonias	40 horas después de la inducción	118 horas después de la inducción
2	<1 U/ml	
6	1 a 10 U/ml	
36	11 a 20 U/ml	
28	>20 U/ml	
70		>80 U/ml

Se compararon las actividades fitasa y fosfatasa ácida en el transformante que expresa 215 U de actividad fitasa/ml con las del tipo silvestre de X33 (192 horas después de la inducción) (véase la Tabla 12). Casi toda la proteína fitasa expresada se secretó de las células, indicando que el factor α era un péptido señal muy eficaz para la secreción de fitasa.

- 5 Tabla 12. Actividades fitasa y fosfatasa ácida en el transformante pPIZaA-appA y el tipo silvestre de X33 192 horas después de la inducción

	X33 de tipo silvestre		Transformante pP1ZaA-appA	
	Extracelular U/ml	Intracelular U/mg de proteína	Extracelular U/ml	Intracelular U/mg de proteína
Fitasa	0,05	0,03	215	0,5
Fosfatasa ácida	0,01	0,002	5,88	0,9

- 10 Los transformantes de *E. coli* con el mismo gen *appA* de fosfatasa ácida tenían una actividad fitasa intracelular de 5 U/mg de proteína (Ostanin, K. *et al.*, "Overexpression, Site-Directed Mutagenesis, and Mechanism of Escherichia Coli Acid Phosphatase", *J. Biol. Chem.*, 267: 22830-22836 (1992), que se incorpora por la presente como referencia). El gen *PhyA* transformante en *A. niger* produjo una actividad extracelular de 7,6 U/ml (Hartingsveldt *et al.*, "Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*", *Gene* 127: 87-94 (1993), que se incorpora por la presente como referencia). En comparación con estos resultados, el sistema de expresión de fitasa en *Pichia* es un sistema de expresión muy eficaz.

Ejemplo 14- Curso cronológico de la expresión de fitasa

- 15 Había un aumento lineal de la actividad fitasa extracelular en los medios en casi todas las colonias seleccionadas hasta 192 horas después de la inducción. La Figura 18 resume los cambios de actividad de cinco colonias seleccionadas de 24 a 163 horas después de la inducción.

Ejemplo 15- Efectos del pH del medio sobre la expresión de fitasa (colonia nº 23, actividad 136 U/ml a las 186 h)

- 20 Utilizando medios tamponados con fosfato 0,1 M, se estudiaron los efectos de diferentes pH sobre la producción de fitasa extracelular en los transformantes frente a un medio control sin tampón (pH 7,0). El medio tamponado a pH 6 produjo la actividad fitasa más alta (véase la Figura 19).

Ejemplo 16- Tamaño de la fitasa extracelular expresada

- 25 Utilizando análisis PAGE-SDS (gel al 12%), se observó una banda transparente en el sobrenadante de medio del cultivo inoculado con tres colonias diferentes (véase la Figura 20). El tamaño era de aproximadamente 55 kDa, probablemente parcialmente glicosilado. Debido a que la proteína expresada representaba casi la única banda visible en el sobrenadante, sería conveniente recoger el producto enzimático sin necesidad de una purificación tediosa.

Ejemplo 17- pH y temperatura óptimos de la fitasa extracelular expresada (colonia nº 23)

- 30 El pH óptimo de la fitasa expresada era de 2,5 a 3,5 (véase la Figura 21). Éste es significativamente diferente del de la fitasa *phyA* de *A. niger* (BASF) o de nuestros otros sistemas de expresión. Es ideal para la función de la fitasa al pH del estómago.

La temperatura óptima de la enzima expresada era de 60°C (véase la Figura 22).

Ejemplo 18- Efecto de la fitasa expresada sobre la hidrólisis de fósforo de fitato a partir de harina de soja

Esta fitasa de *E. coli* sobreexpresada (colonia nº 23) hidrolizó eficazmente el fósforo de fitato a partir de harina de soja (véase la Figura 23). La liberación de fósforo libre en la mezcla fue lineal de 0 a 800 mU de fitasa/g de pienso.

Ejemplo 19- Efectos de la fitasa AppA de *E. coli* expresada por *Pichia pastoris* sobre la biodisponibilidad de fósforo de fitato en cerdos destetados.

- 5 Para determinar los valores nutricionales de la fitasa de *E. coli* expresada por *Pichia* en las dietas de cerdos, se comparó la eficacia de esta nueva fitasa con las del fósforo inorgánico o la fitasa microbiana disponible comercialmente (Natuphos™, BASF Corp., Mt. Olive, NJ). Se seleccionaron 48 cerdos destetados de cerdas multíparas en la Cornell Swine Research Farm. Se destetaron los cerdos a los 21 días de edad y se alimentaron con un pienso fluido comercial hasta el día 28. Se dispusieron después dos por pocilga, con seis pocilgas asignadas
- 10 aleatoriamente para el tratamiento. Se les dio dos semanas a los cerdos para ajustarse a la dieta basal de harina de maíz-soja (Tabla 13).

Tabla 13. Fomulación de dietas experimentales para cerdos

Ingrediente	% dieta +C	% dieta -C	% dieta FL	% dieta FM
Maíz	60,5	61,57	61,07	61,07
Concentrado de proteína de suero				
SBM al 44%	3	3	3	3
Aceite de maíz	30	30	30	30
Cal	3	3	3	3
Fosfato de dicalcio	0,8	0,93	0,93	0,93
Vitamina y premezcla mineral	1,2	0	0	0
Premezcla ECAP				
Premezcla FM	0,5	0,5	0,5	0,5
Sal	0	0	0,5	0
CSP 250	0	0	0	0,5
Total	0,5	0,5	0,5	0,5
CP	0,5	0,5	0,5	0,5
Ca	100	100	100	100
P _{total}	20,6	20,6	20,6	20,6
	0,73	0,47	0,47	0,47
	0,6	0,39	0,39	0,39

Nota: Todas las premezclas utilizan maíz como vehículo

Vitamina y premezcla mineral suministra: 2.540 UI de vit A, 660 UI de vit. D, 15 UI de vit. E, 2,2 mg de vit K, 3,3 mg de riboflavina, 13,2 mg de ácido pantoténico, 17,6 mg de niacina, 110,1 mg de colina, 1,98 µg de B-12, 37,4 mg de Mn, 0,6 mg de I, 10 mg de Cu, 0,3 mg de Se, 100 mg de Zn y 100 mg de Fe por kg de dieta

- Después, cada pocilga recibió una de las cuatro dietas de tratamiento. El grupo control positivo (+C) recibió la dieta basal suplementada con fosfato de dicalcio. El grupo control negativo (-C) recibió sólo la dieta basal. El grupo de fitasa de levadura (FL) recibió la dieta basal suplementada con la fitasa de *E. coli* expresada a 1.200 U/kg de pienso. El grupo de fitasa microbiana (FM) recibió la dieta basal suplementada con la fitasa de BASF a 1.200 U/kg de pienso. Se les dio libre acceso a pienso y agua a los cerdos. Se registró semanalmente la ganancia de peso corporal de los cerdos individuales. Se registró diariamente la toma de pienso diaria de las pocilgas individuales. Se tomaron
- 15 semanalmente muestras de sangre de cada uno de los cerdos individuales para ensayar las concentraciones de fósforo inorgánico plasmático. Se presentan en la Tabla 14 los resultados de peso corporal (PC), ganancia diaria
- 20 media (GDM), toma de pienso media (TPM), relación pienso/ganancia (P:G) y fósforo inorgánico plasmático (PP).

Tabla 14. Resumen de PP, PC, GDM, TPM y P:G de cerdos afectados por fitasa dietética

	+C	-C	FL	FM
Inicial				
PP	12,99	13,02	13,07	13,54
PC	11,54	11,63	12	11,5
Semana 1				
PP	10,83 ^A	6,48 ^C	8,59 ^B	8,35 ^B
PC	14	13,83	14,29	13,92
GDM	0,351	0,316	0,327	0,345
TPM	0,700	0,684	0,697	0,697
P:G	2,04	2,20	2,18	2,13
Semana 2				
PP	9,76 ^A	5,64 ^D	8,72 ^B	7,84 ^C
PC	18,04	17,42	17,83	17,71
GDM	0,578	0,512	0,506	0,542
TPM	0,833	0,855	0,784	0,837
P:G	1,46 ^B	1,67 ^A	1,56 ^{AB}	1,55 ^{AB}
Semana 3				
PP	11 ^A	6,26 ^C	8,64 ^B	8,13 ^B
PC	22,58	21,17	22	22,21
GDM	0,649 ^A	0,536 ^B	0,595 ^{AB}	0,643 ^{AB}
TPM	1,166	1,02	1,001	1,003
P:G	1,8	1,92	1,71	1,36
Semana 4				
PP	10,94 ^A	6,31 ^C	9,65 ^B	9,2 ^B
PC	27,54	25,29	27,79	27,38
GDM	0,708 ^{AB}	0,589 ^B	0,827 ^A	0,738 ^{AB}
TPM	1,395 ^A	1,049 ^B	1,309 ^A	1,273 ^{AB}
P:G	1,98	1,87	1,59	1,73

¹ Los números en la misma fila sin compartir una letra común son significativamente diferentes. El análisis de la diferencia se realizó con los test de t de Bonferroni (Dunn) con alfa= 0,05 y df= 20

- Además, hubo varias deficiencias graves de fósforo en el grupo control negativo al final del experimento de cuatro semanas. Sin embargo, no hubo señal de deficiencia de fósforo en los otros tres grupos. Claramente, la fitasa de *E. coli* expresada por *Pichia* era al menos igual de eficaz, si no más, que la fitasa microbiana comercial en la mejora de la biodisponibilidad del fósforo de fitato a partir de dietas de harina de maíz-soja para cerdos destetados. Puede utilizarse para reemplazar el suplemento de fósforo inorgánico para cerdos destetados.

Ejemplo 20- Efectos de la fitasa AppA de *E. coli* expresada por *Pichia pastoris* sobre la biodisponibilidad de hierro (Fe) y fósforo de fitato en cerdos destetados

- Para determinar el efecto de la fitasa de *E. coli* sobreexpresada por *Pichia* sobre la biodisponibilidad de Fe unido a fitato dietético para cerdos destetados, se seleccionaron 20 cerdos anémicos (de 21 días de edad y 7,3 g de hemoglobina (Hb)/dl de sangre). Se alimentaron los cerdos con un pienso fluido deficiente en Fe durante 7 días y se albergaron en jaulas metabólicas a la edad de 28 días. Se alimentaron después los cerdos con las dietas experimentales a la edad de 35 días durante 5 semanas. Las dietas de tratamiento fueron las siguientes: dieta basal deficiente en hierro (-C, con fósforo inorgánico añadido), dieta suplementada con hierro (+C), dieta deficiente en hierro y fósforo suplementada con la fitasa de *E. coli* expresada (FL) o la fitasa microbiana comercial (BASF, FM) a 1.200 U/kg de pienso. Se determinaron semanalmente peso corporal (PC), volumen de células empaquetadas (VCE), Hb y fósforo inorgánico plasmático (PP). Los resultados se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15. Resumen de VCE, Hb, PC y PP de cerdos afectados por fitasa dietética¹

	+C	-C	FL	FM
Inicial				
VCE	25	25	26	24
Hb	7,73	7,22	7,85	7,08
PC	8,14	8,27	8,17	7,45
PP	7,92	7,76	7,21	7,36
Semana 1				
VCE	25	26	29	27
Hb	7,62	8,3	8,77	7,88
PC	9,44	8,84	9,63	8,57
PP	8,41	8,45	8,48	8,22
Semana 2				
VCE	29	26	30	28
Hb	8,6	7,34	8,93	8,27
PC	12,32	10,13	11,91	10,84
PP	10,28 ^a	9,05 ^{ab}	8,89 ^{ab}	8,22 ^a
Semana 3				
VCE	36 ^a	29 ^b	34 ^a	33 ^a
Hb	11,55 ^a	8,2 ^b	10,84 ^a	9,96 ^{ab}
PC	16,77 ^a	13 ^b	15,62 ^{ab}	14,62 ^{ab}
PP	12,14 ^a	11,37 ^{ab}	10,25 ^{bc}	9,71 ^c
Semana 4				
VCE	39	34	38	36
Hb	12,99 ^a	10,11 ^b	12,27 ^a	11,35 ^{ab}
PC	21,36 ^a	17,37 ^b	19,44 ^{ab}	18,56 ^{ab}
PP	10,19 ^a	9,34 ^{ab}	9,49 ^{ab}	8,8 ^b
Semana 5				
VCE	40	38	40	39
Hb	13,52 ^a	12,24 ^b	13,64 ^a	13,13 ^{ab}
PC	26,53	22,59	24,27	23,43
PP	9,27 ^a	8,95 ^{ab}	8,79 ^{ab}	8,02 ⁿ

1 Los valores son medias (n= 5). Las medias en la misma fila sin compartir una letra de superíndice común son significativamente diferentes (p< 0,10)

En conclusión, la fitasa de *E. coli* sobreexpresada por *Pichia* era al menos tan eficaz como la fitasa de BASF en la mejora de la utilización de fósforo de fitato y Fe en dietas de maíz-soja para cerdos destetados.

- 5 Aunque se han representado y descrito con detalle en la presente memoria las realizaciones preferidas, resultará evidente para los expertos en la técnica relevante que pueden hacerse diversas modificaciones, adiciones, sustituciones y similares sin apartarse del espíritu de la invención, y éstas se consideran dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones siguientes.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	Cornell Research Foundation, Inc.	
	<120>	SOBREEXPRESIÓN DE GENES DE FITASA EN SISTEMAS DE LEVADURA	
5	<130>	19603/1341	
	<140>		
	<141>		
	<150>	09/104.769	
	<151>	25-06-1998	
10	<160>	12	
	<170>	PatentIn ver. 2.0	
	<210>	1	
	<211>	22	
	<212>	ADN	
15	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de la secuencia artificial: cebador para amplificación por PCR y clonación	
	<400>	1	
20		cggaattcgt cacctccgga ct	22
	<210>	2	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
25	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de la secuencia artificial: cebador para amplificación por PCR y clonación	
	<400>	2	
30		cccaagcttc taagcaaaac actc	24
	<210>	3	
	<211>	22	
	<212>	ADN	
35	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de la secuencia artificial: cebador para amplificación por PCR y clonación	
	<400>	3	
40		cagctatgac catgattacg cc	22
	<210>	4	
	<211>	26	
	<212>	ADN	
45	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de la secuencia artificial: cebador para amplificación por PCR y clonación	
	<400>	4	
50		cctagaacgg gaattcattg gccgcc	26
	<210>	5	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
55	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de la secuencia artificial: cebador para amplificación por PCR y clonación	
	<400>	5	
60		cccaagcttg atcacatcca ttca	24
	<210>	6	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
65	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		

ES 2 255 281 T5

```

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador para amplificación por PCR y
        clonación
<400>      6
5  cggggactgc tagcgcacgt tcgat                                25

<210>      7
<211>      28
<212>      ADN
<213>      Secuencia artificial
10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador para amplificación por PCR y
        clonación
<400>      7
15 atcgaacgtg cgctagcagc agtccccg                                28

<210>      8
<211>      24
<212>      ADN
<213>      Secuencia artificial
20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador para amplificación por PCR y
        clonación
<400>      8
25 gctctagact aagcaaaaca ctcc                                24

<210>      9
<211>      80
<212>      ADN
<213>      Secuencia artificial
30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador para amplificación por PCR y
        clonación
<400>      9
35 ggggtaccat gggcgctctt gctgttctac ttcctttgta tctcctgtct    50
   ggagtcacct cgggacagag tgagccggag                                80

<210>      10
<211>      24
<212>      ADN
40 <213>      Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador para amplificación por PCR y
        clonación
<400>      10
45 gggaattcat taaaaactgc aggc                                24

<210>      11
<211>      21
<212>      ADN
50 <213>      Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador para amplificación por PCR y
        clonación
<400>      11
55 ggaattccag agtgagccgg a                                21

<210>      12
<211>      22
<212>      ADN
60 <213>      Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador para amplificación por PCR y
        clonación
<400>      12
65 ggggtacctt aaaaactgca cg                                22.

```


REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de fitasa en levadura que comprende:
proporcionar un gen *appA* aislado a partir de células bacterianas, codificando dicho gen *appA* una proteína o polipéptido con actividad fitasa, expresar dicho gen *appA* en una cepa de levadura, y aislar la proteína o polipéptido expresado.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la proteína o polipéptido, conducido por un péptido señal, se secreta por la célula en los medios de crecimiento o sólo se expresa intracelularmente.
3. El método según la reivindicación 2, en el que la proteína o polipéptido se secreta en los medios de crecimiento y tiene una concentración mayor de 300 unidades/ml.
4. El método según la reivindicación 1, en el que el gen *appA* se ajusta en fase con un elemento potenciador transcripcional.
5. El método según la reivindicación 1, en el que el gen *appA* es portado por un vector estable.
6. El método según la reivindicación 1, en el que el gen *appA* es portado por un cromosoma artificial.
7. El método según la reivindicación 1, en el que el gen *appA* se integra en el cromosoma de la cepa de levadura.
8. El método según la reivindicación 1, en el que la cepa de levadura se selecciona del grupo constituido por *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* y *Schizosaccharomyces*.
9. El método según la reivindicación 8, en el que la cepa de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
10. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que el gen *appA* se aísla a partir de *Escherichia coli*.
11. El método según la reivindicación 1, en el que la cepa de levadura es una cepa de levadura metilotrófica.
12. El método según la reivindicación 11, en el que la cepa de levadura metilotrófica es *Pichia pastoris*.
13. La proteína o polipéptido obtenible mediante un método según la reivindicación 1, que tiene actividad fitasa con una actividad óptima en un intervalo de temperatura de 57-65°C y a un pH de 2,5 a 3,5 ó 5 a 5,5.
14. La proteína o polipéptido según la reivindicación 13, en el que el intervalo de temperatura para actividad óptima es de 58 a 62°C.
15. La proteína o polipéptido según la reivindicación 13 que tiene actividad fitasa, en el que la proteína retiene al menos un 40% de su actividad después de calentar la proteína durante 15 minutos a 90°C.
16. La proteína o polipéptido de la reivindicación 15, en el que la proteína retiene entre un 40% y un 60% de su actividad después de calentar la proteína durante 15 minutos a 90°C.
17. La proteína o polipéptido según la reivindicación 13 que tiene actividad fitasa, en el que la proteína retiene al menos un 60% de su actividad después de calentar la proteína durante 15 minutos a 60°C.
18. Una cepa de levadura que comprende:
un gen *appA* aislado a partir de células bacterianas, codificando dicho gen *appA* una proteína o polipéptido con actividad fitasa y que está funcionalmente ligado a un promotor capaz de expresar fitasa en levadura, en la que dicha proteína o polipéptido tiene termoestabilidad aumentada cuando se expresa en una célula hospedadora de levadura en comparación con la de dicha proteína o polipéptido expresado en una célula hospedadora no de levadura.
19. La cepa de levadura según la reivindicación 18, en la que el gen *appA* se aísla a partir de *Escherichia coli*.
20. La cepa de levadura según la reivindicación 18, en la que la cepa de levadura se selecciona del grupo constituido por *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* y *Schizosaccharomyces*.
21. La cepa de levadura según la reivindicación 20, en la que la cepa de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

22. La cepa de levadura según la reivindicación 19, en la que la cepa de levadura es una cepa de levadura metilotrófica.
- 5 23. La cepa de levadura según la reivindicación 22, en la que la cepa de levadura metilotrófica es *Pichia pastoris*.
24. Un vector que comprende
- 10 un gen *appA* aislado a partir de células bacterianas, codificando dicho gen *appA* una proteína o polipéptido con actividad fitasa;
- un promotor ligado funcionalmente al gen *appA*, siendo capaz dicho promotor de iniciar la transcripción en levadura; y
- 15 un origen de replicación capaz de mantener el vector en levadura, en el que dicha proteína o polipéptido tiene termoestabilidad aumentada cuando se expresa en una célula hospedadora de levadura en comparación con la de dicha proteína o polipéptido expresado en una célula hospedadora no de levadura.
25. El vector según la reivindicación 24, que comprende adicionalmente: un marcador detectable.
- 20 26. El vector según la reivindicación 25, en el que el marcador detectable se selecciona del grupo constituido por URA3, LEU2, TRP1, HIS3, HIS4, ARG4 y un gen de resistencia a antibiótico.
27. El vector según la reivindicación 24, que comprende adicionalmente: un origen de replicación capaz de replicación en una célula bacteriana.
- 25 28. El vector según la reivindicación 27, en el que el origen de replicación se selecciona del grupo constituido por ColE1, Ori y oriT.
29. El vector según la reivindicación 24, en el que el gen *appA* se aísla a partir de *Escherichia coli*.
- 30 30. Un método de conversión de fitato en inositol y fósforo inorgánico, que comprende:
- proporcionar un gen *appA* aislado a partir de células bacterianas;
- expresar una proteína o polipéptido con actividad fitasa a partir de dicho gen en una célula hospedadora de levadura; y
- 35 poner en contacto la proteína o polipéptido con fitato para catalizar la conversión de fitato en inositol y fósforo inorgánico.
31. El método según la reivindicación 30, en el que el fitato está contenido en alimento o pienso.
- 40 32. El método según la reivindicación 30, en el que el gen *appA* se aísla a partir de *Escherichia coli*.

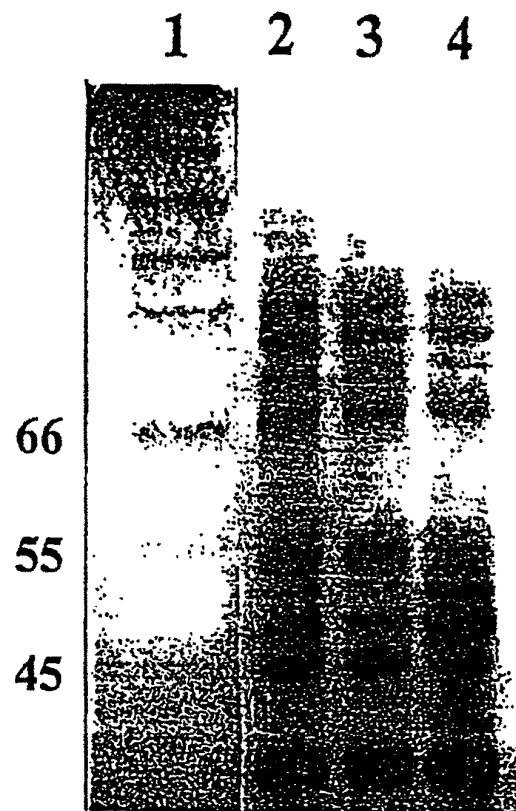


FIGURA 1

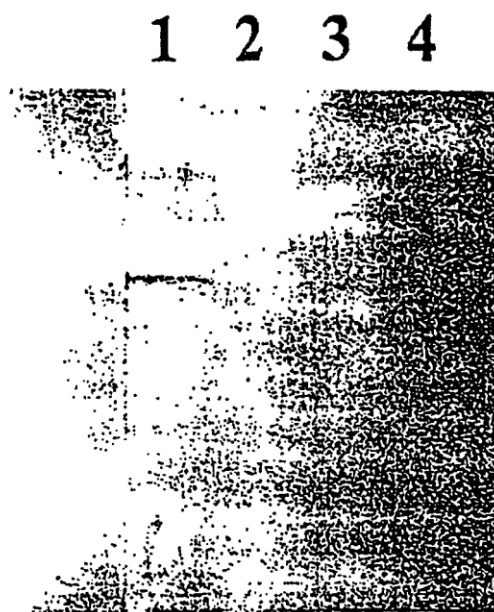


FIGURA 2

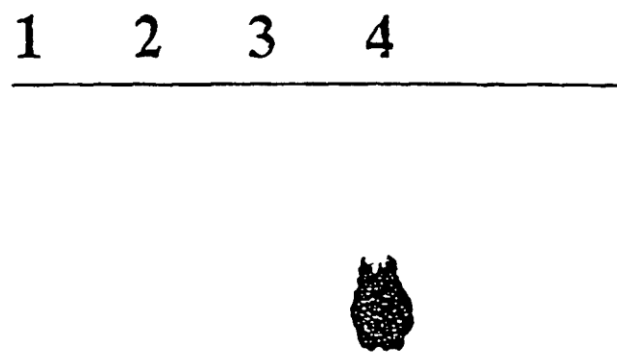


FIGURA 3

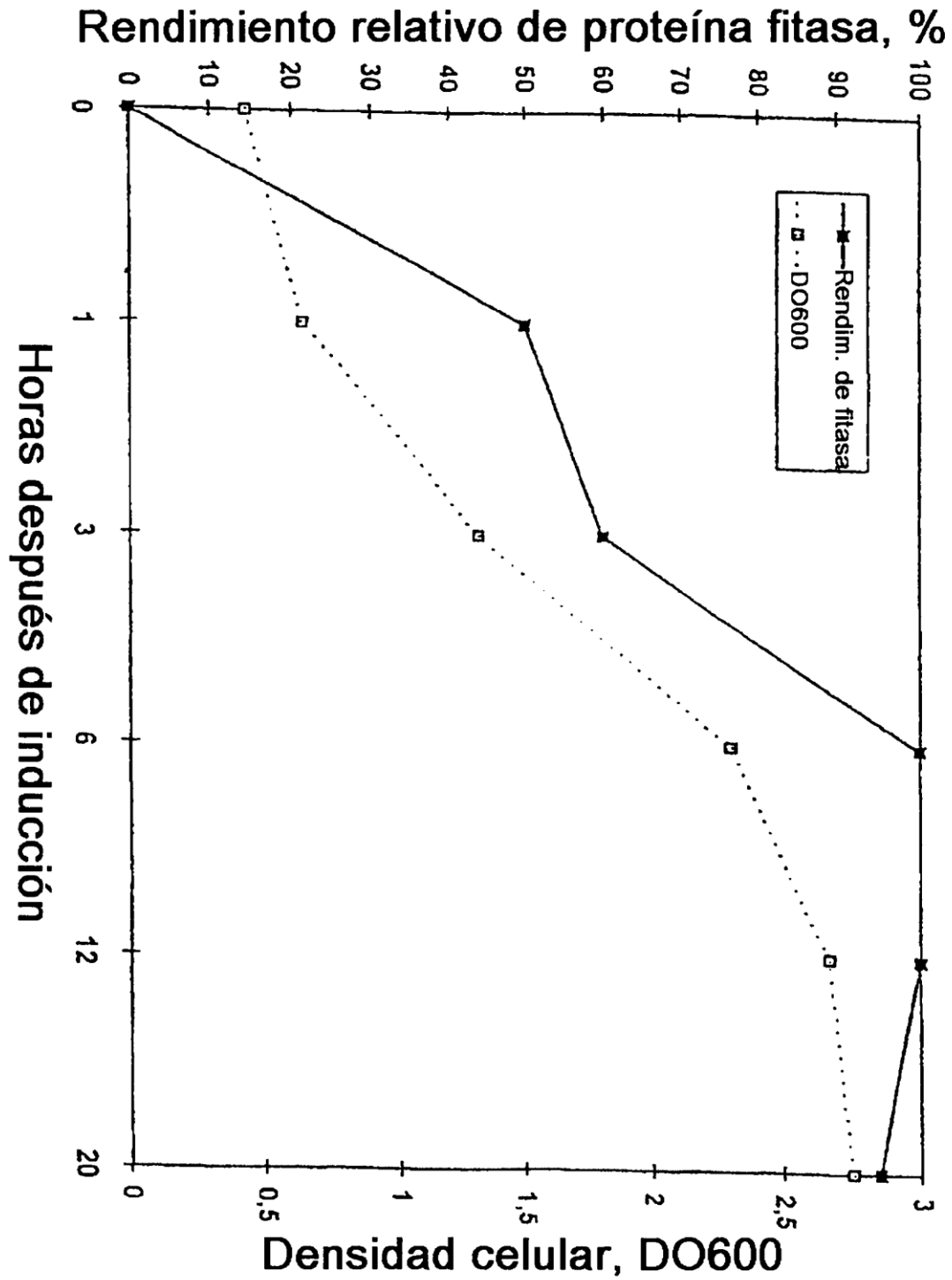


FIGURA 4

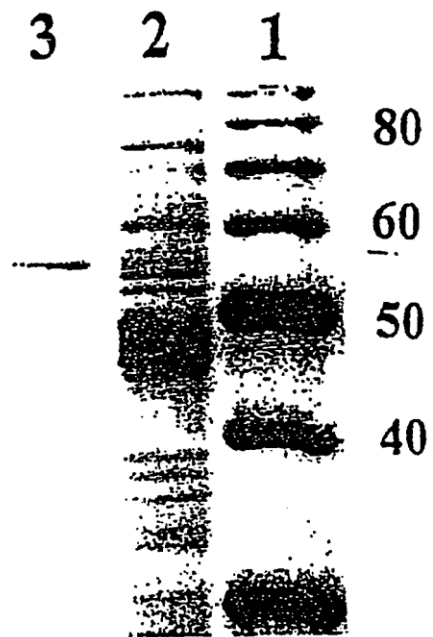


FIGURA 5

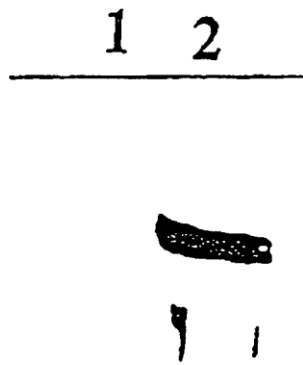


FIGURA 6

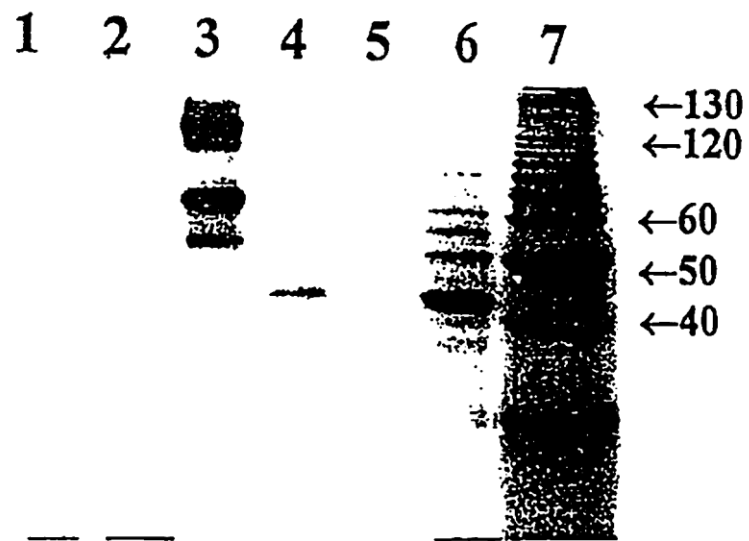


FIGURA 7

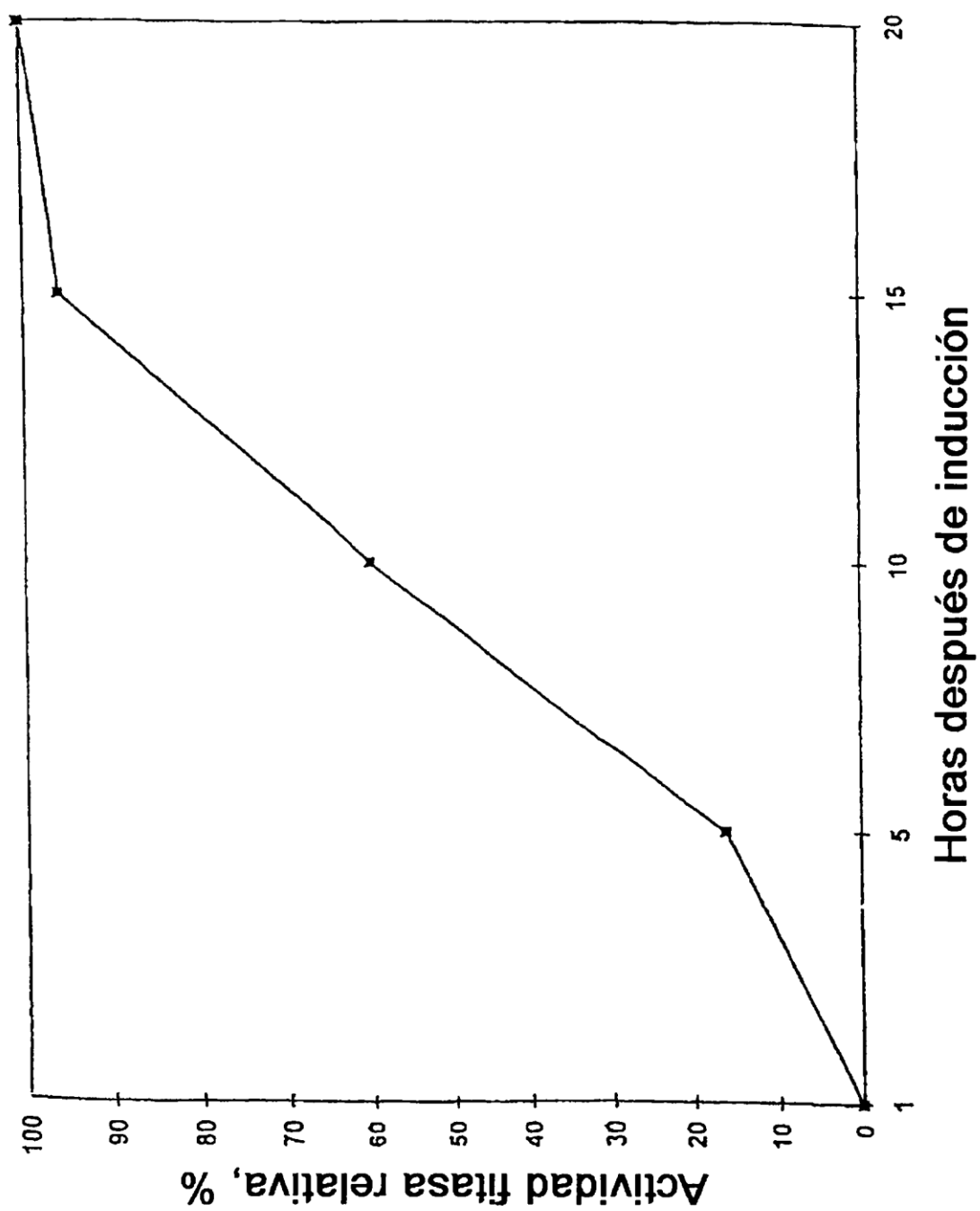


FIGURA 8

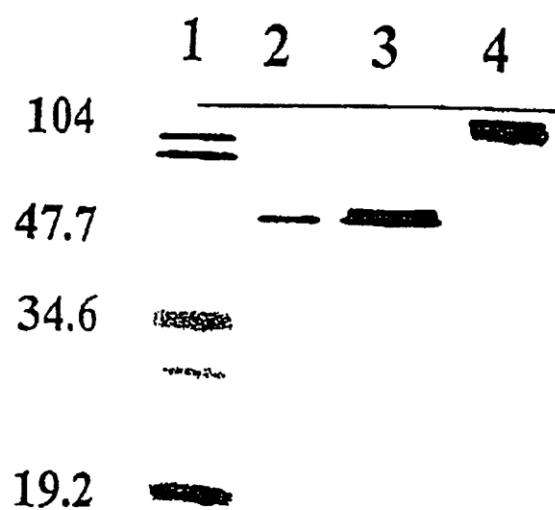


FIGURA 9

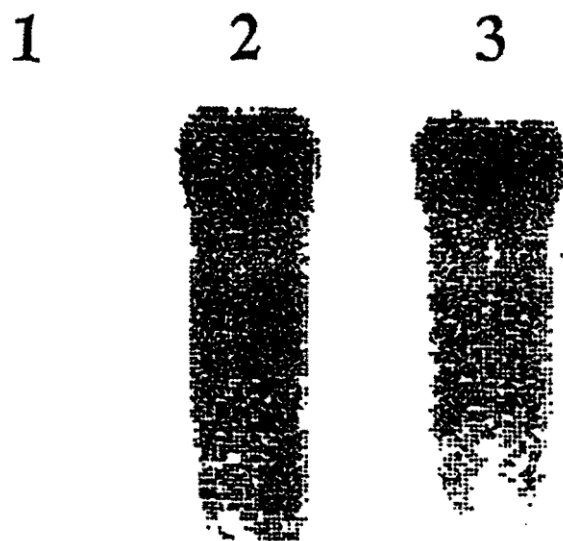


FIGURA 10

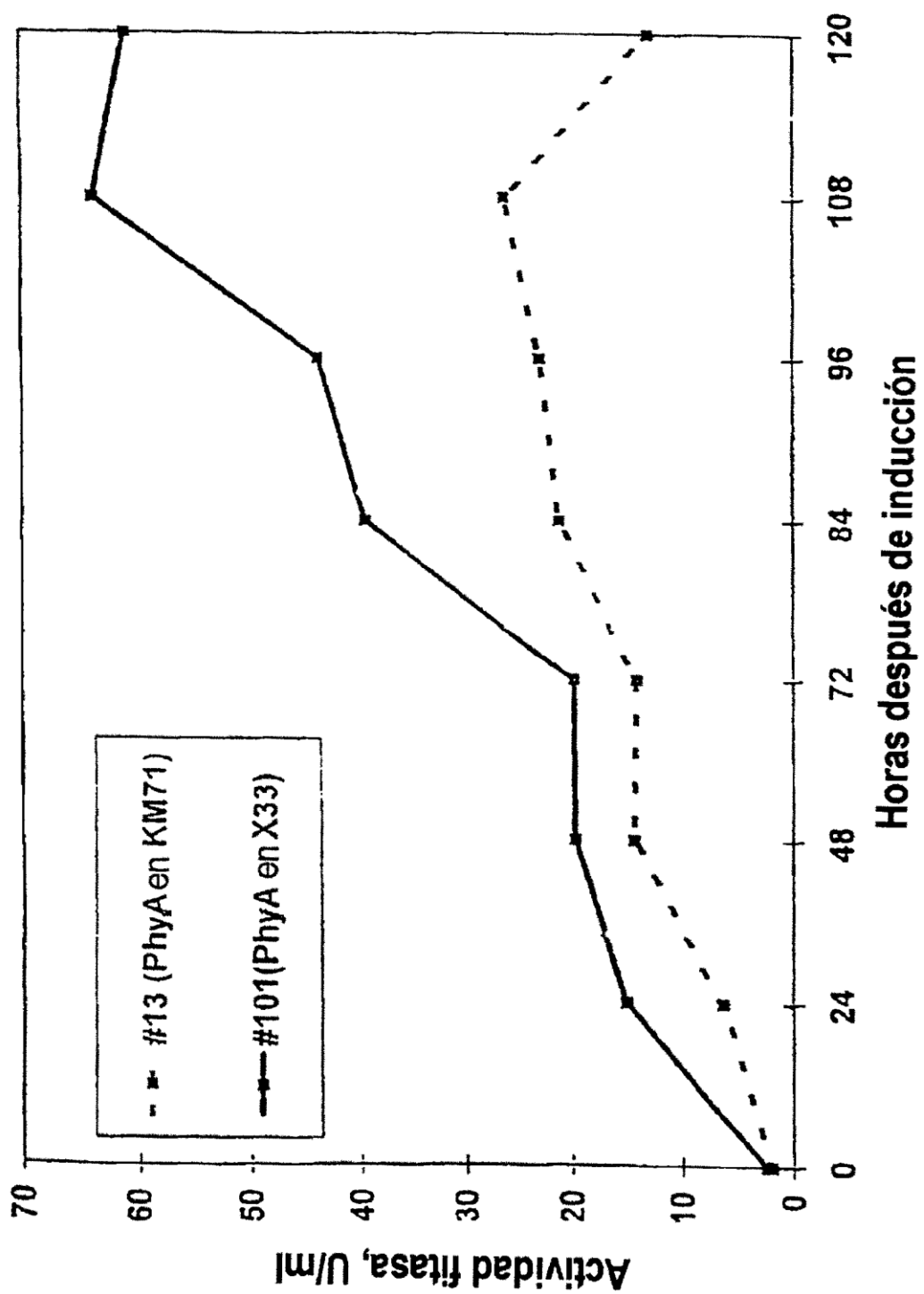


FIGURA 11



FIGURA 12

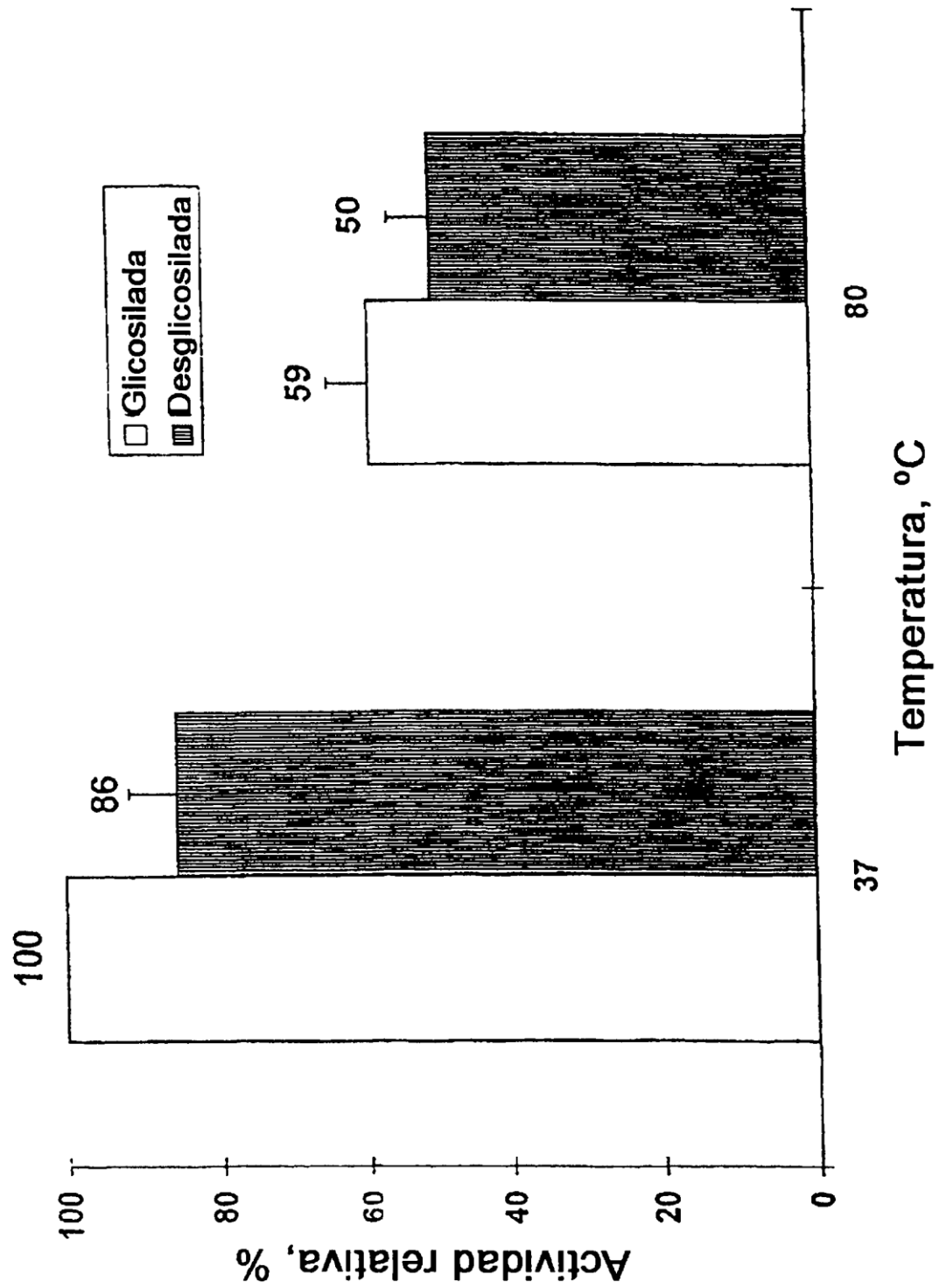


FIGURA 13

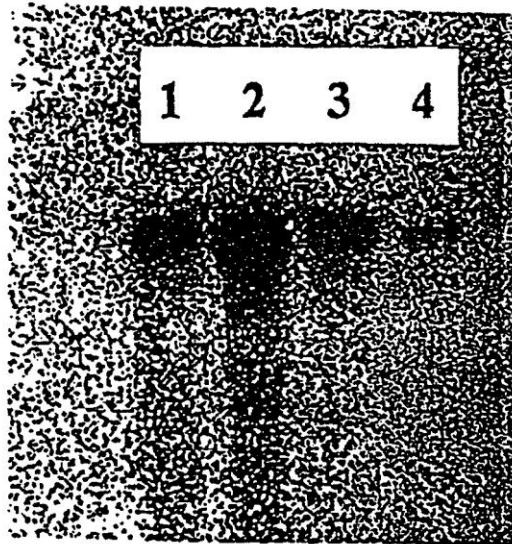


FIGURA 14

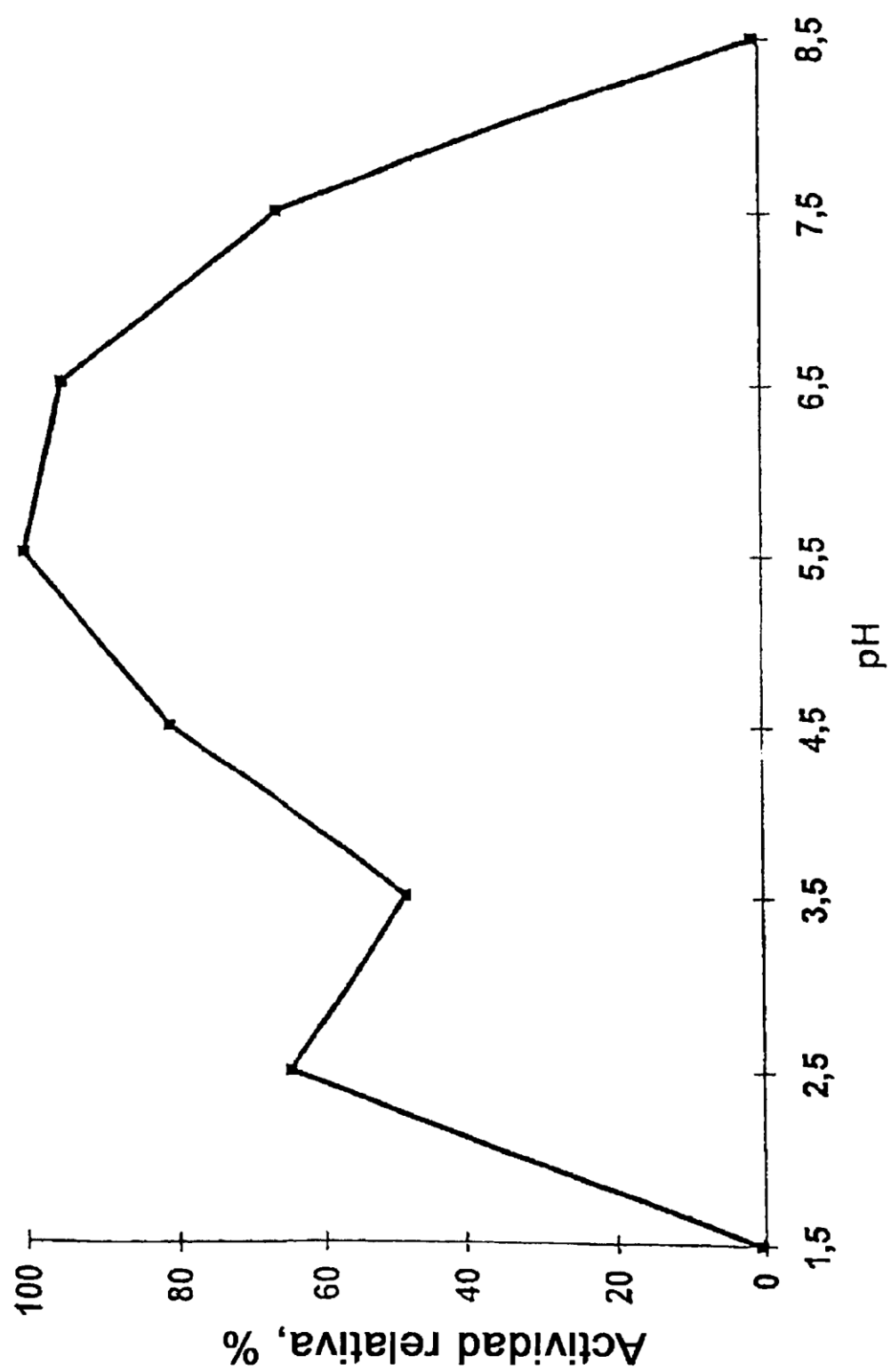


FIGURA 15

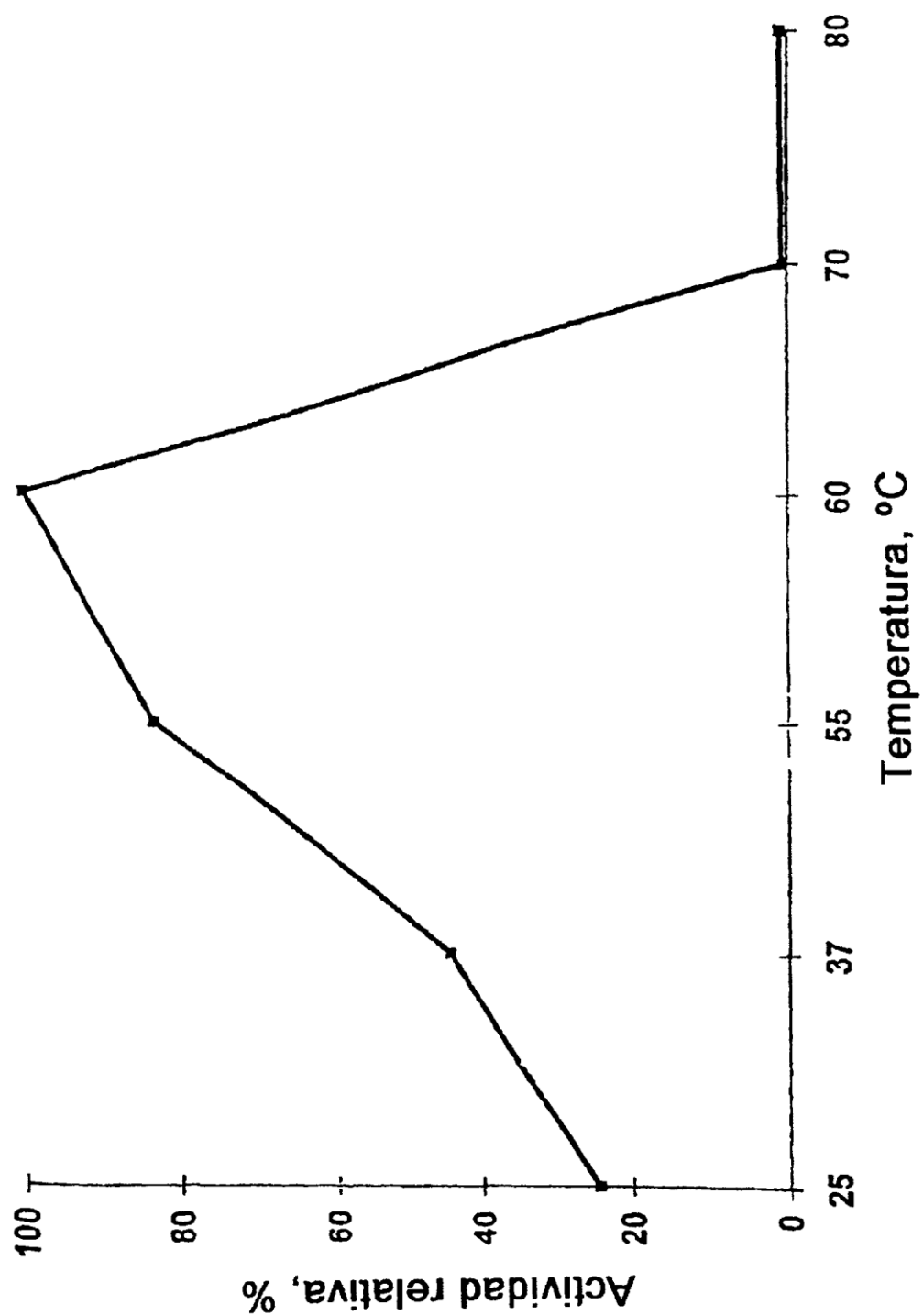


FIGURA 16

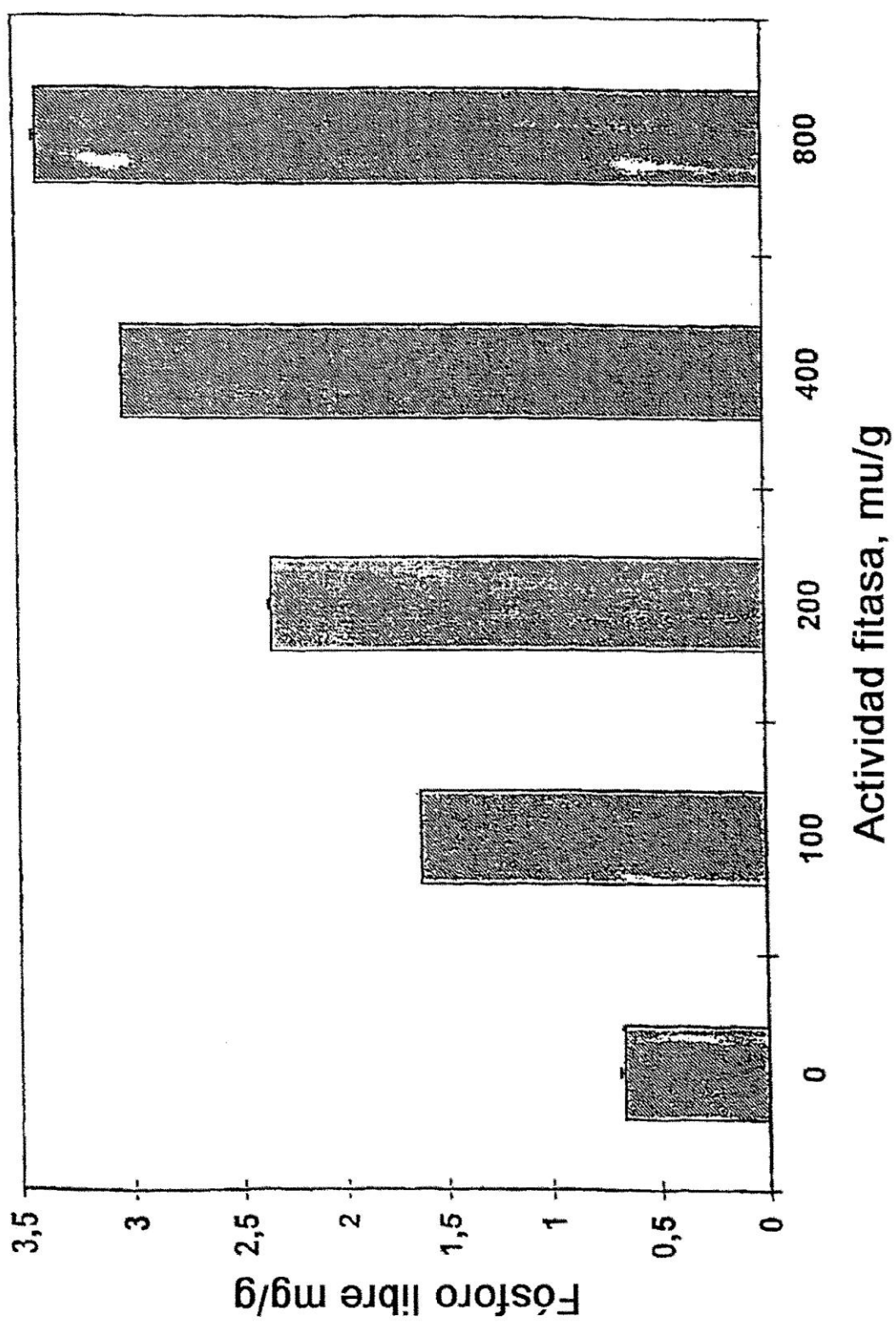


FIGURA 17

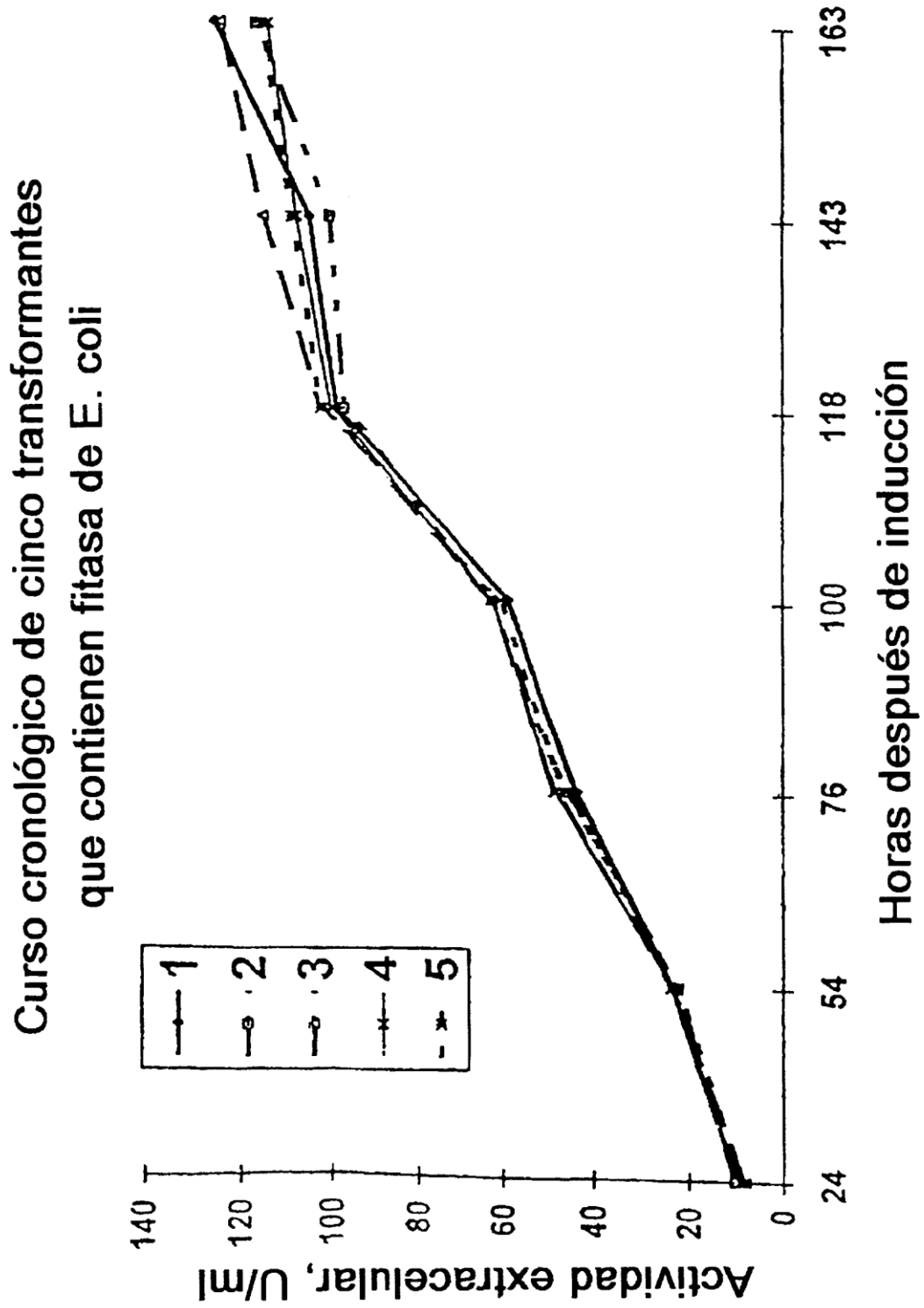


FIGURA 18

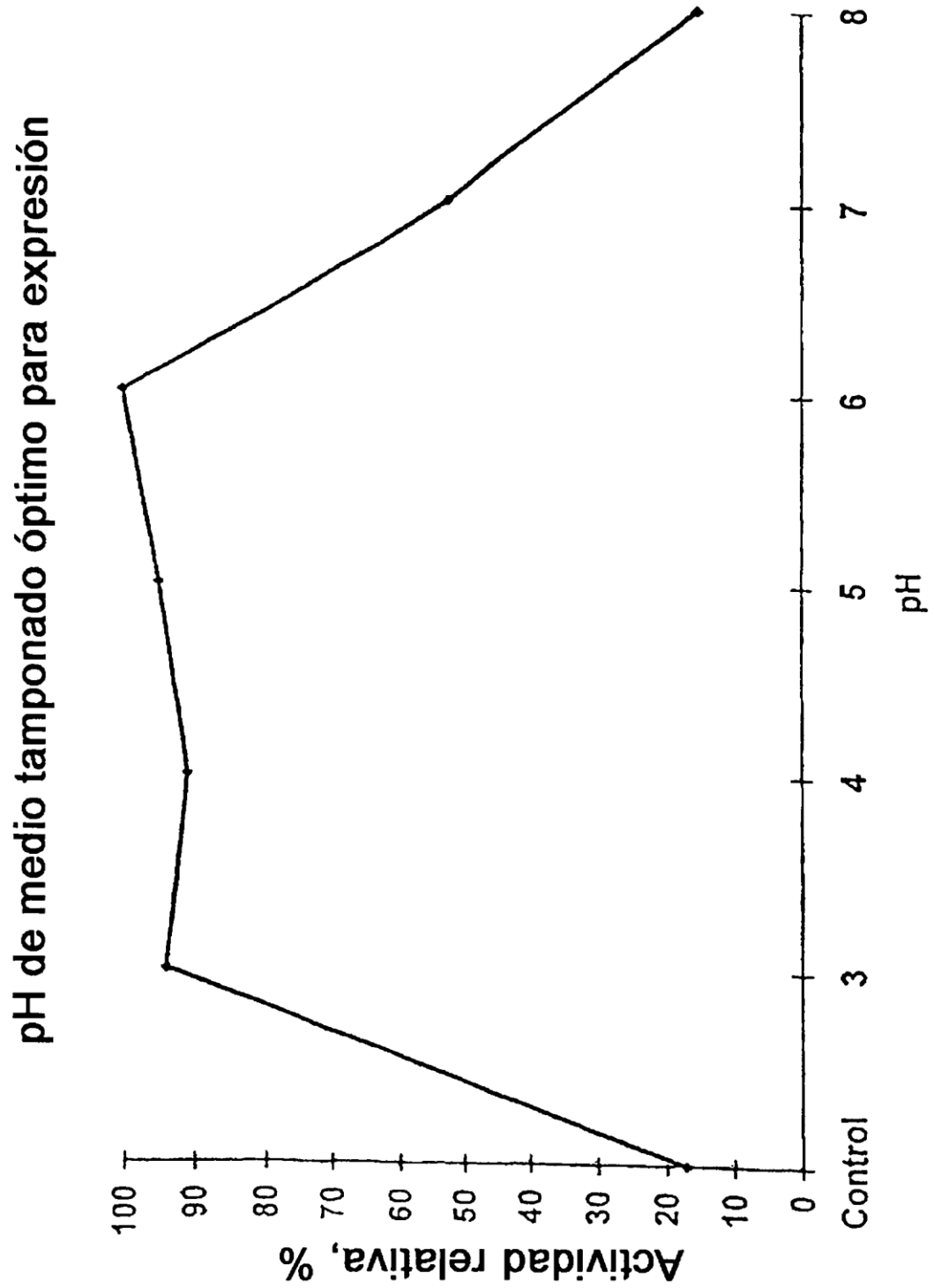
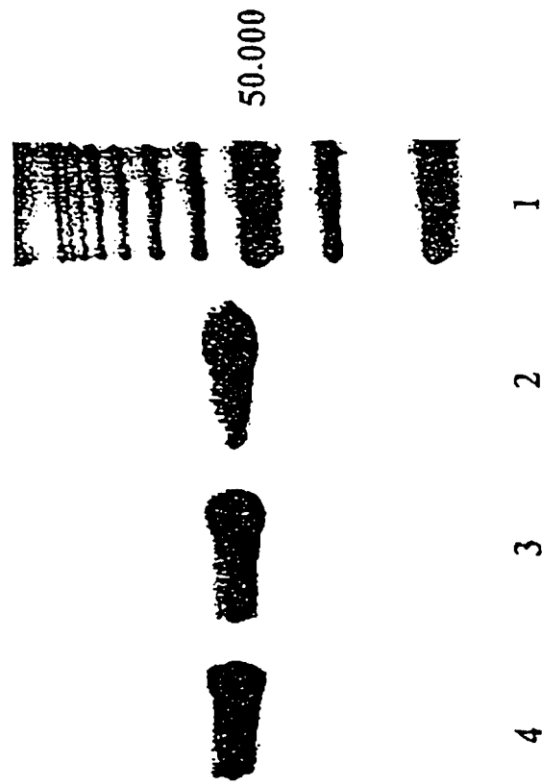


FIGURA 19

Análisis PAGE-SDS de fitasa expresada en *E. coli*



Carril 1: escala de proteínas

Carril 2 a 4: sobrenadante de la colonia n° 23, 22 y 11, respectivamente, a 118 horas después de la inducción. Las colonias se transformaron con el constructo de expresión que contiene el gen fitasa de *E. coli*

FIGURA 20

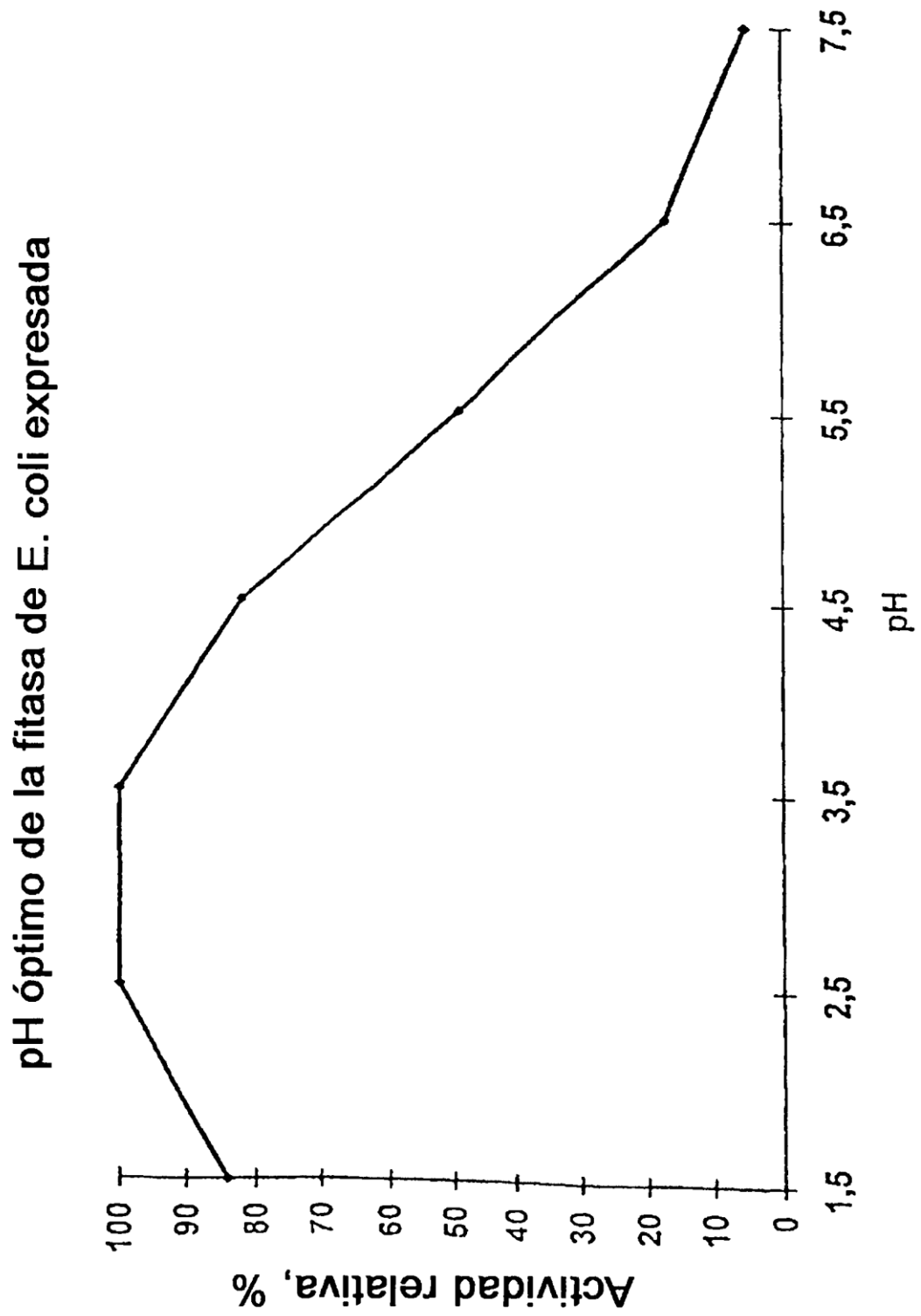


FIGURA 21

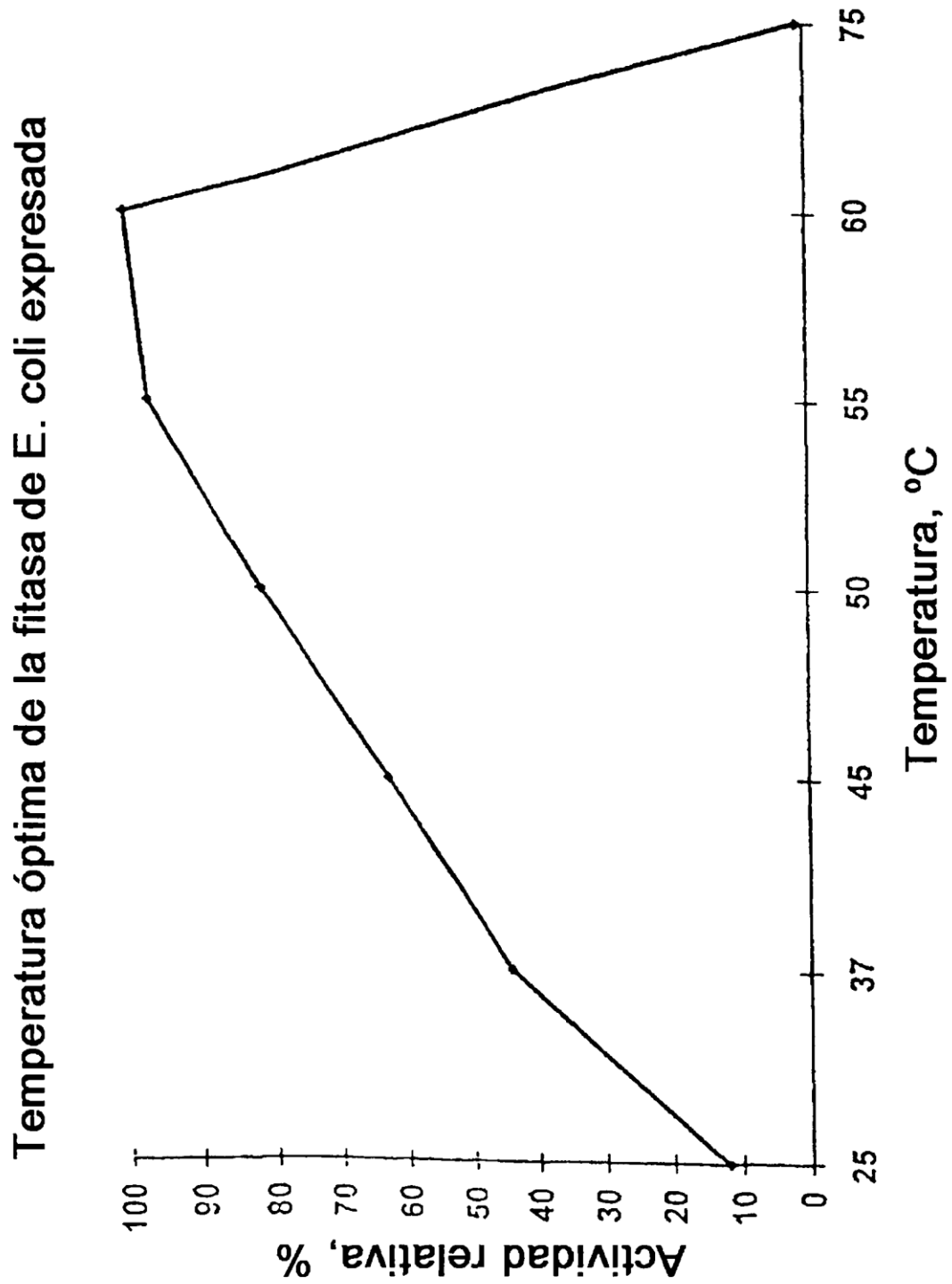


FIGURA 22

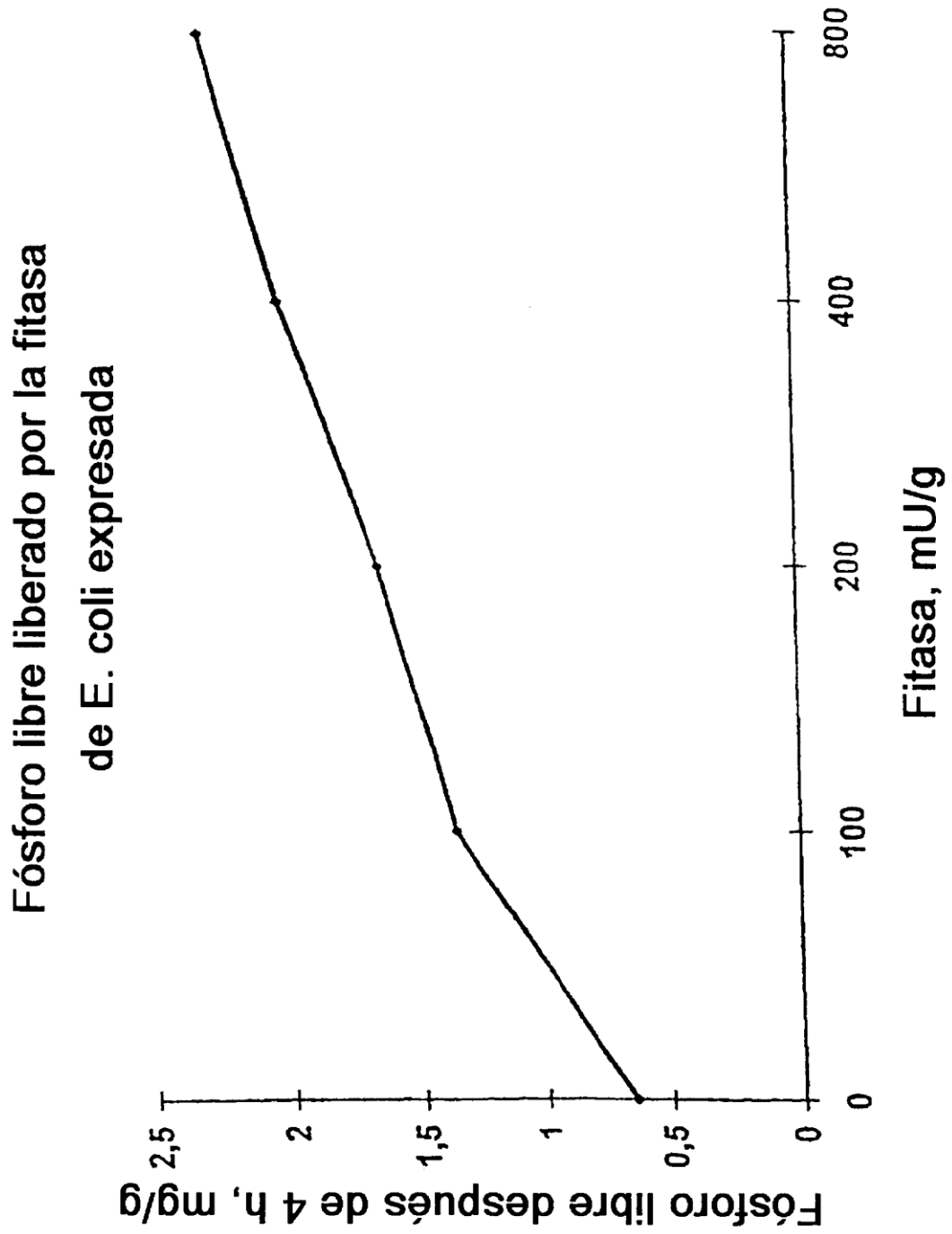


FIGURA 23