



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 323 440**

(51) Int. Cl.:

**C12N 9/16** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **97948748 .5**

(96) Fecha de presentación : **15.12.1997**

(97) Número de publicación de la solicitud: **0958353**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.1999**

(54) Título: **Polipéptidos con actividad fitasa.**

(30) Prioridad: **20.12.1996 DK 1480/96**  
**20.12.1996 DK 1481/96**  
**18.03.1997 DK 301/97**  
**07.05.1997 DK 529/97**  
**01.12.1997 DK 1388/97**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.07.2009**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.07.2009**

(73) Titular/es: **Novozymes A/S**  
**Krogshojvej 36**  
**2880 Bagsvaerd, DK**

(72) Inventor/es: **Lassen, Soeren Flensted;**  
**Bech, Lisbeth;**  
**Ohmann, Anders;**  
**Breinholt, Jens y**  
**Fuglsang, Claus, Crone**

(74) Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

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

**DESCRIPCIÓN**

Polipéptidos con actividad fitasa.

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad fitasa, a las secuencias de ADN clonadas correspondientes, a un método para producir tales polipéptidos, y a uso de los mismos para varias aplicaciones industriales, tal y como se define en las reivindicaciones.

**10 Antecedentes de la invención**

Ácido fítico o mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquis dihidrogeno fosfato (o para abreviar mio-inositol hexaquisfosfato) es la fuente primaria de inositol y la forma de almacenamiento primaria del fosfato en semillas de plantas. De hecho, se forma naturalmente durante la maduración de semillas y granos de cereales. En las semillas de legumbres representa aproximadamente el 70% del contenido de fosfato y está estructuralmente integrado con los cuerpos de proteína como fitina, un potasio mezclado, magnesio y sal cárlica de inositol. Semillas, granos de cereales y legumbres son importantes componentes de preparaciones alimentarias y de piensos, en particular de preparaciones de piensos. Pero también en cereales y legumbres para alimentación humana están volviéndose más importantes.

**20** Las fracciones de fosfato de quelatos de ácido fítico bivalentes y cationes trivalentes tales como los iones metálicos, entre otros, los iones nutricionalmente esenciales de calcio, hierro, zinc y magnesio al igual que los oligoelementos manganeso, cobre y molibdeno.

**25** Además, el ácido fítico también enlaza en cierta medida proteínas por interacción electroestática. A un pH por debajo del punto isoeléctrico, pl, de la proteína, la proteína con carga positiva se enlaza directamente con fitato. A un pH por encima del pl, la proteína con carga negativa se enlaza por medio de iones metálicos a fitato.

**30** El ácido fítico y sus sales, fitatos, son frecuentemente no metabolizados, puesto que no son absorbibles por el sistema gastrointestinal, es decir ni los iones de fósforo del mismo, ni los iones metálicos quelatados, ni las proteínas enlazadas están nutricionalmente disponibles.

**35** Por consiguiente, puesto que el fósforo es un elemento esencial para el crecimiento de todos los organismos, las preparaciones alimentarias y de piensos necesitan ser suplementadas con fosfato inorgánico. Bastante frecuentemente también los iones nutricionalmente esenciales tales como el hierro y el calcio, deben ser suplementados. Y, además, el valor nutritivo de una dieta dada disminuye, debido al enlace de las proteínas por ácido fítico. Por consiguiente, el ácido fítico es frecuentemente denominado un factor anti-nutritivo.

**40** Además, puesto que el ácido fítico no es metabolizado, el fósforo de fitato pasa a través del tracto gastrointestinal de tales animales y es excretado con el abono, dando como resultado una contaminación de fosfato indeseable del medio ambiente que resulta p. ej. en eutroficación del entorno acuático y crecimiento extensivo de algas.

**45** El ácido fítico o fitatos, dichos términos usándose en el contexto presente, a menos que se indique lo contrario, como sinónimos o al azar, son degradables por las fitasas.

En la mayor parte de estas semillas de plantas que contienen ácido fítico, también se encuentran enzimas fitasas endógenas. Estas enzimas se forman durante la germinación de la semilla y sirven para el propósito de liberación de fosfato y, como el producto final, el mio-inositol libre para el uso durante el crecimiento de la planta.

**50** Cuando son ingeridos, los fitatos de componentes alimentarios o de piensos son en teoría hidrolizables por las fitasas vegetales endógenas de la semilla en cuestión, por fitasas que provienen de la flora microbiana en el intestino y por fitasas de la mucosa intestinal. En la práctica, no obstante la capacidad de hidrolización de las fitasas vegetales endógenas y las fitasas de la mucosa intestinal, si existe, está lejos de ser suficiente para aumentar significativamente la biodisponibilidad de los componentes enlazados o constituyentes de fitatos. No obstante, cuando el proceso de preparación de los alimentos o piensos implica la germinación, fermentación o remojo, la fitasa endógena puede contribuir en mayor medida a la degradación del fitato.

**60** En animales rumiantes o poligástricos tales como caballos y vacas el sistema gastro intestinal hospeda microorganismos capaces de degradar el ácido fítico. No obstante, esto no es así en animales monogástricos tales como seres humanos, aves y cerdos. En consecuencia, los problemas indicados arriba son principalmente importantes en lo que se refiere a tales animales monogástricos.

La producción de fitasas por plantas al igual que por microorganismos ha sido proporcionada. Entre los microorganismos, se conocen las bacterias productoras de fitasa al igual que los hongos productores de fitasa.

**65** En el reino *vegetal*, p. ej. una fitasa de salvado de trigo es conocida (Thomlinson *et al*, Biochemistry, 1 (1962), 166- 171). Una fitasa alcalina de polen de Lilly ha sido descrita por Barrientos *et al*, Plant. Physiol., 106 (1994), 1489- 1495.

# ES 2 323 440 T3

Entre las *bacterias*, se han descrito las fitasas que son derivadas de *Bacillus subtilis* (Paver and Jagannathan, 1982, Journal of Bacteriology 151:1102-1108) y *Pseudomonas* (Cosgrove, 1970, Australian Journal of Biological Sciences 23:1207-1220). Además, una fitasa de *E. coli* ha sido purificada y caracterizada por Greiner *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 303, 107-113, 1993). No obstante, esta enzima es probablemente una fosfatasa ácida.

5 *Levaduras* productoras de fitasa están también descritas, tal como *Saccharomyces cerevisiae* (Nayini *et al.*, 1984, Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 17:24-26. No obstante, esta enzima es probablemente una monofosfatasa mio-inositol (Wodzinski *et al.*, Adv. Appl. Microbiol., 42, 263-303). AU-A-24840/95 describe la clonación y expresión de una fitasa de la levadura *Schwanniomyces occidentalis*.

10 Hay diferentes descripciones de hongos filamentosos productores de fitasa, no obstante sólo pertenecen al phylum fúngico de Ascomycota (ascomicetos). En particular, hay diferentes referencias a la fitasa productora de ascomicetos del género *Aspergillus* tal como *Aspergillus terreus* (Yamada *et al.*, 1986, Agric. Biol. Chem. 322:1275-1282). También, la clonación y expresión del gen de fitasa de *Aspergillus niger* var. *awamori* ha sido descrita (Piddington *et Al.*, 1993, Gene 133:55-62). EP 0 420 358 describe la clonación y expresión de una fitasa de *Aspergillus ficuum* (niger). EP 0 684 313 describe la clonación y expresión de fitasas de los ascomicetos *Myceliophthora thermophila* y *Aspergillus terreus*.

20 Die Nahrung 39 (1995) 5/6 483-489 se refiere a la bioconversión de salvado de trigo y harinillas de trigo, subproductos del proceso de fresado, por pudrición blanca por Basidiomicetos *Lentinus edodes*.

Mycological Research 97(6)(1993) 725-732 se refiere a la actividad fosfatasa de cuatro hongos ectomicorrícos encontrados en una plantación de alerce japonés y *Picea de sitka* en Irlanda.

## 25 *Nomenclatura y especificidad de posición de fitasas*

En el contexto presente una fitasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de fitato (mio-inositol hexakisfosfato) a (1) mio-inositol y/o (2) mono-, di-, tri-, tetra y/o penta-fosfatos del mismo y (3) fosfato inorgánico. A continuación, para abreviar, los compuestos arriba son a veces referidos como IP<sub>6</sub>, I, IP<sub>1</sub>, IP<sub>2</sub>, IP<sub>3</sub>, IP<sub>4</sub>, IP<sub>5</sub> y P, respectivamente. Esto significa que por acción de una fitasa, IP<sub>6</sub> es degradada en P + uno o más de los componentes IP<sub>5</sub>, IP<sub>4</sub>, IP<sub>3</sub>, IP<sub>2</sub>, IP<sub>1</sub> y I. De forma alternativa, el mio-inositol que lleva en total n grupos de fosfato fijados a las posiciones p, q, r,... es denominado Ins(p,q,r,...)P<sub>n</sub>. Por conveniencia Ins(1,2,3,4,5,6)P<sub>6</sub> (ácido fítico) se abrevia PA.

Según la base de datos de nomenclatura enzimática ExPASy (un repositorio de información relativo a la nomenclatura enzimática principalmente basada en las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) que describe cada tipo de enzima caracterizada para el cual se ha provisto un número EC (Comisión de Enzimas)), dos diferentes tipos de fitasas son conocidos: una denominada 3-fitasa (mio-inositol hexafosfato 3-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.8) y una denominada 6-fitasa (mio-inositol hexafosfato 6-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.26). La 3-fitasa hidroliza primero el enlace estérico en la posición 3, mientras que la 6-fitasa hidroliza primero el enlace estérico en la posición 6.

## *Nomenclatura de inositolfosfato*

Considerando los productos de hidrólisis primaria de una fitasa que actúa en ácido fítico, algunos de los ésteres resultantes son diastereómeros y algunos son enantiómeros. Generalmente, es más fácil discriminar entre diastereómeros, puesto que tienen propiedades físicas diferentes, mientras que es mucho más difícil discriminar entre enantiómeros que son imágenes especulares el uno del otro.

Así, Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> (3-fosfato eliminado) y Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> (6-fosfato eliminado) son diastereómeros y fáciles de discriminar, mientras que Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> (3-fosfato eliminado) y Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> (1-fosfato eliminado) son enantiómeros. Lo mismo se mantiene para el par Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> (6-fosfato eliminado) y Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub> (4-fosfato eliminado). Por consiguiente, de los 6 ésteres penta-fosfato que resultan de la primera fase de la hidrólisis catalizada de la fitasa de ácido fítico, usted sólo puede discriminar fácilmente entre estos ésteres en los que el 2, 3, 5 y 6-fosfato ha sido eliminado, es decir si usted tiene sólo cuatro diastereómeros, cada uno de los dos ésteres restantes son un enantiómero de sendos compuestos (4 y 6 son enantiómeros, como son 1 y 3).

## *Uso de regla de localizador mínimo*

Debe ser notado aquí, que cuando se usan las notaciones Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> y Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub>, se aplica una relajación de las recomendaciones precedentes en la numeración de los átomos de mio-inositol. Esta relajación de la regla de localizador mínimo es recomendada por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica (Biochem. J. (1989) 258: 1-2) siempre que los autores deseen publicar relaciones estructurales.

En esta regla de localizador mínimo, la nomenclatura L y D es recomendada: Inositolfosfato, ésteres de fosfato de mio-inositol, son generalmente designados 1D- (o 1L-) -Ins(r,s,t,u,w,x)P<sub>n</sub>, n indicando el número de grupos fosfato y los localizadores r,s,t,u,w y x, sus posiciones. Las posiciones son numeradas según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica (NC-IUB) citado arriba (y las referencias aquí), y 1D o 1L se usan para hacer que un sustituyente tenga un localizador o número lo menor posible ("regla del localizador mínimo"). Por consiguiente,

1L-mio-inositol-1-fosfato (1L-Ins(1)P, un producto intermedio en la biosíntesis de inositol) y 1D-mio-inositol-1-fosfato (1DIns(1)P, un componente de fosfolípidos), son numerados como aparece en la Fig. 38.

#### *Especificidad de fitasa*

Como se ha dicho arriba, las fitasas son divididas según su especificidad en la fase de hidrólisis inicial, es decir, según a qué grupo éster fosfato se hidroliza primero.

En cuanto a la especificidad de las fitasas conocidas, se dice generalmente que las fitasas vegetales son 6-fitatas. No obstante la fitasa de polen de Lilly se dice que es una 5-fitasa. Las fitasas derivadas del microorganismo suelen ser principalmente 3-fitatas. P. ej. la base de datos ExPASy mencionada arriba se refiere a 3-fitatas a cuatro fitasas de *Aspergillus awamori* (cepa ALK0243) y *Aspergillus niger* (cepa NRRL 3135) (Gene 133:55-62 (1993) y Gene 127:87-94 (1993)).

Usando ahora la notación D/L (en que la configuración D- y -L se refieren a la 1-posición), la fitasa de salvado de trigo hidroliza primero el grupo éster fosfato en la posición L-6, mientras que las 3-fitatas hidrolizan primero el grupo éster fosfato en la posición D-3.

La especificidad puede ser examinada en diferentes vías, p. ej por HPLC o por espectroscopia de RMN. Estos métodos, no obstante, no permiten inmediatamente la discriminación entre hidrólisis de p. ej. los grupos éster fosfato en las posiciones D-6 y L-6, puesto que los productos de la hidrólisis, D-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> y L-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>, son enantiómeros (ímágenes de espejo), y en consecuencia tienen espectros de RMN idénticos.

En otras palabras, en el contexto presente una 6-fitasa significa cualquiera de una fitasa L-6 o una D-6 o ambas, es decir, una fitasa que es una L-6-fitasa, una D-6-fitasa o una ((D-6-)+(L-6-))-fitasa (con ambas actividades). Esta última también se designa a veces D/L-6-fitasa.

#### **Resumen de la invención**

Es un objeto de la presente invención proporcionar fitasas alternativas, en particular con propiedades superiores tales como estabilidad aumentada por calor o liberación más rápida de fosfato de fitato, y que pueden ser producidas en cantidades comercialmente útiles.

Los inventores presentes han encontrado sorprendentemente una sub-familia entera de fitasas fúngicas de propiedades interesantes. Esta sub-familia de fitasas está caracterizada por el hecho de que tiene un alto grado de regiones conservadas o secuencias parciales en común (secuencias consenso). Representantes de esta sub-familia han resultado ser ventajosos en comparación con las fitasas conocidas en lo que se refiere a varias propiedades enzimáticas, tales como p. ej. especificidad de posición y actividad específica.

Está actualmente contemplado que las secuencias de consenso de fitasa de la presente invención son comunes para todas las fitasas de basidiomicetos.

En el contexto presente un basidiomiceto significa un microorganismo del filo Basidiomycota. Este filo de Basidiomycota está comprendido en el reino fúngico junto con p. ej. el filo Ascomycota ("ascomycetes"). Se puede hacer referencia a Jülich, 1981, Higher Taxa of Basidiomycetes; Ainsworth & Bisby, 1995, Dictionary of the Fungi; Hansen & Knudsen (Eds.), Nordic Macromycetes, vol. 2 (1992) y 3 (1997). De forma alternativa, una base de datos de taxonomía fúngica (base de datos NIH (Entrez)) está disponible por medio de Internet en la web en la dirección siguiente: <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/tax.html>.

Un método de selección para este tipo de fitasas que usan PCR está también dado, como por ejemplo procedimientos generales para aislar y purificar esta enzima fitasa usando la tecnología del ADN recombinante.

En un primer aspecto, un polipéptido aislado con actividad fitasa y que está derivado del filo Basidiomycota está descrito.

En un segundo aspecto, un polipéptido aislado con actividad fitasa y que comprende al menos una de diferentes secuencias consenso está descrito.

En un tercer aspecto, un polipéptido aislado con actividad fitasa y que está codificado por una secuencia de ADN que se hibrida bajo astringencia media a alta con el producto de una reacción PCR usando un conjunto adecuado de cebadores derivados de alineamientos descritos aquí y una secuencia meta, p. ej. una biblioteca de ADN está descrito.

En un cuarto aspecto, un polipéptido aislado con actividad 6-fitasa y que está derivado de un hongo está descrito.

En un quinto aspecto, los polipéptidos aislados con actividad fitasa y que son homólogos a cinco secuencias específicas están descritos.

# ES 2 323 440 T3

En otros aspectos, secuencias de ADN clonadas que codifican los polipéptidos anteriores, al igual que vectores y células huéspedes que comprenden estas secuencias de ADN clonadas están descritas.

El uso de la fitasa de la invención para liberar fosfato inorgánico de ácido fítico, al igual que algunos usos, y 5 composiciones, más específicos, en particular preparaciones y aditivos alimentarios y de piensos que comprenden la fitasa de la invención están también descritos.

Generalmente, términos y expresiones según se utilizan en este caso deben ser interpretados como es usual en la 10 técnica. En casos de duda, no obstante, las definiciones de la presente descripción pueden ser útiles.

## 10 **Definiciones generales**

Por la expresión “un polipéptido/enzima *aislado* que tiene/presenta actividad fitasa” o “una fitasa *aislada*” se entiende cualquier péptido o proteína con actividad fitasa (véase abajo) y que está esencialmente libre de otros polipéptidos sin fitasa, p. ej., al menos aproximadamente con un 20% de pureza, preferiblemente al menos aproximadamente 15 un 40% de pureza, más preferiblemente aproximadamente un 60% de pureza, incluso más preferiblemente aproximadamente un 80% de pureza, de la forma más preferible aproximadamente un 90% de pureza, e incluso de la forma más preferible aproximadamente un 95% de pureza, según está determinado por SDS-PAGE. A veces tal polipéptido es referido de forma alternativa como una fitasa “purificada”.

La definición de “un polipéptido aislado” también incluye polipéptidos fusionados o polipéptidos divisibles de fusión donde otro polipéptido es fusionado en el N-término o el C-término del polipéptido o fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado es producido por fusión de una secuencia de ácidos nucleicos (o una parte de la misma) que codifica otro polipéptido a una secuencia de ácidos nucleicos (o una parte de la misma) de la presente invención. Las 20 técnicas para producir polipéptidos de fusión son conocidos en la técnica, e incluyen, ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que éstas estén en marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo control del(s) mismo(s) promotor(es) y terminador.

La expresión “polipéptido o enzima *que presenta actividad fitasa*” o “fitasa” se destina a cubrir cualquier enzima 30 capaz de efectuar la liberación de fosfato inorgánico o fósforo de varios fosfatos de mio-inositol. Ejemplos de tales fosfatos de mio-inositol (sustratos de fitasa) son ácido fítico y cualquier sal derivada, p. ej. fitato de sodio o fitato de potasio o sales mezcladas. También cualquier estereoisómero del mono-, di-, tri-, tetra o penta-fosfatos de mio-inositol puede servir como un sustrato de fitasa.

Conforme a la definición arriba, la actividad fitasa puede ser determinada usando cualquier ensayo donde se usa uno 35 de estos sustratos. En el contexto presente (a menos que se especifique lo contrario) la actividad fitasa es determinada en la unidad de FYT, una FYT siendo la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ortofosfato inorgánico por min. bajo las condiciones siguientes: pH 5.5, temperatura 37°C; sustrato: fitato de sodio ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_{24}\text{P}_6\text{Na}_{12}$ ) en una concentración de 0,0050 mol/L. Ensayos de fitasa adecuados están descritos en la parte experimental.

“Homología de polipéptidos” u “homología de aminoácidos” se determina como el grado de identidad entre dos secuencias. La homología puede de manera adecuada ser determinada mediante programas informáticos conocidos en la técnica tales como GAP proporcionado en el paquete del programa GCG versión 8 (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) 40 (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453). Usando GAP con los ajustes siguientes para comparación de la secuencia polipeptídica: penalización por creación de GAP de 5.0 y penalización por extensión de GAP de 0.3.

En el contexto presente una “6-fitasa” significa una fitasa que hidroliza primero la posición 6 en ácido fítico o tiene 50 una preferencia para estas posiciones (se usa el plural puesto que este término cubre dos posiciones). En particular, más del 50% del producto de hidrólisis de la primera fase es Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> y/o Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub>. Preferiblemente estos dos compuestos comprenden al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 70%, además más preferiblemente al menos un 80%, especialmente al menos un 90% y lo más preferido más del 95% del producto de la fase de hidrólisis inicial de PA.

Los otros términos de especificidad tales como p. ej. “3-fitasa”, “(3+6)-fitasa” “6D-fitasa” y “6L-fitasa” deben ser 55 interpretados correspondientemente, incluyendo las mismas formas de realización preferidas.

Los términos “una parte codificante de la fitasa de una secuencia de ADN clonada en un plásmido presente en una 60 cepa de *E. coli* depositada” y “una parte codificante de la fitasa de la secuencia de ADN correspondiente presentada en el listado de secuencias” se consideran actualmente idénticos, y por consiguiente pueden ser usados de forma intercambiable.

Principalmente, el término “una parte codificante de la fitasa” usado en conexión con una secuencia de ADN 65 significa la región de la secuencia de ADN que es traducida en una secuencia polipeptídica con actividad fitasa. Frecuentemente ésta es la región entre un primer codón de iniciación “ATG” (codón “AUG” en ARNm) y un codón de detención (“TAA”, “TAG” o “TGA”) primero para seguir.

## ES 2 323 440 T3

No obstante, el polipéptido traducido como se ha descrito anteriormente comprende, además de una secuencia madura que presenta actividad fitasa, una secuencia señal N-terminal y/o una secuencia pro-peptídica. Generalmente, la secuencia señal guía la secreción del polipéptido y el pro-peptíodo guía el doblamiento del polipéptido.

5 Para más información véase Egnell, P. et al. Molecular Microbiol. 6(9):1115-19 (1992) o Stryer, L., "Biochemistry" W.H., Freeman and Company/New York, ISBN 0-7167-1920-7. En consecuencia, el término "parte codificante de la fitasa" está también destinado a cubrir la secuencia de ADN correspondiente a la parte madura del polipéptido traducido o a cada una de estas partes maduras, si existen varias.

10 Además, cualquier fragmento de tal secuencia que codifica un fragmento de polipéptido, que además retiene cierta actividad fitasa, debe ser incluido en esta definición.

Una molécula de ADN aislada o, de forma alternativa, una "secuencia de ADN clonada" "un constructo de ADN", "un segmento de ADN" o "una secuencia de ADN aislada" se refiere a una molécula de ADN o secuencia que puede ser clonada conforme a procedimientos de clonación estándares usados en ingeniería genética para recolocar el segmento 15 de ADN desde su ubicación natural a un sitio diferente donde será replicado. El término se refiere generalmente a una secuencia de ácidos nucleicos que está esencialmente libre de otras secuencias de ácidos nucleicos, p. ej., al menos aproximadamente con un 20% de pureza, preferiblemente al menos aproximadamente un 40% de pureza, más preferiblemente aproximadamente un 60% de pureza, incluso más preferiblemente aproximadamente un 80% de pureza, de la forma más preferible aproximadamente un 90% de pureza e incluso de la forma más preferible aproximadamente 20 un 95% de pureza, según ha sido determinado por electroforesis en gel de agarosa. Los procedimientos de clonación pueden implicar escisión y aislamiento de un fragmento de ácido nucleico deseado que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido, inserción del fragmento en una molécula del vector, e incorporación del vector recombinante en una célula huésped donde múltiples copias o clones de la secuencia de ácidos nucleicos serán 25 replicados. La secuencia de ácidos nucleicos puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

El grado de identidad u "homología" entre dos secuencias de ácidos nucleicos puede ser determinado mediante programas informáticos conocidos en la técnica tal como GAP proporcionado en el paquete del programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1996, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, 30 Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453). Usando GAP con los ajustes siguientes para comparación de secuencias de ADN: penalización por creación de GAP de 5.0 y penalización por extensión de GAP de 0.3.

Condiciones adecuadas experimentales para determinar si una secuencia de ADN o ARN dada "hibrida" a un 35 nucleótido específico o sonda de oligonucleótidos implican poner en prerremojo el filtro que contiene los fragmentos de ADN o ARN para examinar la hibridación en 5 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico), (J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York) durante 10 min, y prehibridar el filtro en una solución de 5 x SSC, 5 x Solución de Denhardt (Sambrook et al. 1989), 0,5% SDS 40 y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y someterlo a un baño de ultrasonidos (Sambrook et al. 1989), seguido de hibridación en la misma solución que contiene una concentración de 10 ng/ml de una sonda cebada aleatoriamente (Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983) Anal. Biochem. 132:6-13), marcada en <sup>32</sup>P-dCTP (actividad específica > 1 x 10<sup>9</sup> cpm/µg) durante 12 horas a aproximadamente 45°C.

45 El filtro es después lavado dos veces durante 30 minutos en 2 x SSC, 0,5% SDS a al menos 55°C (astringencia baja), a al menos 60°C (astringencia media), a al menos 65°C (astringencia media/alta), a al menos 70°C (astringencia alta), o a al menos 75°C (astringencia muy alta).

Las moléculas a las que la sonda de oligonucleótidos se hibrida bajo estas condiciones son detectadas usando una 50 película de rayos x.

Se ha descubierto que es posible teóricamente predecir si dos secuencias de ADN dadas se hibridarán o no bajo determinadas condiciones específicas.

Por consiguiente, como una alternativa al método experimental descrito anteriormente la determinación de si 55 una secuencia de ADN análoga se hibridará o no a la sonda de nucleótidos anteriormente descrita, se puede basar en un cálculo teórico de la Tm (temperatura de fusión) en la que dos secuencias de ADN heterólogas con secuencias conocidas se hibridarán bajo condiciones específicas (p. ej. con respecto a la concentración catiónica y temperatura).

60 Para determinar la temperatura de fusión para las secuencias de ADN heterólogas (Tm(hetero)) es preciso primero determinar la temperatura de fusión (Tm(homo)) para las secuencias de ADN homólogas.

La temperatura de fusión (Tm(homo)) entre dos cadenas de ADN completamente complementarias (formación de 65 homodúplex) puede ser determinada usando la fórmula siguiente,

$$Tm(homo) = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% form) - 500/L$$

## ES 2 323 440 T3

(“Current protocols in Molecular Biology”. John Wiley and Sons, 1995), donde

“M” se refiere a la concentración molar de cationes en el tampón de lavado,

5 “% GC” % guanina (G) y citosina (C) del número total de bases en la secuencia de ADN,

“% form” % formamida en el tampón de lavado, y

10 “L” longitud de la secuencia de ADN.

La Tm determinada por la fórmula anterior es la Tm de una formación de homoduplex (Tm(homo)) entre dos secuencias de ADN completamente complementarias. Para adaptar el valor de Tm a aquel de dos secuencias de ADN heterólogas, se asume que una diferencia del 1% en la secuencia de nucleótidos entre las dos secuencias heterólogas es igual a una reducción de 1°C en la Tm (“Current protocols in Molecular Biology”. John Wiley and Sons, 1995). En consecuencia, la Tm(hetero) para la formación de heteroduplex es hallada restando la diferencia en% de homología entre la secuencia análoga en cuestión y la sonda de nucleótidos anteriormente descrita de la Tm(homo). El porcentaje de homología de ADN que debe ser restado es calculado como se describe en este caso (véase supra).

20 El término “vector” se destina a incluir términos/objetos tales como “constructos de ácidos nucleicos”, “constructos de ADN”, “vectores de expresión” o “vectores recombinantes”.

El constructo de ácidos nucleicos comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención operativamente enlazada a una o más secuencias de control capaz de dirigir la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

30 “Constructo de ácidos nucleicos” se define aquí como una molécula de ácido nucleico, bien mono o bicatenaria, que está aislada de un gen de origen natural o que ha sido modificada para contener segmentos de ácido nucleico que son combinados y superpuestos en cierto modo que de lo contrario no existirían en la naturaleza.

35 El término constructo de ácidos nucleicos puede ser sinónimo del término cassette de expresión cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene todas las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

El término “secuencia codificante” tal y como se define aquí principalmente comprende una secuencia que es transcrita en ARNm y traducida en un polipéptido de la presente invención colocado bajo el control de las secuencias de control anteriormente mencionadas. Los bordes de la secuencia codificante son generalmente determinados por un codón ATG de iniciación de la traducción en el 5'-terminal y un codón de detención de la traducción en el 3'-terminal.

40 Una secuencia codificante puede incluir, pero no está limitada a, ADN, ADNc, y secuencias de ácidos nucleicos recombinantes.

45 El término “secuencias de control” es definido aquí para incluir todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de la secuencia codificante de la secuencia de ácidos nucleicos. Cada secuencia de control puede ser nativa o exterior a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, una secuencia líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia del propéptido, un promotor, una secuencia señal, y un terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden ser provistas de enlazadores para la introducción de sitios de restricción específicos que facilitan la ligadura de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido.

55 En el vector de expresión, la secuencia de ADN que codifica la fitasa debería ser operativamente conectada a una secuencia del promotor y del terminador adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede ser derivado de genes que codifican proteínas que son bien homólogas o heterólogas a la célula huésped. Los procedimientos usados para enlazar las secuencias de ADN que codifican para la fitasa, el promotor y el terminador y para insertarlas en vectores adecuados son conocidos por los expertos en la técnica (véase p. ej. Sambrook *et al.*, (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY).

60 El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus) que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos.

Más de una copia de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de la presente invención puede 65 ser insertada en la célula huésped para amplificar la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. Una amplificación estable de la secuencia de ácidos nucleicos puede ser obtenida integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped usando métodos bien conocidos en la técnica y seleccionando transformantes.

## ES 2 323 440 T3

Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son conocidos por un experto en la técnica (véase, p. ej., Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

5 Una “célula huésped” o “célula huésped recombinante” comprende cualquier progenie de una célula madre que no es idéntica a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

La célula es preferiblemente transformada con un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la invención seguida de la integración del vector en el cromosoma huésped.

10 “Transformación” significa introducir un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped de modo que el vector sea mantenido como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante. La integración está generalmente considerada como una ventaja puesto que la secuencia de ácidos nucleicos es más probable que sea mantenida estable en la célula. La integración del vector en el cromosoma huésped puede ocurrir por recombinación homóloga o no homóloga como se ha descrito anteriormente.

15 La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, p. ej., un procariota, o un microorganismo no unicelular, p. ej., un eucariota. Ejemplos de una célula eucariota es una célula mamífera, una célula de insecto, una célula vegetal o una célula fúngica. Células mamíferas útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células He-  
20 La, células de riñón de cría de hámster (BHK), células COS, o cualquier otro número de líneas celulares disponibles inmortalizadas, p. ej., de la Colección Americana de Cultivos Tipo.

25 En una forma de realización preferida, la célula huésped es una célula fúngica. “Fungi” como se utiliza en este caso incluye los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, y Zygomycota (como está definido por Hawksworth *et al.*, en, Ainsworth and Bisby’s Dictionary of The Fungi, 8<sup>a</sup> edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) al igual que el Oomycota (como está citado en Hawksworth *et al.*, 1995, *supra* página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*).

30 Las células micóticas pueden ser transformadas por un proceso que implica formación de protoplastos, transformación de los protoplastos, y regeneración de la pared celular en cierto modo conocido *per se*.

35 La presente invención también se refiere a una planta transgénica o parte de la planta, tal como una semilla de planta, o célula vegetal según está reivindicado. También las composiciones y usos de esta planta o parte de la planta están dentro del campo de la invención, especialmente su uso como piensos y alimentos o aditivos para los mismos, del principio al final del presente uso y reivindicaciones de alimentos/pienso.

40 La planta transgénica puede ser dicotiledónea o monocotiledónea, para abreviar una dicot o una monocot. Son de interés primario aquellas plantas que son componentes potenciales de alimentos o de piensos y que comprenden ácido fítico. Un nivel normal de ácido fítico de componentes alimentarios es 0,1-100 g/kg, o más habitualmente 0,5-50 g/kg, de la forma más habitual 0,5-20 g/kg. Ejemplos de plantas monocot son hierbas gramíneas, tales como poa de los prados (césped azul, Poa), pasto de forraje tal como festuca, lolio, césped templado, tal como agrostis, y cereales, p. ej. trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz (grano).

45 Ejemplos de plantas dicot son legumbres, tales como altramueses, guisante, judía y semilla de soja, y crucíferas (familia de Brassicaceae), tales como coliflor, planta de colza y el organismo prototípico muy relacionado *Arabidopsis thaliana*.

50 Tal planta transgénica etc. es capaz de degradar su propio ácido fítico, y por consiguiente se alivia la necesidad de añadir tales enzimas a los alimentos o piensos que comprenden tales plantas. Preferiblemente, la planta o parte de la planta, p. ej. las semillas, son molidas o trituradas, y posiblemente también mojadas antes de ser añadidas a los alimentos o piensos o antes del uso, p. ej. ingesta, de la misma, con el propósito de adaptar la velocidad de la degradación enzimática al uso real.

55 Si se desea, la enzima producida por la planta puede también ser recuperada de la planta. En ciertos casos la recuperación de la planta debe ser preferida con el propósito de asegurar una formulación estable al calor en un proceso de granulación potencial ulterior.

Ejemplos de partes de la planta son el tallo, callo, hojas, raíz, frutas, semillas, tubérculos etc. pero también cualquier tejido vegetal está incluido en esta definición.

60 Cualquier célula vegetal, cualquier el origen del tejido, está incluido en la definición de células vegetales anterior.

También incluidas dentro del campo de la invención están la progenie de tales plantas, partes de la planta y células vegetales.

65 El experto sabrá cómo construir un constructo de expresión de ADN para inserción en la planta en cuestión, prestando atención, entre otras cosas, a si la enzima debería ser excretada en una vía específica del tejido. De relevancia para esta evaluación es la estabilidad (estabilidad del pH, degradabilidad por proteasas endógenas etc.) de la fitasa en

## ES 2 323 440 T3

los compartimientos de expresión de la planta. También será capaz de seleccionar secuencias apropiadas reguladoras tales como secuencias del promotor y del terminador, y secuencias señal o de tránsito si fuera necesario (Tague *et al.*, Plant, Phys., 86, 506, 1988).

- 5 La planta, parte de la planta etc. puede ser transformada con este constructo de ADN usando cualquier método conocido. Un ejemplo de tal método es la transformación por un vector vírico o bacteriano tal como especies bacterianas del género *Agrobacterium* creado genéticamente para comprender el gen que codifica la fitasa de la invención. También métodos de introducción directamente del ADN de la fitasa en la célula vegetal o tejido vegetal son conocidos en la técnica, p. ej. microinyección y electroporación (Gasser *et al.*, Science, 244, 1293; Potrykus, Bio/Techn. 8, 535, 10 Shimamoto *et al.*, Nature, 338, 274, 1989).

Después de la transformación, los transformantes son seleccionados usando cualquier método conocido por el experto, tras lo cual son regenerados en plantas enteras.

- 15 Estas plantas etc. al igual que su progenie llevan entonces el ADN que codifica la fitasa como una parte de su equipamiento genético.

En general, se hace referencia a WO 9114782A y WO 9114772A.

- 20 La transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método de elección para generar dicots transgénicas (para revisión Hooykas & Schilperoort, 1992. Plant Mol. Biol. 19: 15-38). Debido a las limitaciones de la gama de huéspedes generalmente no es posible transformar monocots con la ayuda de *A. tumefaciens*. Aquí, otros métodos deben ser empleados. El método de elección para generar monocots transgénicas es el bombardeo de partículas (oro microscópico o partículas de tungsteno revestidas con el ADN transformante) de callos embrionarios o 25 embriones en desarrollo (Christou, 1992. Plant J. 2: 275-281; Shimamoto, 1994. Curr. Opin. Biotechnol. 5: 158-162; Vasil *et al.*, 1992. Bio/Technology 10: 667-674).

- También otros sistemas para la entrega de ADN libre en estas plantas, incluyendo vectores víricos (Joshi & Joshi, 1991. FEBS Lett. 281: 1-8), transformación de protoplastos vía polietilenglicol o electroporación (para revisión véase 30 Potrykus, 1991. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 205-225), microinyección de ADN en protoplastos del mesofilo (Crossway *et al.*, 1986. Mol. Gen. Genet. 202: 79-85), y macroinyección de ADN en brotes florales jóvenes de plantas de cereales (de la Pena *et al.*, 1987. Nature 325: 274-276) son métodos preferidos.

- 35 En general, el ADNc o gen que codifica la fitasa de la invención es colocado en un cassette de expresión (p. ej. Pietrzak *et al.*, 1986. Nucleic Acids Res. 14: 5857-5868) que consisten en un promotor adecuado activo en la planta meta y un terminador adecuado (terminación de la transcripción). Este casete (por supuesto incluyendo un marcador de selección adecuado, véase abajo) estará transformado en la planta como tal en caso de monocots por medio de bombardeo de partículas. En caso de dicots el cassette de expresión es colocado primero en un vector adecuado suministrando los bordes de T-ADN y un marcador de selección adecuado que a su vez son transformados en 40 *Agrobacterium tumefaciens*. Las dicots serán transformadas vía el Agrobacterium que alberga el cassette de expresión y el marcador de selección flanqueado por T-ADN según los protocolos estándares (p. ej. Akama *et al.*, 1992. Plant Cell Reports 12: 7-11). La transferencia de T-ADN de Agrobacterium a la célula vegetal ha sido recientemente revisada (Zúpan & Zambryska, 1995. Plant Physiol. 107: 1041-1047). Vectores para la transformación de plantas por medio de Agrobacterium están comercialmente disponibles o pueden ser obtenidos de muchos laboratorios que construyen este 45 tipo vectores (p. ej. Deblaere *et al.*, 1985. Nucleic Acids Res. 13: 4777-4788; para revisión véase Klee *et al.*, 1987. Annu. Rev. Plant Physiol. 38: 467-486).

- Promotores de plantas disponibles: dependiendo del proceso bajo manipulación, la expresión específica del órgano y/o de la célula al igual que un control desarrollable y medioambiental apropiado puede ser requerido. Por ejemplo, 50 es deseable expresar un ADNc de fitasa en endosperma de maíz etc. El promotor más frecuentemente usado ha sido el promotor constitutivo 35S- CaMV Franck *et al.*, 1980. Cell 21: 285-294). La expresión será más o menos igual en toda la planta. Este promotor ha sido usado exitosamente para crear genéticamente plantas resistentes a los herbicidas y patógenos (para revisión véase Stitt & Sonnewald, 1995. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46: 341-368). Promotores específicos de órganos han sido proporcionados para tejidos sumidero de almacenamiento tales como 55 semillas, tubérculos de patata, y frutas (Edwards & Coruzzi, 1990. Annu. Rev. Genet. 24: 275-303), y para tejidos sumidero metabólicos tales como meristemas (Ito *et al.*, 1994. Plant Mol. Biol. 24: 863-878).

- El medio usado para cultivar las células huéspedes transformadas puede ser cualquier medio convencional adecuado para desarrollar las células huéspedes en cuestión. La fitasa expresada puede convenientemente ser segregada en el 60 medio de cultivo y puede ser recuperada de la misma por procedimientos bien conocidos incluyendo la separación de las células del medio por centrifugado o filtración, precipitación de componentes proteináceos del medio mediante una sal tal como sulfato de amonio, seguido de procedimientos cromatográficos tal como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, o similar.

- 65 Células huéspedes preferidas son una cepa de *Fusarium*, *Trichoderma* o *Aspergillus*, en particular una cepa de *Fusarium graminearum*, *Fusarium venenatum*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium sp.* que tiene la característica de identificación de *Fusarium* ATCC 20334, como se describe adicionalmente en PCT/US/95/07743, *Trichoderma harzianum* o *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.

**Breve descripción de los dibujos**

En la descripción detallada de la invención abajo, se hace referencia a los dibujos, de los cuales

5 fig. 1 es la secuencia de nucleótidos del ADNc de *phyA* y la estructura deducida primaria de fitasa PHYA de *Peniophora lycii* (el péptido señal está encuadrado y los sitios de restricción usados para clonación de ADNc son subrayados);

10 fig. 2 es la secuencia de nucleótidos de una fitasa de *Agrocybe pediades*, como en la Fig. 1;

15 fig. 3 es la secuencia de nucleótidos de una primera fitasa, PHYA1, de *Paxillus involutus*, como en la Fig. 1, salvo por el recuadro referente a la predicción SignalP V1.1 del péptido señal;

Fig. 4 es la secuencia de nucleótidos de una segunda fitasa, PHYA2, de *Paxillus involutus*, como en la Fig. 3;

15 fig. 5 es la secuencia de nucleótidos de una fitasa de *Trametes pubescens*, como en la Fig. 3;

Fig. 6 es un alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de las fitasas codificadas de las figs. 1-5, los residuos idénticos en al menos tres de las secuencias estando indicados por un recuadro gris;

20 Fig. 7 es un alineamiento de las cinco fitasas de Fig. 6 junto con cinco fitasas conocidas que todas pertenecen al filo fúngico de Ascomycota, los residuos idénticos en al menos siete de las secuencias estando indicados por un recuadro gris;

25 Fig. 8 es una curva de actividad de pH de fitasa de *Peniophora*;

Fig. 9 una curva de estabilidad de p de la misma;

Fig. 10 una curva de actividad de temperatura de la misma;

30 Fig. 11 una curva de estabilidad de temperatura de la misma;

Fig. 12 una curva de calorimetría de barrido diferencial (DSC) de la misma;

35 Figs. 13-14 espectros de RMN, gráficos en cascada (hasta 24h), mostrando el perfil de producto de una *Aspergillus niger* y la fitasa de *Peniophora*, respectivamente;

Figs. 15-16 espectros de RMN como arriba, pero gráficos en cascada hasta 4.5 h;

40 figs. 17-19 perfiles de RMN observados después de 20 minutos (a pH 5.5), 24 horas (a pH 5.5) y 20 minutos (a pH 3.5), respectivamente;

Fig. 20 curvas que muestran concentración contra tiempo de Ins(1,2)P<sub>2</sub> e Ins(2)P, respectivamente;

45 Fig. 21-22 curvas que muestran la liberación de fosfato inorgánico versus tiempo del maíz a pH 5.5 y pH 3.5, respectivamente;

Fig. 23 es una curva de actividad de pH de fitasa de *Agrocybe*;

Fig. 24 una curva de estabilidad de pH de la misma;

50 Fig. 25 una curva de actividad de temperatura de la misma;

Fig. 26 una curva de estabilidad de temperatura de la misma;

55 Fig. 27 una curva de calorimetría de barrido diferencial (DSC) de la misma;

Figs. 28-29 espectros de RMN, gráficos en cascada (hasta 24 h), mostrando el perfil de producto de un *Aspergillus niger* y la fitasa de *Agrocybe*, respectivamente;

Figs. 30-31 espectros de RMN, como arriba, pero gráficos en cascada hasta 4.5 h;

60 Fig. 32-33 perfiles de RMN observados después de 20 minutos y 24 horas, respectivamente;

Figs. 34-35 curvas que muestran concentración contra tiempo de Ins(1,2)P<sub>2</sub> y Ins(2)P, respectivamente;

65 Figs. 36-37 curvas que muestran la liberación de fosfato inorgánico versus tiempo del maíz a pH 5.5 y pH 3.5, respectivamente; y

Fig. 38 la estructura de 1D- y 1L-mio-inositol-1-fosfato (P = -OPO<sub>3</sub><sup>-2</sup>).

# ES 2 323 440 T3

## Deposiciones

5 Aislados de las cepas de *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Paxillus involutus*, y *Trametes pubescens* de los cuales se obtuvieron las fitasas de la invención han sido depositados según el tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los fines de Procedimiento en materia de Patentes en el Centraalbureau voor Schimmel-cultures, P.O. Box 273, 3740 AG Baarn, Holanda, (CBS), como sigue:

	Fecha de depósito:	4 de diciembre 1996
10	Ref. del depositante:	NN006113
	CBS No.:	<i>Peniophora lycii</i> CBS nº. 686.96
15	Fecha de depósito:	4 de diciembre de 1996
	Ref. del depositante:	NN009289
20	CBS No.:	<i>Agrocybe pediades</i> CBS nº. 900.96
	Fecha de depósito:	28 de Noviembre de 1997
25	Ref. del depositante:	NN005693
	CBS No.:	<i>Paxillus involutus</i> CBS nº. 100231
30	Fecha de depósito:	28 de Noviembre de 1997
	Ref. del depositante:	NN009343
	CBS No.:	<i>Trametes pubescens</i> CBS nº. 100232
35	Además, los plásmidos de expresión (vector trasportador) pYES 2.0 que comprenden la longitud total de las secuencias de ADNc que codifican estas fitasas de la invención han sido transformadas en cepas de <i>Escherichia coli</i> que fueron depositadas según el tratado de Budapest en la Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los fines de Procedimiento en materia de Patentes en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH., Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig,, Alemania, (DSM), como sigue, respectivamente	
40	(dos fitasas de <i>Paxillus involutus</i> ):	
	Fecha de depósito:	2 de diciembre de 1996
	Ref. del depositante:	NN 049282
45	DSM No.:	<i>Escherichia coli</i> DSM nº. 11312
	Fecha de depósito:	2 de diciembre de 1996
50	Ref. del depositante:	NN 049283
	DSM No.:	<i>Escherichia coli</i> DSM nº. 11313
55	Fecha de depósito:	12 de Noviembre de 1997
	Ref. del depositante:	NN 049342
60	DSM No.:	<i>Escherichia coli</i> DSM nº. 11842
	Fecha de depósito:	12 de Noviembre de 1997
65	Ref. del depositante:	NN 049343
	DSM No.:	<i>Escherichia coli</i> DSM nº. 11843

# ES 2 323 440 T3

Fecha de depósito: 12 de Noviembre de 1997  
Ref. del depositante: NN 049344  
5 DSM No.: *Escherichia coli* DSM nº. 11844

## Descripción detallada de la invención

10 Las fitas de la invención derivadas de basidiomicetos son preferiblemente derivadas de las clases *Gasteromycetes*, *Hymenomycetes*, *Urediniomycetes*, *Ustilaginomycetes* o de *Basidiomycota* sin clasificar, más preferiblemente de la clase *Hymenomycetes*.

15 Las fitas derivadas de la clase *Hymenomycetes* son preferiblemente derivadas de cepas de los tipos *Agaricales*, *Aphyllophorales*, *Auriculariales*, *Boletales*, *Cantharellales*, *Ceratobasidiales*, *Dacrymycetales*, *Echinodontiaceae*, *Hericiales*, *Stereales*, *Thelephorales*, *Tremellales*, *Tulasnellales* o de la clase de *Hymenomycetes mitospóricas*.

Otros tipos preferidos son *Coriolales*, *Hyphodermatales*, *Schizophyllales*, *Hymenochaetales* y *Phanerochaetales*.

20 Más abajo, familias preferidas de algunos de estos tipos están catalogados, y ejemplos de géneros preferidos dentro de cada familia son agregados en paréntesis detrás de cada familia.

25 Familias preferidas del tipo *Aphyllophorales* son *Polyporaceae* (p. ej. género *Trametes*, *Bjerkandera*, *Irpea*, *Oxyporus*, *Trichaptum*, *Daedalea*, *Forres*), *Coniophoraceae* (p. ej. género *Coniophora*), *Corticaceae* (p. ej. género *Hypoderma*, *Trechispora*, *Steccherinum*, *Merulius*, *Peniophora*), *Schizophyllaceae* (p. ej. género *Schizophyllum*).

30 Familias preferidas del tipo *Agaricales* son *Bolbitiaceae* (p. ej. género *Agrocybe*, *Conocybe*, *Bolbitius*), *Coprinaceae* (p. ej. género *Coprinus*, *Panaeolus*), *Pluteaceae* (p. ej. género *Volvariella*), *Podaxaceae* (p. ej. género *Podaxis*), *Tricholomataceae* (p. ej. género *Marasmiellus*, *Strobilurus*, *Lyophyllum*, *Cystoderma*, *Merismodes*), *Strophariaceae* (p. ej. género *Stropharia*, *Hypholoma*).

Una familia preferida del tipo *Auriculariales* es *Exidiaceae* (p. ej. género *Exidia*).

Una familia preferida del tipo *Dacrymycetales* es *Dacrymycetaceae* (p. ej. género *Femsjonia*).

35 35 Familias preferidas del tipo *Stereales* son *Hyphodermataceae* (p. ej. género *Hyphodontia*) y *Stereaceae* (p. ej. género *Amylostereum* y *Stereum*).

Una familia preferida del tipo *Boletales* es *Paxillaceae* (p. ej. género *Paxillus* e *Hygrophoropsis*).

40 Una familia preferida del tipo *Thelephorales* es *Thelephoraceae* (p. ej. género *Typhula*).

Algunos ejemplos de cepas preferidas de los géneros arriba son *Stropharia cubensis* (en particular ATCC 13966), *Agrocybe pediades* (en particular CBS 900.96), *Bjerkandera adusta* (en particular CBS 580.95), *Trametes zonatella*, *Trametes pubescens* (en particular CBS 100232), *Paxillus involutus* (en particular CBS 100231), *Trametes hirsuta* (en particular DSM 2987), *Peniophora quercina*, *Hyphoderma argillaceum*, *Scizophyllum sp.* (en particular CBS 443.97), *Peniophora lycii* (en particular CBS 686.96), *Amylostereum chailletii*, *Oxyporus sp.* (en particular CBS 422.97). Ejemplos adicionales de cepas preferidas están catalogados en el Ejemplo 5, Tabla 6.

50 Las fitas tienen como mínimo una de 14 secuencias de aminoácidos parciales en común, las denominadas secuencias de consenso, que son introducidas en el listado de secuencias como SEC ID Nos: 1-14.

En el listado de secuencias, se usa el código de aminoácido de tres letras, y algunos de los aminoácidos son 55 denominados Xaa, que generalmente significa “cualquier aminoácido” interpretado como se hace más abajo. En el caso de algunas de estas posiciones de Xaa, no obstante, una nota es introducida en el listado de secuencias para el efecto de que por ejemplo X en posición NN significa cualquiera de dos aminoácidos, véase abajo.

En las reivindicaciones, el código de aminoácido de una letra se usa en estas secuencias, y “X” denota cualquier aminoácido incluyendo aquellos que no se originan naturalmente e incluyendo cualquier variante estructuralmente o funcionalmente similar de los mismos. Denotaciones como “[A/E]” significan cualquiera de los aminoácidos A y E. Por consiguiente, si en una secuencia parcial de una fórmula dada existen dos de estas opciones múltiples, el número de secuencias cubierto por la fórmula es  $2^2$ . Asimismo, si hay “N” de estas opciones múltiples en una fórmula dada, el número de secuencias cubierto por esta fórmula es  $2^N$ .

65 SEC ID Nos: 1 a 9 están catalogadas en el extremo N-terminal a C-terminal de los polipéptidos. SEC ID Nos: 10 a 14 son las secuencias de aminoácidos correspondientes a las sondas de PCR específicamente catalogadas en el Ejemplo 5 (es decir, correspondientes a los cebadores 522-sentido y 540-anti-sentido; 537-sentido; 538-sentido; 525-anti-sentido y 539-anti-sentido, respectivamente).

## ES 2 323 440 T3

En formas de realización preferidas, el polipéptido aislado comprende al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho nueve, diez, once, doce, trece o las catorce secuencias de SEC ID Nos: 1-14, preferiblemente en las posiciones indicadas en las reivindicaciones.

5 Los conjuntos de secuencias de aminoácidos reflejan los experimentos de PCR de los Ejemplos 5 y 6 (es decir, estos conjuntos de cebadores que están propuestos).

También algunas delecciones parecen ser características para esta sub-familia de fitasa. Algunas regiones de delecciones específicas están catalogadas.

10 Estas secuencias parciales han sido identificadas entre otras cosas basándose en el alineamiento mostrado en Fig. 7. En este alineamiento las cinco fitasas en la parte superior, es decir, phyA1\_ *P. involtus*, phyA2\_ *P. involtus*, phyA\_ *T. pubescens*, phyA\_ *A. pediades* y phyA\_ *P. lycii*, están todos derivados de basidiomicetos y han sido clonados como se proporciona en la sección experimental de la misma. Las cinco fitasas catalogadas en la parte inferior del alineamiento están todas derivadas de ascomicetos y sus secuencias son conocidas de la técnica anterior mencionada previamente. Hágase referencia al Ejemplo 4 de la presente para detalles adicionales y explicaciones con respecto a los alineamientos, y hágase referencia al Ejemplo 5 para una manera de realizar la selección para fitasas de esta sub-familia. Los Ejemplos 8-18 describen la purificación y caracterización de cinco fitasas de la invención, es decir, las fitasas de *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Paxillus involtus* y *Trametes pubescens*.

20 Las condiciones correspondientes al término “astringencia media a alta” son encontradas en la parte de la definición general arriba, es decir, las condiciones de lavado son 2 X SSC y una temperatura de 65°C. Preferiblemente, la temperatura de lavado es 65°C o incluso más alta, p. ej. 70, 75, 80 o incluso 85°C, correspondiente a una astringencia alta, astringencia muy alta o astringencia excepcionalmente alta.

25 Preferiblemente, la reacción de PCR es realizada con un molde o una secuencia meta, p. ej. una secuencia de nucleótidos, que puede ser p. ej. ADN genómico o ADNc. No obstante, por ejemplo se puede usar también ARNm como un molde. ADN genómico no necesita ser aislado, la reacción de PCR puede también ser realizada directamente en un micelio fúngico por ejemplo.

30 De forma alternativa, la reacción de PCR es realizada con el gen de tipo salvaje de cualquier variante de PE de la misma. En particular, al menos una banda de PCR es obtenida usando al menos un grupo de cebadores en el gen de tipo salvaje.

35 Algunos cebadores específicos para la reacción de PCR son sugeridos en la parte experimental. No obstante, el experto es ciertamente capaz de proponer también otros cebadores específicos del alineamiento en la Fig. 6 (fitasas de basidiomicetos) dichos cebadores resultan característicos para fitasas de basidiomicetos, es decir, tienen que considerar también el alineamiento en la Fig. 7 (mostrando fitasas de basidiomicetos al igual que las fitasas de ascomicetos conocidas). En consecuencia, la reivindicación 6 se refiere en general a tales cebadores, puesto que el experto sugeriría 40 que son específicos para fitasas de basidiomicetos, con base en su conocimiento común general y los alineamientos en las Figs. 6 y 7.

45 En cuanto a las 6-fitasas, la invención se refiere a tales fitasas derivadas de cualquier hongo. “Fúngico” está definido como se ha descrito anteriormente y este término incluye entre otras cosas los basidiomicetos. En la sección de definiciones generales de la presente, se explica cómo interpretar la especificidad. Se observa, que en el contexto presente, el concepto de “una 6-fitasa” significa cualquier D6-, L6- o D/L-6-fitasa. Sorprendentemente, se ha descubierto que tales 6-fitasas fúngicas son de un rendimiento superior en comparación con las 3-fitasas fúngicas conocidas, haciendo referencia a los Ejemplos 10-12 de la presente que revelan que la fitasa de *Peniophora* es una 6-fitasa y tiene un rendimiento altamente superior en comparación con las fitasas de *Aspergillus* conocidas. En particular, p. ej. el nivel inicial de hidrólisis de PA es aumentado y una explicación muy plausible de este hecho podría ser que esta fitasa sea una 6-fitasa, puesto que estas posiciones (4 y 6 en PA) son menos obstaculizadas estéricamente que cualquiera de las otras posiciones.

55 Preferiblemente, la 6-fitasa fúngica es una fitasa de basidiomicetos, aún más preferiblemente de la clase, sub-clase, tipos, géneros y cepas como se describe al principio de la sección titulada “Descripción detallada de la invención”. En otra forma de realización preferida la fitasa es una D6-fitasa. En otra forma de realización preferida la fitasa es una L6-fitasa.

60 Esta solicitud también expone p. ej. el uso de una 6-fitasa fúngica en alimentos y piensos, composiciones que comprenden esta 6-fitasa fúngica, en particular aditivos alimentarios y de piensos, y el uso de estas 6-fitasas fúngicas para liberar fosfato inorgánico de ácido fítico o fitato.

65 En una forma de realización preferida, la fitasa es una (3+6)-fitasa, es decir, cualquier D3-/D6; L3-/L6; D3-/L6; L3-/D6 fitasa, haciendo referencia en particular a los Ejemplos 15-17 aquí con respecto a la fitasa de *Agrocybe* que es también de rendimiento superior en comparación con la fitasa de *Aspergillus* conocida.

Preferiblemente, la (3+6)-fitasa es una fitasa de basidiomicetos, aún más preferiblemente de la clase, sub-clase, tipos, géneros y cepas como se describe al principio de esta sección titulada “descripción detallada de la invención”.

## ES 2 323 440 T3

Aún más preferiblemente, la (3+6)-fitasa tiene una preferencia ligera a una de estas posiciones, en particular la posición 6.

Las fitasas de la invención son todas homólogas en más del 50% a las fitasas aisladas de *Agrocybe pediades*, 5 *Peniophora lycii*, *Paxillus involutus* (phyA1 y phyA2) y *Trametes pubescens*, respectivamente, correspondiente a las SEC ID Nos: 22, 24, 26, 28 y 30, respectivamente (o los polipéptidos maduros de los mismos o cualquier fragmento de los mismos que siguen reteniendo actividad fitasa). Para una definición de “homólogo”, hágase referencia a la sección titulada “Definiciones generales”. La homología a las fitasas conocidas resultan entre otras cosas de la Tabla 1 en el Ejemplo 4. Preferiblemente, el número de aminoácidos en los fragmentos a los que se hace referencia 10 más arriba es de al menos un 50%, más preferiblemente al menos un 60%, aún más preferiblemente al menos un 70%, incluso más preferiblemente al menos un 80%, en particular al menos un 90% del número de aminoácidos de las secuencias catalogadas en el listado de secuencias. Ocurre lo mismo para el fragmento de polipéptido descrito aquí.

15 Preferiblemente, todas las homologías de aminoácidos de la presente solicitud son al menos un 55%, o al menos un 60%, o al menos un 65%, especialmente al menos un 70%. Preferiblemente, el grado de homología es al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 90%, aún más preferiblemente al menos un 95%, especialmente al menos un 97%.

20 Fragmentos determinados de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO 22 derivada de *Agrocybe* siguen presentando actividad fitasa. Como se describe con más detalle en la parte experimental abajo (ejemplos 13-15), cuando se expresa en levadura aproximadamente el 80% de la enzima fitasa de *Agrocybe* tiene el aminoácido N-terminal de Val (aminoácido nº. 27 en SEC ID NO 22), mientras que aproximadamente el 20% tiene el aminoácido N-terminal de Thr (aminoácido nº. 25 en la SEC ID NO 22). Cuando se expresa en *Aspergillus* aproximadamente 2/3 25 tienen el aminoácido N-terminal de Phe (aminoácido nº. 31 en la SEC ID NO 22), mientras que aproximadamente 1/3 tienen el aminoácido N-terminal de Gln (aminoácido nº. 28 en SEC ID NO 22). Por consiguiente, hay al menos estas cuatro secuencias de aminoácidos posibles maduras.

30 Análogamente, un fragmento de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO 24 derivada de *Peniophora*, sigue exhibiendo actividad fitasa. Como se describe con más detalle en la parte experimental abajo, cuando se expresa en *Aspergillus*, la fitasa de *Peniophora* tiene una secuencia de aminoácidos N-terminal de Leu-Pro-Ile-Pro-Ala-Gln-Asn- (aminoácidos nº. 31-37 en la SEC ID NO 24). Por consiguiente la secuencia de los aminoácidos nos. 31-439 de la SEC ID NO 24 está actualmente considerada como una secuencia de fitasa madura.

35 Las fitasas pueden ser definidas como estando codificadas por una parte codificante de la fitasa.

i) las secuencias de ADN catalogadas en el listado de secuencias como SEC ID Nos: 21, 23, 25, 27 y 29, respectivamente (phyA1 y phyA2 de *Paxillus involutus*); o

40 ii) las secuencias de ADN clonadas en plásmido pYES 2.0 presente en *E. coli* DSM 11313, 11312, 11842, 11843 y 11844, respectivamente; o

análogos o derivados de los mismos que son homólogos al menos en un 50% a ellas.

45 Para la definición de una “parte codificante de la fitasa” hágase referencia a la sección de definiciones generales.

Las cinco secuencias de ADN son obtenibles directamente de las cepas parentales depositadas o de las cepas de *E. coli* depositadas por extracción del ADN plásmido por métodos conocidos en la técnica (Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY).

50 La molécula de ADN puede ser definida codificando una fitasa, y estando seleccionada de:

(a) las secuencias de nucleótidos específicas de las fitasas de *Agrocybe*, *Peniophora*, *Paxillus* y *Trametes* (phyA1 y phyA2 de *Paxillus*), p. ej. ADN como se muestra en los listados de secuencias que tienen los Nos de SEC ID indicados 55 (o sus cadenas complementarias);

(b) las mismas secuencias que en (a) pero expresadas por medio de los clones de plásmidos depositados;

(c) secuencias que son homólogas al menos en un 55% a estas secuencias;

60 (d) secuencias que se hibridan bajo baja astringencia con las secuencias de (a) o (b);

(e) secuencias que no se hibridan por la degeneración del código genético pero que codifican los polipéptidos específicos o fragmentos de fitasa activos de los mismos.

65 Para una definición de “hibridación”, hágase referencia a la sección titulada “definiciones generales”, que también cataloga ciertas condiciones de hibridación preferidas.

## ES 2 323 440 T3

Con respecto a la parte de homología en la característica (c), el grado de homología a la secuencia de ácidos nucleicos expuesta bajo el encabezamiento (a) y (b) es al menos aproximadamente del 55%, (codificando además un polipéptido que presenta actividad fitasa). En particular, la homología es al menos de un 60%, o al menos un 65%, especialmente al menos un 70%, preferiblemente al menos aproximadamente un 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 95%, y de la forma más preferible al menos aproximadamente un 97%. En particular, el grado de homología se basa en una comparación con las secuencias enteras catalogadas o sus cadenas complementarias o cualquiera de las sub-secuencias de las mismas correspondientes a una fitasa "madura".

La homología del ADN de las fitasas seleccionadas de la invención a las fitasas conocidas resultan entre otras cosas de la Tabla 1 en el Ejemplo 4.

Para los nucleótidos formas de realización correspondientes preferidas se aplican como para los polipéptidos (referencia a los ejemplos 5, 6 y 7; "astringencia media a alta" significa que las condiciones de lavado son 2 X SSC y una temperatura de 65°C, preferiblemente 65°C o incluso mayor, p. ej. 70, 75, 80 o incluso 85°C; la reacción de PCR es realizada con una secuencia de nucleótidos meta, p. ej. ADN, por ejemplo ADN genómico o ADNc (o ARNm); gen de tipo salvaje de cualquier variante de PE de la misma).

Las secuencias de ADN de la invención pueden también ser donadas por cualquier método general que implica

- clonar, en vectores adecuados, una genoteca de ADNc de cualquier organismo previsto para producir la fitasa de interés,
- transformar las células huéspedes de levadura adecuadas con dichos vectores,
- cultivar las células huéspedes bajo condiciones adecuadas para expresar cualquier enzima de interés codificada por un clon en la genoteca de ADNc,
- seleccionar para clones positivos determinando cualquier actividad fitasa de la enzima producida por tales clones, y
- aislar la enzima que codifica el ADN de tales clones.

Un método de aislamiento general ha sido descrito en WO 93/11249 y WO 94/14953. Una descripción detallada de los métodos de selección está provista en la parte experimental.

Un cebador, sonda, molécula de oligonucleótido/molécula de ADN puede ser derivado del alineamiento de la fig. 6. Sólo los cebadores específicos o únicos para las fitasas nuevas de la invención están por supuesto incluidos aquí, es decir, se tiene que considerar también el alineamiento en la Fig. 7.

Un método de identificación de células de producción de fitasa adicionales, en particular microorganismos, está descrito. En particular, éste es también un método de selección o cribado para microorganismos productores de fitasa. El concepto de "célula" debe ser definido aquí generalmente como el término "célula huésped" en la parte de definiciones generales de la presente). Células preferidas son células de microorganismos, en particular células micóticas, preferiblemente del filo Basidiomycota. Células de basidiomicetos más preferidas están catalogadas al principio del todo de la descripción detallada de la invención.

Cualquier fuente, en particular cualquier microorganismo, puede ser seleccionada para proporcionar un molde o una secuencia meta, normalmente en forma de ADN genómico, ADNc o ARNm.

Referencias generales a la reacción PCR, incluyendo condiciones de reacción estándares, se encuentran en la parte experimental. En cuanto a la selección de cebadores adecuados, se hace referencia a las observaciones anteriores.

Preferiblemente, se debe verificar que el fragmento de PCR amplificado derivado del molde es específico.

Algunos ejemplos de procedimientos de verificación adecuados son:

- a) hacer fluir una electroforesis en geles de agarosa que revela la existencia de una banda de PCR correspondiente al fragmento de PCR amplificado; y, si se desea, también
- b) controlar que el tamaño del fragmento amplificado por PCR xdz como estaba previsto; y, si se desea, también
- c) aislar y secuenciar el fragmento o banda de PCR para mostrar un alto grado de homología a las secuencias madre, de las cuales los cebadores fueron derivados.

Hasta b): la presencia potencial de intrones, (un ejemplo: 50 bases de 300), es una de las diferentes razones para permitir una desviación de la correspondencia de tamaños exacta. Preferiblemente, el tamaño del fragmento amplificado por PCR (incluyendo intrones) según está medido por ejemplo por el número de bases está dentro de las

## ES 2 323 440 T3

gamas del 50-150%, 60-140%, 70-130%, 80-120%, 85-115%, 90-110%, 95-105% del número de bases/nucleótidos entre los cebadores en las secuencias madre (Fig. 6), de las cuales los cebadores fueron derivados. En otra forma de realización preferida (excluyendo intrones), el tamaño del fragmento amplificado por PCR está en la gama del 80-120%, 85-115%, 90-110%, 95-105% del número de bases entre los cebadores en las secuencias madre (Fig. 6), de las cuales los cebadores fueron derivados.

Hasta c): preferiblemente el grado de homología es más del 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95% de homología (determinado como se describe arriba). De forma alternativa, se comprueba si el fragmento amplificado por PCR comprende al menos una de las regiones conservadas entre los cebadores usados, dichas regiones conservadas estando mostradas por una mancha gris en la Fig. 6. Preferiblemente, el fragmento comprende al menos dos, tres, cuatro, cinco etc. o todas estas regiones conservadas. Otra forma de comprobar la homología es controlar la presencia de áreas de delecciones características para las secuencias madre de la Fig. 6. Otra forma de comprobar la homología es comprobar las distancias características de control entre las regiones conservadas.

Finalmente, la invención también se refiere generalmente al uso del polipéptido según la invención para liberar (o catalizar la liberación de) fósforo de cualquier sustrato de fitasa, en particular fosfato inorgánico de fitato o ácido fítico; de forma alternativa para convertir el fitato en fosfato inorgánico y (mio-inositol y/o mono-, di-, tri-, tetra, penta-fosfato ésteres del mismo). Esto comprende cualquier proceso donde la fitasa de la invención ejerce su actividad fitasa como se ha definido previamente.

Usos más específicos según la invención son en preparaciones alimentarias humanas o de piensos o en aditivos para tales preparaciones, donde la fitasa, entre otras cosas, sirve para los fines de

- (i) reducir el nivel de fitato del abono,
- (ii) mejorar la digestibilidad, promover el crecimiento, o mejorar la utilización de los alimentos y piensos o su eficiencia de conversión, entre otras cosas, haciendo disponibles proteínas, que de lo contrario serían unidas por fitato,
- (iii) prevenir la desnutrición o enfermedades tales como anemia provocada por iones esenciales y falta de fosfato, es decir, mejorar la biodisponibilidad de minerales o aumentar la absorción de los mismos, eliminar la necesidad de añadir fosfato adicional y iones etc.

En particular, las fitasas de la invención pueden también ser usadas en alimentos para los pollos para mejorar la calidad de la cáscara del huevo (reducción de pérdidas debidas a la rotura), véase p. ej. The Merck Veterinary Manual, (Séptima edición, Merck & CO., Inc., Rahway, N.J., U.S.A., 1991; p.1268); Jeroch *et al*; Bodenkultur Vol. 45, No. 4 pp. 361-368 (1994); Poultry Science, Vol. 75, No. 1 pp. 62-68 (1996); Canadian Journal of Animal Science Vol. 75, No. 3 pp. 439-444 (1995); Poultry Science Vol. 74, No. 5 pp. 784-787 (1995) y Poultry Science Vol. 73, No. 10 pp. 1590-1596 (1994).

Un “pienso” y un “alimento”, respectivamente, significa cualquier dieta natural o artificial, comida o similar o componentes de tales comidas destinados o adecuados para ser comidos, ingeridos, digeridos, por un animal y un ser humano, respectivamente.

La fitasa puede ejercer su efecto *in vitro* o *in vivo*, es decir, antes de la ingesta o en el estómago del individuo, respectivamente. También es posible una acción combinada.

Una composición de fitasa según la invención siempre comprende al menos una fitasa de la invención.

Generalmente, las composiciones de fitasa son líquidas o secas.

Las composiciones líquidas no necesitan contener nada más que la enzima fitasa, preferiblemente en una forma altamente purificada. Normalmente, no obstante, un estabilizador tal como el glicerol, sorbitol o monopropilenglicol es también añadido. La composición líquida puede también comprender otros aditivos, tal como sales, azúcares, conservantes, agentes de ajuste del pH, proteínas, fitato (un sustrato de fitasa). Composiciones líquidas típicas son mezclas acuosas o basadas en aceite. Las composiciones líquidas pueden ser añadidas a un alimento o pienso después de una granulación opcional de la misma.

Las composiciones secas pueden ser composiciones de secado por pulverización, en cuyo caso la composición no necesita contener nada más que la enzima en una forma seca. Normalmente, no obstante, las composiciones secas son denominadas granulados que pueden ser mezclados fácilmente con p. ej. alimentos o componentes alimentarios, o más preferiblemente, formar un componente de una premezcla. El tamaño de partícula de los granulados enzimáticos preferiblemente es compatible con aquel de los demás componentes de la mezcla. Esto proporciona un medio seguro y conveniente de incorporar enzimas en p. ej. el pienso.

Los granulados de aglomeración son preparados usando la técnica de aglomeración en un mezclador de alto cizallamiento (p. ej. Lödige) durante el cual un material de relleno y la enzima son coagulados para formar gránulos. Los granulados de absorción son preparados teniendo núcleos de un material portador para absorber/ser revestidos por la enzima.

## ES 2 323 440 T3

Materiales de carga típicos son sales tales como sulfato de disodio. Otras cargas son caolín, talco, silicato de aluminio y magnesio y fibras de celulosa. Opcionalmente, aglutinantes tales como dextrinas están también incluidos en granulados de aglomeración.

5 Materiales portadores típicos son almidón, p. ej. en forma de mandioca, maíz, patata, arroz y trigo. Sales pueden también ser usadas.

10 Opcionalmente, los granulados son revestidos con una mezcla de revestimiento. Tal mezcla comprende agentes de revestimiento, preferiblemente agentes de revestimiento hidrofóbicos, tales como aceite de palma hidrogenado y sebo bovino, y si se desea otros aditivos, tales como carbonato de calcio o caolín.

15 Adicionalmente, las composiciones de fitasa pueden contener otros sustituyentes tales como agentes colorantes, compuestos de aroma, estabilizadores, vitaminas, minerales, otras enzimas mejoradoras de alimentos o de piensos etc. Esto es así en particular para las así llamadas premezclas.

20 Un “aditivo de alimentos o de piensos” es un compuesto esencialmente puro o una composición multicomponente destinado a o adecuado para ser añadido a alimentos o piensos. En particular es una sustancia que por el uso al que está destinado está convirtiéndose en un componente de un producto alimentario o de pienso o afecta a cualquier característica de un producto alimentario o de pienso. Está compuesto como se indica para las composiciones de fitasa anteriores. Un aditivo típico normalmente comprende uno o más compuestos tales como vitaminas, minerales o enzimas mejoradoras del pienso y portadores y/o excipientes adecuados.

25 En una forma de realización preferida, las composiciones de fitasa de la invención comprenden adicionalmente una cantidad eficaz de una o más enzimas mejoradoras del pienso, en particular enzimas mejoradoras del pienso seleccionadas del grupo que consiste en  $\alpha$ -galactosidas,  $\beta$ -galactosidas, en particular lactasas, otras fitasas,  $\beta$ -glucanasas, en particular endo- $\beta$ -1,4-glucanasas y endo- $\beta$ -1,3(4)-glucanasas, celulasas, xilosidasas, galactanasas, en particular arabinogalactano endo-1,4- $\beta$ -galactosidas y arabinogalactano endo-1,3-(3-galactosidas, endoglucanasas, en particular endo-1,2- $\beta$ -glucanasa, endo-1,3- $\alpha$ -glucanasa y endo-1,3- $\beta$ -glucanasa, enzimas degradadoras de pectina, en particular pectinasas, pectinesterasas, pectin liasas, poligalacturonasas, arabinanasas, rhamnogalacturonasas, rhamnogalacturonano acetil esterasas, rhamnogalacturonano- $\alpha$ -ramnosidas, pectato liasas, y  $\alpha$ -galacturonisidas, mananasas,  $\beta$ -manosidas, manano acetil esterasas, xilano acetil esterasas, proteasas, xilananasas, arabinoxilananasas y enzimas lipolíticas tales como las lipasas, fosfolipasas y cutinasas.

30 El aditivo de pienso de la invención es suplementado al animal mono-gástrico antes o simultáneamente con la dieta. Preferiblemente, el aditivo de pienso de la invención es suplementado al animal mono-gástrico simultáneamente con la dieta. En una forma de realización más preferida, el aditivo de pienso se añade a la dieta en forma de un granulado o un líquido estabilizado.

35 Una cantidad eficaz de fitasa en alimentos o piensos es de aproximadamente 10-20.000. Preferiblemente de aproximadamente 10 a 15.000, más preferiblemente de aproximadamente 10 a 10.000, en particular de aproximadamente 100 a 5.000, especialmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 FYT/kg de alimento o pienso.

40 Ejemplos de otros usos específicos de la fitasa de la invención es en el tratamiento de la soja y en la producción del inositol o sus derivados.

45 La invención también se refiere a un método para reducir los niveles de fitato en abono animal, donde el animal es alimentado con un alimento que comprende una cantidad eficaz de la fitasa de la invención. Como se ha declarado al principio de la presente solicitud un efecto importante de la misma es el hecho de reducir la contaminación por fosfato del medio ambiente.

50 También dentro del campo de la invención está el uso de una fitasa de la invención durante la preparación de preparaciones o aditivos de alimentos o piensos, es decir, la fitasa ejerce su actividad fitasa durante la producción sólo y no es activa en el producto alimentario o de pienso final. Este aspecto es relevante por ejemplo en la fabricación y cocción de la masa.

55 La invención también se refiere a cultivos biológicos substancialmente puros de los microorganismos depositados y a cepas que comprenden, como una parte de sus equipamiento genético, una secuencia de ADN que codifica una fitasa de la invención. Dentro de la definición de un cultivo biológico substancialmente puro se incluye cualquier mutante de dichas cepas que han retenido la capacidad de codificación de fitasa.

60 La invención está descrita con más detalle en los siguientes ejemplos que no están destinados de ninguna manera a limitar el campo de la invención.

**Ejemplos***Materiales y métodos*5 *Medios**Placas de replicación de fitato:*

- Añadir a 200 ml de SC agar derretido  
 10 20 ml de galactosa al 20%  
     800  $\mu$ l de treonina al 5%  
 15     25 ml de solución A  
       25 ml de solución B  
     200  $\mu$ l de Solución de oligoelemento (Catálogo 141 de DSM)  
 20

*Solución A:*

- 25     6 g de CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O  
 25     8 g de MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O  
     añadir H<sub>2</sub>O a 11  
 30     pH = 6.5

*Solución B:*

- 35     35.12 g de fitato-Na  
     añadir H<sub>2</sub>O a 11  
     pH = 6.5  
 40

*Medio A:*

45	Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco0919)	7.5 g/l
	Ácido succínico (Merck 822260)	11.3 g/l
50	NaOH (Merck 6498)	6.8 g/l
	Casamino ácido sin vitamina (Difco 0288)	5.6 g/l
	triptófano (Merck 8374)	0.1 g/l
55	Treonina	1.0 g/l
	Fitato de Na (35.12 g/l pH 6.5)	125 ml/L
60	Galactosa	20.0 g/l
	Metal traza (DSM 141)	1.0 ml/L

# ES 2 323 440 T3

*Solución de metal traza:*

5	Ácido nitrilotriacético	1.50 g
10	MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	3.00 g
15	MnSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.50 g
20	NaCl	1.00 g
25	FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.10 g
30	CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.18 g
35	CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0.10 g
	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.18 g
	CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0.01 g
	KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , 12H <sub>2</sub> O	0.02 g
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01 g
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0.01 g
	NiCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0.025 g
	Na <sub>2</sub> Se <sub>3</sub> O, 5H <sub>2</sub> O	0.30 g
	Agua destilada	1 L
	pH 7.0	

Primero se disuelve el ácido nitrilotriacético y se ajusta el pH a 6.5 con KOH, después se añaden minerales. pH final 7.0 (con hidróxido de potasio).

*Medio B:*

Similar al medio A a excepción de que la glucosa se añade como una fuente de C en vez de galactosa.

*YPD:*

10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, H<sub>2</sub>O a 900 ml. Se somete a autoclave, se añaden 100 ml de glucosa al 20% (filtrada estéril).

*YPM:*

10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, H<sub>2</sub>O a 900 ml. Se somete a autoclave, se añaden 100 ml de maltodextrina al 20% (filtrada estéril).

*10 x sal basal:*

75 g de base nitrogenada de levadura, 113 g de ácido succínico, 68 g de NaOH, H<sub>2</sub>O hasta 1000 ml, filtrado estéril.

*SC-URA:*

100 ml 10 x sal basal, 28 ml de ácidos de casamino al 20% sin vitaminas, 10 ml de triptófano al 1%, H<sub>2</sub>O hasta 900 ml, se somete a autoclave, 3.6 ml de treonina al 5% y se añaden 100 ml de glucosa al 20% o galactosa al 20%.

# ES 2 323 440 T3

SC-agar:

SC-URA, 20 g/l agar añadido.

5

Variante de SC agar:

20 g de agar, 20 ml 10 x sal basal, H<sub>2</sub>O hasta 900 ml, se somete a autoclave

10

Ensayo de actividad fitasa

La actividad fitasa puede ser medida usando el ensayo siguiente:

15 10 µl de muestras de enzima diluida (diluidas en 0,1 M de acetato sódico, 0,01% Tween20, pH 5.5) fueron añadidos en 250 µl fitato de sodio 5 mM (Sigma) en 0,1 M de acetato sódico, 0,01% Tween20, pH 5.5 (pH ajustado después de disolver el fitato sódico; el sustrato fue precalentado) e incubado durante 30 minutos a 37°C. La reacción fue detenida añadiendo 250 µl de ATC al 10% y el fosfato libre fue medido añadiendo 500 µl 7.3 g FeSO<sub>4</sub> en 100 ml de reactivo de molibdato (2,5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O en 8 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido a 250 ml). La absorbencia a 750 nm fue medida en muestras de 200 µl en placas de microtitulación de 96 pocillos. Pruebas en blanco de sustrato y enzimas fueron incluidos. Una curva estándar de fosfato fue también incluida (0-2 mM fosfato). 1 FYT es igual a la cantidad de enzima que libera 1 pmol fosfato/min en las condiciones dadas.

20

Métodos generales de biología molecular

25

A menos que se indique lo contrario las manipulaciones y transformaciones de ADN fueron realizadas usando métodos estándar de biología molecular (Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. *et al.* (Eds.) "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R., and Cutting, S. M. (eds.) "Molecular Biological Methods for Bacillus". John Wiley and Sons, 1990).

30

A menos que se indique lo contrario todas las enzimas para manipulaciones de ADN, tales como p. ej. las endonucleasas de restricción, ligasas etc., fueron obtenidas de New England Biolabs, Inc. Las enzimas fueron usadas según las especificaciones de los proveedores.

35

Ejemplo 1

40

Clonación y expresión de una fitasa de *Peniophora lycii* CBS nº. 686.96

45

Organismos depositados

*Peniophora lycii* CBS nº. 686.96 comprende una secuencia de ADN de codificación de la fitasa de la invención.

50

*Escherichia coli* DSM NO 11312 contiene el plásmido que comprende la secuencia de ADNc de longitud total, que codifica para una fitasa de la invención, en el vector transportador pYES 2.0.

55

Otras cepas

50

Cepa de levadura: la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* usada fue W3124 (van den Hazel, H.B; Kielland-Brandt, M.C.; Winther, J.R. en Eur. J. Biochem., 207, 277-283, 1992; (MATa; ura 3-52; leu 2-3, 112; his 3-D200; pep 4-1137; prc1:: HIS3; prb1:: LEU2; cir+).

55

Cepa de *E. coli*: DH10B (Life Technologies)

60

Plásmidos

El vector pHD414 de expresión en *Aspergillus* es un derivado del plásmido p775 (descrito en EP 238 023). La construcción de pHD414 está posteriormente descrita en WO 93/11249.

65

pYES 2.0 (Invitrogen)

65

pA2phy2 (véase Ejemplo 1)

65

Clonación de expresión en levadura

La clonación de expresión en levadura fue hecha como se describe por H. Dalboege *et al.* (H. Dalboege *et al* Mol. Gen. Genet (1994) 243:253-260.; WO 93/11249; WO 94/14953). Todas las fases individuales de extracción de

# ES 2 323 440 T3

ARN total, síntesis de ADNc, tratamiento de nucleasa de la judía de Mung, extremo romo con T4 ADN polimerasa, y construcción de bibliotecas fue hecha según las referencias mencionadas arriba.

## *Procedimiento de fermentación de *Peniophora lycii* CBS nº. 686.96 para aislamiento de ARNm*

5 *Peniophora lycii* CBS 686.96 fue inoculada de una placa con micelio cultivado en un matraz de agitación que contiene 100 ml de medio B (soja 30 g/l, malto dextrina 15 g/l, bacto-peptona 5 g/l, plurónico 0.2 g/l). El cultivo fue incubado estacionario a 26°C durante 15 días. El caldo de cultivo resultante fue filtrado a través de tejido miracloth y el micelio fue congelado en nitrógeno líquido.

10 ARNm fue aislado de micelio de este cultivo como se describe en (H. Dalboege *et al* Mol. Gen. Genet (1994) 243:253-260.; WO 93/11249; WO 94/14953).

15 Extracción de ARN total fue realizada con tiocianato de guanidino seguido de ultracentrifugación a través de una almohadilla de CsCl 5.7 M, y aislamiento de poli(A)+ ARN se efectuó por cromatografía de afinidad de oligo(dT)-celulosa usando los procedimientos descritos en WO 94/14953.

## *Síntesis de ADNc*

20 ADNc bicatenario fue sintetizado de 5 mg de poli(A)<sup>+</sup> ARN por el método de RNasa H (Gubler and Hoffman (1983) Gene 25:263-269, Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY). El poli(A)<sup>+</sup> ARN (5 µg en 5 µl de agua tratada con DEPC) fue calentado a 70°C durante 8 min. en un tubo de Eppendorf pre-siliconizado sin ribonucleasa, templado en hielo y combinado en un volumen final de 50 µl con tampón de transcriptasa inversa (50 mM de Tris-Cl, pH 8.3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de DTT, Bethesda Research Laboratories) conteniendo 1 mM de dATP, dGTP y dTTP y 0,5 mM de 5-metildCTP (Pharmacia), 40 unidades de inhibidor de ribonucleasa de la placenta humana (RNasin, Promega), 1,45 µg de cebador oligo(dT)18-Not I (Pharmacia) y 1000 unidades de transcriptasa inversa RNasa H SuperScript II (Bethesda Research Laboratories). ADNc de la primera cadena fue sintetizado incubando la mezcla reactiva a 45°C durante 1 hora. Después de la síntesis, la mezcla híbrida mRNA:cDNA fue filtrada en gel a través de una columna de rotación MicroSpin S-400 HR (Pharmacia) según las instrucciones del fabricante.

30 Despues de la gelfiltración, los híbridos fueron diluidos en 250 µl de tampón de la segunda cadena (20 mM Tris-Cl, pH 7.4, 90 mM KCl, 4.6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.16 mM bNAD<sup>+</sup>) conteniendo 200 µl de cada dNTP, 60 unidades de ADN polimerasa I de *E. coli* (Pharmacia), 5.25 unidades de RNasa H (Promega) y 15 unidades de ADN-ligasa de *E. coli* (Boehringer Mannheim). La síntesis de la segunda cadena ADNc fue realizada incubando el tubo de reacción a 16°C durante 2 horas y 15 min. adicionales a 25°C. La reacción fue detenida por adición de EDTA a una concentración final de 20 mM seguido de extracciones de fenol y de cloroformo.

## *Tratamiento de nucleasa de la judía de Mung*

40 El ADNc bicatenario fue precipitado a -20°C durante 12 horas por adición de 2 volúmenes de EtOH al 96%, 0,2 vol de NH<sub>4</sub>Ca 10 M, recuperado por centrifugación, lavado en EtOH al 70%, secado y resuspendido en 30 pl de tampón de nucleasa de la judía de Mung (30 mM de NaAc, pH 4.6, 300 mM de NaCl, 1 mM de ZnSO<sub>4</sub>, 0,35 mM de DTT, 2% glicerol) conteniendo 25 unidades de nucleasa de la judía de Mung (Pharmacia). El ADN horquilla monocatenario fue recortado incubando la reacción a 30°C durante 30 min., seguido de la adición de 70 µl de Tris-Cl<sub>10</sub> mM, pH 7.5, 1 mM de EDTA, extracción y precipitación de fenol con 2 volúmenes de EtOH al 96% y 0,1 vol de NaAc 3 M, pH 5.2 en hielo durante 30 min.

## *Extremo romo con T4 ADN polimerasa*

50 Los ADNcs bicatenarios fueron recuperados por centrifugación y con extremos romos en 30 ml tampón de T4 ADN polimerasa (20 mM de Tris-acetato, pH 7.9, 10 mM de MgAc, 50 mM de KAc, 1 mM de DTT) conteniendo 0.5 mM de cada dNTP y 5 unidades de T4 ADN polimerasa (New England Biolabs) incubando la mezcla reactiva a 16°C durante 1 hora. La reacción fue detenida por adición de EDTA a una concentración final de 20 mM, seguido de extracciones de fenol y de cloroformo, y precipitación durante 12 horas a -20°C añadiendo 2 volúmenes de EtOH al 96% y 0,1 vol de NaAc 3 M pH 5.2.

## *Ligadura de adaptador, digestión Not I y selección de tamaños*

60 Después de la reacción de relleno los ADNcs fueron recuperados por centrifugado, lavados en EtOH al 70% y secados. El ADNc granulado fue resuspendido en tampón de unión de 25 µl (30 mM Tris-Cl, pH 7.8, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de DTT, 0,5 mM ATP) conteniendo 2,5 µg de adaptadores BstXI no palindrómicos (Invitrogen) y 30 unidades de T4 ligasa (Promega) e incubado a 16°C durante 12 horas. La reacción fue detenida calentándose a 65°C durante 20 min. y después enfriándose en hielo durante 5 min. El ADNc adaptado fue digerido con la enzima de restricción Not I por adición de 20 µl de agua, 5 µl 10x tampón de enzima de restricción Not I (New England Biolabs) y 50 unidades de Not I (New England Biolabs), seguido de incubación durante 2,5 horas a 37°C. La reacción fue detenida calentándose a 65°C durante 10 min. Los ADNcs fueron divididos por tamaños por electroforesis en gel en un 0,8% gel de agarosa de baja temperatura de fusión SeaPlaque GTG (FMC) en 1x TBE para separar adaptadores

# ES 2 323 440 T3

no ligados y ADNcs pequeños. El ADNc fue seleccionado por tamaños con un corte a 0,7 kb y recogido del gel usando b-agarasa (New England Biolabs) según las instrucciones del fabricante y precipitado durante 12 horas a -20°C añadiendo 2 volúmenes de EtOH al 96% y 0,1 vol de NaAc 3 M pH 5.2.

## 5      *Construcción de bibliotecas*

El ADNc seleccionado por tamaños direccional fue recuperado por centrifugado, lavado en EtOH al 70%, secado y resuspendido en 30 µl de Tris-Cl 10 mM, pH 7.5, 1 mM de EDTA. Los ADNcs fueron desalados por gelfiltración a través de una columna de rotación MicroSpin S-300 HR (Pharmacia) según las instrucciones del fabricante. Tres 10 ligaduras de prueba fueron realizadas en 10 pl de tampón de unión (30 mM de Tris-Cl, pH 7.8, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de DTT, 0.5 mM de ATP) conteniendo 5 µl de ADNc bicanterio (tubos de reacción #1 y #2), 15 unidades de T4 ligasa (Promega) y 30 ng (tubo #1), 40 ng (tubo #2) y 40 ng (tubo #3, el control de antecedentes del vector) 15 de vector pYES 2.0 dividido por BstXI-NotI. Las reacciones de ligadura fueron realizadas por incubación a 16°C durante 12 horas, calentamiento a 70°C durante 20 min. y adición de 10 µl de agua a cada tubo. 1 µl de cada mezcla de 20 ligadura fue sometida a electroporación en 40 µl de células DH10B de *E. coli* electrocompetentes (Bethesda research 25 Laboratories) como se describe (Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY). Usando las condiciones óptimas una biblioteca fue establecida en *E. coli* consistente en agrupaciones. Cada agrupación fue realizada extendiendo *E. coli* transformadas en placas de agar LB+ampicilina dando 15.000-30.000 colonias/placa tras la incubación a 37°C durante 24 horas. 20 ml de LB+ampicilina fueron añadidos a la placa y las células fueron suspendidas en éstas. La suspensión celular fue agitada en un tubo de 50 ml durante 1 hora a 37°C. El ADN plásmido fue aislado de las células según las instrucciones del fabricante usando kit de plásmidos QIAGEN y almacenado a -20°C.

Partes alícuotas de 1 µl de ADN plásmido purificado (100 ng/ml) de agrupaciones individuales fueron transformadas en *S. cerevisiae* W3124 por electroporación (Becker y Guarante (1991) Methods Enzymol. 194:182-187) y los transformantes fueron colocados en placas en SC agar conteniendo el 2% de glucosa y se incubaron a 30°C.

## *Identificación de colonias positivas*

Después de 3-5 días de crecimiento, las placas de agar fueron réplicas colocadas en placas en un grupo de las placas de replicación de fitato, y se incubaron durante 3-5 días a 30°C. 1% de LSB-agarosa (Sigma) conteniendo 0,2M de CaCl<sub>2</sub> es vertido sobre las placas y después de 1-4 días las colonias de fitasa positivas son identificadas como colonias rodeadas por una zona de aclaramiento.

Las células de colonias positivas de enzimas fueron extendidas para aislamiento de colonias individuales en agar, y una colonia individual productora de enzima fue seleccionada para cada una de las colonias productoras de fitasa identificadas.

## *Aislamiento de un gen de ADNc para la expresión en Aspergillus*

Una colonia de levadura productora de fitasa fue inoculada en 20 ml de caldo YPD en un tubo de ensayo de cristal de 50 ml. El tubo fue agitado durante 2 días a 30°C. Las células fueron cosechadas por centrifugado durante 10 min. a 3000 rpm.

El ADN fue aislado según WO 94/14953 y disuelto en 50 ml de agua. El ADN fue transformado en *E. Coli* por procedimientos estándares. El ADN plásmido fue aislado de *E. coli* usando procedimientos estándares, y analizado por análisis de la enzima de restricción.

El inserto de ADNc fue cortado usando las enzimas de restricción Hind III y Xba I y ligado en el vector de expresión Aspergillus pH414 dando como resultado el plásmido pA2phy2.

El inserto de ADNc de ADN plásmido purificado por Qiagen de pA2phy2, (Qiagen, EEUU) fue secuenciado con el kit de secuenciación de ciclo Taq desoxi terminal (Perkin Elmer, USA) y cebadores oligonucleótidos sintéticos usando un secuenciador de ADN Applied Biosystems ABI PRISM™ 377 según las instrucciones del fabricante.

## *Transformación de Aspergillus oryzae o Aspergillus niger*

Los protoplastos son preparados como se describe en WO 95/02043, pág. 16, línea 21 - página 17, línea 12.

100 µl de suspensión de protoplastos es mezclada con 5-25 µg del ADN apropiado en 10 µl de STC (1.2 M de sorbitol, 10 mM de Tris-HCl, pH = 7.5, 10 mM de CaCl<sub>2</sub>). Los protoplastos son mezclados con p3SR2 (un gen amdS de *A. nidulans* que lleva el plásmido) (Tove Christensen *et al.* Bio/Technology, págs 1419-1422 voló, Dec. 1988). La mezcla se deja a la temperatura ambiente durante 25 minutos. Se añade 0,2 ml de PEG 4000 al 60% (BDH 29576), 10 mM de CaCl<sub>2</sub> y 10 mM de Tris-HCl, pH 7.5 y se mezcla cuidadosamente (dos veces) y finalmente se añaden 0,85 ml de la misma solución y se mezcla cuidadosamente. La mezcla se deja a la temperatura ambiente durante 25 minutos, se centrifuga a 2500 g durante 15 minutos y el granulado es resuspendido en 2 ml de 1,2 M sorbitol. Después de una sedimentación más los protoplastos son extendidos en placas mínimas, (Cove, Biochem. Biophys. Acta 113 (1966) 51-56) conteniendo 1,0 M de sacarosa, pH 7.0, 10 mM de acetamida como fuente de nitrógeno y 20 mM de CsCl

## ES 2 323 440 T3

para inhibir el crecimiento residual. Tras la incubación durante 4-7 días a 37°C las esporas son recogidas y extendidas para colonias individuales. Este procedimiento es repetido y las esporas de una colonia individual después del segundo reaislamiento es almacenado como un transformante definido.

5      *Prueba de transformantes de A. oryzae*

Cada uno de los transformantes de *A. oryzae* son inoculados en 10 ml de YPM (véase más abajo) y propagados. Después de 2-5 días de incubación a 30°C, el sobrenadante es eliminado.

10     La actividad fitasa es identificada aplicando 20 µl de sobrenadante a agujeros de 4 mm de diámetro perforados en placas de LSB-agarosa al 1% contenido 0.1 M de acetato sódico pH 4.5 y 0.1% ácido inositol hexafosfórico. Las placas fueron dejadas durante la noche a 37°C. Un tampón que consiste en 0,1M de CaCl<sub>2</sub> y 0.2M de acetato sódico pH 4.5 es vertido sobre las placas y las placas son dejadas a la temperatura ambiente durante 1 h. La actividad fitasa es después identificada como una zona clara.

15     *Fermentación con flujo discontinuo*

La fermentación con flujo discontinuo fue realizada en un medio comprendiendo maltodextrina como fuente de carbono, úrea como fuente de nitrógeno y extracto de levadura. La fermentación con flujo discontinuo fue realizada inoculando un cultivo de matraz de agitación de células huéspedes de *A. oryzae* en cuestión en un medio comprendiendo un 3,5% de la fuente de carbono y un 0,5% de la fuente de nitrógeno. Después de 24 horas de cultivo a pH 7.0 y 34°C la alimentación continua de fuentes de nitrógeno y carbono adicionales fueron iniciadas. La fuente de carbono fue mantenida como el factor de limitación y se aseguró que hubiera oxígeno presente en exceso. El cultivo de flujo discontinuo fue continuado durante 4 días.

25     *Aislamiento de la secuencia de ADN mostrada en la SEC ID nº. 23*

La parte codificante de la fitasa de la secuencia de ADN mostrada en la SEC ID nº. 23 que codifica para la fitasa de la invención puede ser obtenida del organismo depositado *Escherichia coli* DSM 11312 por extracción del ADN plásmido por métodos conocidos en la técnica (Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY).

La clonación y expresión fue hecha usando la clonación de expresión en la técnica de levadura como se ha descrito anteriormente.

35     El ARNm fue aislado de *Peniophora lycii*, CBS nº. 686.96, cultivada como se ha descrito anteriormente.

Los micelios fueron cosechados después de 15 días de crecimiento, inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C. Una biblioteca de *Peniophora lycii*, CBS nº. 686.96, que consiste en aprox. 9x10<sup>5</sup> clones individuales fue construida en *E. coli* como se describe con unos antecedentes de vector del 1%. El ADN plásmido de algunas agrupaciones fue transformado en levadura, y 50-100 placas conteniendo 250-400 colonias de levadura fueron obtenidas de cada agrupación.

45     Las colonias positivas en fitasas fueron identificadas y aisladas como se ha descrito anteriormente e inoculadas en 20 ml de caldo YPD en un tubo de ensayo de cristal de 50 ml. El tubo fue agitado durante 2 días a 30°C. Las células fueron cosechadas por centrifugado durante 10 min. a 3000 rpm. ADN fue aislado según WO 94/14953 y disuelto en 50 µl de agua. El ADN fue transformado en *E. coli* por procedimientos estándares. ADN plásmido fue aislado de *E. coli* usando procedimientos estándares y la secuencia de ADN del ADNc que codifica la fitasa fue secuenciada con el kit de secuenciación de ciclos Taq desoxi terminal (Perkin Elmer, USA) y cebadores oligonucleótidos sintéticos usando un secuenciador de ADN de Applied Biosystems ABI PRISM™ 377 según las instrucciones del fabricante. La secuencia de ADN del ADNc que codifica la fitasa está mostrada en la SEC ID nº. 23 y la secuencia de aminoácidos correspondiente está mostrada en la SEC ID nº. 24. En la SEC ID nº. 23, los nucleótidos de ADN del nº 1 al nº. 1320 definen una región de codificación de fitasa.

55     La parte de la secuencia de ADN en la SEC ID NO 23, que está codificando la parte madura de la fitasa es la posición 91 a 1320, que corresponde con la posición de los aminoácidos 31-439 en la SEC ID NO 24.

El ADNc es obtenible del plásmido en DSM 11312.

60     El ADN total fue aislado de una colonia de levadura y el ADN plásmido fue salvado por transformación de *E. coli* como se ha descrito anteriormente. Para expresar la fitasa en *Aspergillus*, el ADN fue digerido con las enzimas de restricción apropiadas, el tamaño fue fraccionado en gel, y un fragmento correspondiente al gen de fitasa fue purificado. El gen fue posteriormente ligado a pHD414, digerido con enzimas de restricción apropiadas, dando como resultado el plásmido pA2phy2.

65     Despues de la amplificación del ADN en *E. coli* el plásmido fue transformado en *Aspergillus oryzae* como se ha descrito anteriormente.

# ES 2 323 440 T3

## Prueba de transformantes de *A. oryzae*

Cada uno de los transformantes fueron evaluados para actividad enzimática como se ha descrito anteriormente. Algunos transformantes tuvieron actividad fitasa que fue significativamente mayor que los antecedentes de *Aspergillus oryzae*. Esto demuestra una expresión eficaz de la fitasa en *Aspergillus oryzae*.

### Ejemplo 2

#### 10 Clonación y expresión de una fitasa de *Agrocybe pediades* CBS nº. 900.96

##### *Organismos depositados*

15 *Agrocybe pediades* CBS nº. 900.96 comprende una secuencia de ADN de codificación de fitasa de la invención.

15 *Escherichia coli* DSM nº 11313 contiene el plásmido que comprende la secuencia de ADNc de longitud total, que codifica para una fitasa de la invención, en el vector transportador pYES 2.0.

##### 20 *Aislamiento de la secuencia de ADN mostrada en la SEC ID nº. 21*

20 La parte codificante de fitasa de la secuencia de ADN mostrada en la SEC ID nº. 21 que codifica para una fitasa de la invención puede ser obtenida del organismo depositado *Escherichia coli* DSM 11313 por extracción de ADN plásmido por métodos conocidos en la técnica (Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY).

25 La clonación y expresión fue hecha usando la clonación de expresión en la técnica de levadura como se describe en el Ejemplo 1.

30 ARNm fue aislado de *Agrocybe pediades*, CBS nº. 900.96, cultivado como se ha descrito anteriormente con agitación para asegurar una aireación suficiente.

35 Los micelios fueron cosechados después de 3-5 días de crecimiento, inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C. Una biblioteca de *Agrocybe pediades*, CBS nº. 900.96, que consiste en aprox.  $9 \times 10^5$  clones individuales fue construida en *E. coli* como se describe con unos antecedentes de vector del 1%. El ADN plásmido de algunas agrupaciones fue transformado en levadura, y 50-100 placas conteniendo 250-400 colonias de levadura fueron obtenidas de cada agrupación.

40 Colonias positivas de fitasas fueron identificadas y aisladas como se ha descrito anteriormente. Los insertos de ADNc fueron amplificados directamente de las colonias de levadura y caracterizados como se describe en la sección de materiales y métodos arriba. La secuencia de ADN del ADNc que codifica la fitasa está mostrada en la SEC ID nº. 21 y la secuencia de aminoácidos correspondiente está mostrada en la SEC ID nº. 22. En la SEC ID nº. 21 los nucleótidos de ADN del nº 1 al nº. 1362 definen la región codificante de fitasa.

45 La parte de la secuencia de ADN en la SEC ID NO 21, que está codificando la parte madura de la fitasa es la posición 79 a 1362, que corresponde a la posición de aminoácidos 27-453 en la SEC ID NO 22.

El ADNc es obtenible del plásmido en DSM 11313.

50 ADN total fue aislado de una colonia de levadura y ADN plásmido fue rescatado por transformación de *E. coli* como se ha descrito anteriormente. Para expresar la fitasa en *Aspergillus*, el ADN fue digerido con enzimas de restricción apropiadas, el tamaño fue fraccionado en gel, y un fragmento correspondiente al gen de fitasa fue purificado. El gen fue posteriormente ligado a pH414, digerido con enzimas de restricción apropiadas, dando como resultado el plásmido pA3phy3.

55 Después de la amplificación del ADN en *E. coli* el plásmido fue transformado en *Aspergillus oryzae* como se describe en el ejemplo 1.

##### Prueba de transformantes de *A. oryzae*

60 Cada uno de los transformantes fueron evaluados para actividad enzimática como se describe en el Ejemplo 1. Algunos transformantes tuvieron actividad fitasa que fue significativamente más grande que los antecedentes de *Aspergillus oryzae*. Esto demuestra una expresión eficaz de la fitasa en *Aspergillus oryzae*.

# ES 2 323 440 T3

## Ejemplo 3

### Clonación y expresión de fitasas de *Paxillus involutus* CBS 100231 y *Trametes pubescens* CBS 100232

#### 5      *Organismos depositados*

*Paxillus involutus* CBS nº. 100231 comprende dos secuencias de ADN codificantes de fitasa de la invención y *Trametes pubescens* CBS 100232 comprende una fitasa de la invención.

10     *Escherichia coli* DSM Nos. 11842, 11843 y 11844 contiene los plásmidos que comprenden las secuencias de ADNc de longitud total, que codifican para estas fitasas de la invención, en el vector transportador pYES 2.0, es decir, PhyA1, PhyA2 de *Paxillus involutus* y la fitasa de *Trametes pubescens*, respectivamente.

#### 15     *Aislamiento de las secuencias de ADN mostradas en las SEC ID Nos. 25: 27 y 29*

15     La parte codificante de la fitasa de las secuencias de ADN mostradas en las SEC ID Nos. 25, 27 y 29 que codifican para las fitasas de la invención pueden ser obtenidas de los organismos depositados *Escherichia coli* DSM 11842, 11843 y 11844, respectivamente, por extracción del ADN plásmido por métodos conocidos en la técnica (Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY).

20     La clonación y expresión fue hecha usando la clonación de expresión en la técnica de levadura como se describe en el ejemplo 1.

25     El ARNm fue aislado de los microorganismos respectivos, cultivados bajo condiciones de producción de fitasa, p. ej. como se ha descrito anteriormente con agitación para asegurar una aireación suficiente.

30     Los micelios fueron cosechados después de 3-5 días de crecimiento, inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C. Las bibliotecas, que consistían en aprox. 9x10<sup>5</sup> clones individuales fueron construidas en *E. coli* como se describe con unos antecedentes de vector del 1%. El ADN plásmido de algunas agrupaciones fue transformado en levadura, y 50-100 placas conteniendo 250-400 colonias de levadura fueron obtenidas de cada agrupación.

35     Colonias positivas en fitasa fueron identificadas y aisladas como se ha descrito anteriormente. Insertos de ADNc fueron amplificados directamente de las colonias de levadura y caracterizados como se describe en la sección de materiales y métodos arriba. Las secuencias de ADN del ADNc que codifican las fitasas están mostradas en la SEC ID Nos. 25, 27 y 29 y las secuencias de aminoácidos correspondientes están mostradas en las SEC ID Nos. 26, 28 y 30, respectivamente.

40     El ADNc es obtenible a partir de los plásmidos en DSM 11842, 11843 y 11844.

40     El ADN total fue aislado de una colonia de levadura y ADN plásmido fue salvado por transformación de *E. coli* como se ha descrito anteriormente. Para expresar las fitasas en *Aspergillus*, el ADN fue digerido con enzimas de restricción apropiadas, el tamaño fue fraccionado en gel, y un fragmento correspondiente al gen de fitasa fue purificado. El gen fue posteriormente ligado a pHD414, digerido con enzimas de restricción apropiadas.

45     Despues de la amplificación del ADN en *E. coli* el plásmido fue transformado en *Aspergillus oryzae* como se describe en el ejemplo 1.

#### 50     *Prueba de transformantes de *A. oryzae**

50     Cada uno de los transformantes fueron evaluados para actividad enzimática como se describe en el Ejemplo 1. Algunos transformantes tienen actividad fitasa que fue significativamente más grande que los antecedentes de *Aspergillus oryzae*. Esto demuestra la expresión eficaz de las fitasas en *Aspergillus oryzae*.

55     Las dos fitasas de *Paxillus involutus* CBS 100231 (PhyA1P.i. y PhyA2P.i.) y la fitasa de *Trametes pubescens* CBS 100232 (PhyAT.p.) tienen las características siguientes:

	Número de aminoácidos	Peso molecular calculado (PM)	Punto isoeléctrico (pi)
<b>PhyA1 P.i.</b>	423	46 K	6.4
<b>PhyA2 P.i.</b>	423	45 K	4.5
<b>PhyA T.p.</b>	426	46 K	4.3

# ES 2 323 440 T3

## Ejemplo 4

### Clonación de expresión y caracterización de cinco ADNcs de fitasa (phyA) de cuatro basidiomicetos *Agrocybe pediades*, *Peniophora lycii*, *Paxillus involvtus* y *Trametes pubescens*

5 Las bibliotecas de ADNc direccionales son construidas como se describe en los ejemplos precedentes de micelios inducidos por fitasa de los cuatro basidiomicetos *A. pediades*, *P. lycii*, *P. involvtus* y *T. pubescens*, en el vector de expresión de levadura pYES2.0.

10 Las bibliotecas de ADNc son seleccionadas por su actividad fitasa, dando como resultado el aislamiento de cinco ADNcs de fitasa diferentes, *phyA P. lycii*, *phyA A. pediades*, *phyA1 P. involvtus*, *phyA2 P. involvtus*, y *phyA T. pubescens*.

15 Caracterización del ADNc de *phyA* de estos clones revela regiones conservadas evidentemente específicas para las fitasas de basidiomicetos. Esto indica que las fitasas de basidiomicetos pertenecen a su propia subfamilia dentro del grupo de las fitasas fúngicas.

Las cinco fitasas nuevas son transformadas y sobreexpresadas en *A. oryzae* para facilitar la purificación y caracterización de las enzimas recombinantes.

### 20 Aislamiento de ADNcs de phyA por clonación de expresión en levadura

Las cepas fúngicas *A. pediades*, *P. lycii*, *P. involvtus* y *T. pubescens* son cultivadas estacionarias en un medio FG-4 (30 g/l de harina de soja, 15 g/l de maltodextrina, 5 g/l bacto-peptona, 0.2 g/l de plurónico).

25 La acumulación de actividad fitasa total en los sobrenadantes de cultivo es vigilada en un ensayo en placas como se describe en la sección “Test de transformantes de *A. oryzae*” de Ejemplo 1.

30 Se detectan niveles máximos de actividad fitasa después de cinco a quince días de cultivo, y en consecuencia poli(A)+ARNs aislados de micelios cosechados según esto, se utilizan para construir cuatro bibliotecas de ADNC en el vector de expresión de levadura pYES2.0. Partes alícuotas de las bibliotecas son transformadas en *S. cerevisiae* W3124 y los transformantes son colocados en placas en SC agar contenido 2% glucosa e incubadas a 30°C.

35 El aislamiento de poli(A)+ ARN y construcción de bibliotecas de ADNc se realiza como se describe en el Ejemplo 1 (la sección “Procedimiento de fermentación de *Peniophora lycii* CBS no. 686.96 para aislamiento de ARNm” hasta la sección “Transformación de *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*”).

### 40 Identificación de colonias positivas

Colonias positivas son identificadas como se describe en el Ejemplo 1 bajo el mismo encabezamiento.

Entre 20000 y 30000 clones de levadura de cada biblioteca son seleccionados para actividad fitasa y de uno a cuatro clones de levadura positivos en fitasa son encontrados en cada biblioteca. Las colonias positivas corresponden a cinco genes de fitasa diferentes, *phyA P. lycii* (pC1phy2), *phyA A. pediades* (pC1phy3), *phyA1 P. involvtus* (pC1phy5), *phyA2 P. involvtus* (pC1phy7), y *phyA T. pubescens* (pC1phy6).

### 50 Caracterización de ADNcs de phyA

La estructura primaria del ADNc de *phyA* que codifica la *phyA* de *Peniophora lycii* está mostrada en Fig. 1. El ADNc de 1593 bp de pC1phy2 contiene un marco de lectura abierto de 1320 bp (ORF), que codifica para un polipéptido de 439 residuos con un peso molecular calculado de 47560. El ADNc de *phyA* codifica un péptido señal de 30 aminoácidos. La proteína madura tiene un peso molecular calculado de 44473 y un punto isoeléctrico de pl 4.15. El ADNc y secuencias de aminoácidos están incluidas en el listado de secuencias, (SEC ID NO: 23) y (SEC ID N°: 24), respectivamente.

La secuencia de ADNc de *phyA* y la secuencia deducida de PHYA de *A. pediades* son presentadas en la Fig. 2. El ADNc de 1501 bp de pC1phy3 contiene un 1362 ORF que codifica para un polipéptido de 453 residuos con un péptido señal de 31 aminoácidos de largo. La proteína madura de 422 aminoácidos tiene un peso molecular calculado de 46781 y un punto isoeléctrico de pl 4.82. El ADNc y secuencias de aminoácidos son incluidas en el listado de secuencias como (SEC ID N°: 21) y (SEC ID N°: 22), respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos del ADNc de *phyA1* y el *phyA2* clonadas de *Paxillus involvtus*, y las secuencias deducidas de PHY1 y PHY2, están mostradas en la Fig. 3. y Fig. 4. respectivamente.

El inserto de 1522 bp en pC1phy5 (*phyA1*) contiene un ORF de 1329 bp que codifica para un polipéptido de 442 aminoácidos. Según la predicción de SignalP V1.1 (Henrik Nielsen, Jacob Engelbrecht, Stren Brunak and Gunnar von

## ES 2 323 440 T3

Heijne: "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites", Protein Engineering 10, 1-6 (1997)), el péptido señal consiste en 19 aminoácidos. La proteína madura en consecuencia tiene un peso molecular predicho de 45932 y un pl de 6.39. El ADNc y las secuencias de aminoácidos están incluidos en el listado de secuencias como (SEC ID Nº: 25) y (SEC ID Nº: 26), respectivamente.

5 El plásmido pC1phy7 (*phyA2*) contiene un inserto de 1642 bp con un ORF de 1329 bp que codifica para un polipeptido de 442 residuos. El programa SignalP V1.1 al que se hace referencia arriba predice un sitio de seccionamiento de peptidasa señal putativo entre Ala 19 y Ala-20 en la preproteína codificada *phyA2* y así el peso molecular predicho de la proteína madura es 45466 y el punto isoeléctrico predicho es 4.50. El ADNc y secuencias de aminoácidos están incluidas en el listado de secuencias como (SEC ID Nº: 27) y (SEC ID Nº: 28), respectivamente.  
10

15 En la Fig. 5. están mostradas la secuencia de ADNc de *phyA* y la secuencia deducida de PHYA de *T. pubescens*. El inserto de 1536 bp en pC1phy6 contiene un ORF de 1332 bp que codifica para un polipéptido de 443 residuos. Según la predicción de SignalP V1.1 a la que se hace referencia arriba, el péptido señal consiste en 17 residuos. La proteína madura en consecuencia consiste en 426 aminoácidos y tiene un peso molecular predicho de 45905 y un pl de 4.34. El ADNc y las secuencias de aminoácidos están incluidos en el listado de secuencias como (SEC ID Nº: 29) y (SEC ID Nº: 30), respectivamente.  
20

### Regiones de fitasa de basidiomicetos conservadas

25 Las identidades globales entre las fitasas conocidas del filo Ascomycota y las fitasas de la invención del filo Basidiomycota están mostradas en la tabla 1 abajo ("X/Y" significando identidad "ADN/péptido" como está determinado por GAP GCGv8).

En esta tabla, las primeras cinco fitasas en la columna extrema más a la izquierda son fitasas de basidiomicetos, mientras que las demás son fitasas de ascomicetos.

30

TABLA 1

*Homología de fitasas de ascomicetos y basidiomicetos (comparado con ADNc completo)*

35

	<i>phyA1 P. involutus</i>	<i>phyA2 P. involutus</i>	<i>phyA T. pubescens</i>	<i>phyA A.pediades</i>	<i>phyA P.lycii</i>	<i>phyA A.fumigatus</i>	<i>phyA A.niger</i>	<i>phyA A.terreus</i>	<i>phyA T.lanuginosa</i>	<i>phyA M.thermophila</i>	<i>phyA T. thermophilus</i>	<i>phyA E. nidulans</i>
45	<i>phyA1 P. involutus</i>	81/85	66/62	58/58	56/56	50/40	51/40	52/41	49/40	54/41	48/37	49/40
	<i>phyA2 P. involutus</i>	81/85	66/63	59/58	57/53	49/39	50/38	51/39	48/39	54/40	50/36	49/39
	<i>phyA T. pubescens</i>	66/62	66/63		60/61	58/51	51/40	50/41	53/39	49/40	53/41	50/39
50	<i>phyA A.pediades</i>	58/58	59/58	60/61		56/52	48/37	49/38	48/38	47/37	50/39	48/37
	<i>phyA P.lycii</i>	56/56	57/53	58/51	56/52		50/41	51/42	53/41	50/39	54/45	50/43
	<i>phyA A.fumigatus</i>	50/40	49/39	51/40	48/37	50/41		65/65	64/59	59/51	58/51	62/61
	<i>phyA A.niger</i>	51/40	50/38	50/41	49/38	51/42	65/65		64/61	58/52	58/48	61/61
55	<i>phyA A.terreus</i>	52/41	51/39	53/39	48/38	53/41	64/59	64/61		56/49	62/47	62/57
	<i>phyA T.lanuginosa</i>	49/40	48/39	49/40	47/37	50/39	59/52	58/53	56/49		55/46	62/59
	<i>phyA M.thermophila</i>	54/41	54/40	53/41	50/39	54/45	58/51	58/48	62/47	55/46		57/48
60	<i>PhyA T. thermophilus</i>	48/37	50/36	50/39	48/37	50/43	62/61	61/61	62/57	62/59	57/48	
	<i>phyA E. nidulans</i>	49/40	49/39	50/39	50/42	50/40	65/67	64/63	63/57	59/54	57/51	60/59

65 En este experimento, las secuencias de ADNc completas fueron comparadas. Según la tabla 1, la homología de ADN para fitasas dentro del grupo de basidiomicetos está en la gama de identidad del 81% al 56%, y dentro del grupo de ascomicetos en la gama de identidad de aproximadamente el 65% al 55%. Por consiguiente, la homología de grupo interno parece más alta dentro del grupo de fitasas de basidiomicetos en comparación con las fitasas de ascomicetos.

## ES 2 323 440 T3

La homología de ADN de las fitasas de basidiomicetos contra las fitasas de ascomicetos, no obstante, está sólo en la gama de aproximadamente el 54% al 48%. Por consiguiente, estos dos grupos como tales son más distintos entre sí que la diferencia observada dentro de cada grupo (y esto apunta hacia la discriminación entre fitasas de ascomicetos y las fitasas de basidiomicetos que son legítimas).

5

Esta relación está también visualizada en los alineamientos en la Fig. 6. y Fig. 7.

Para algunas fitasas de la Tabla 1, la Tabla 2 abajo muestra los resultados cuando se comparan las secuencias de ADNc de ORF y las secuencias peptídicas de la proteína madura (péptido señal seccionado).

10

TABLA 2

*Homología de fitasas de ascomicetos y basidiomicetos (ADNc de ORF y polipéptido maduro comparado)*

15

		%ID pep.									
		phyA1 P. involutus	phyA2 P. involutus	phyA T. pubescens	phyA A.pediades	phyA P.lycii	phyA A.fumigatus	phyA A.niger	phyA A.terreus	phyA T.lanuginosa	phyA M.thermophila
		%ID DNA									
	phyA1 P. involutus		36	63	61	57	40	41	41	40	41
	phyA2 P. involutus	81		64	61	55	39	39	39	40	41
	phyA T. pubescens	66	66		63	55	41	42	39	40	42
	phyA A.pediades	58	59	60		55	39	39	41	37	40
	phyA P.lycii	56	57	51	56		42	42	43	41	46
	phyA A.fumigatus	50	49	51	48	50		67	61	51	53
	phyA A.niger	51	50	50	49	51	65		62	51	49
	phyA A.terreus	52	51	53	48	53	64	64		50	48
	phyA T.lanuginosa	49	48	49	47	50	59	58	56		47
	phyA M.thermophila	54	54	53	50	54	51	53	53	53	

45

En esta tabla, las homologías de péptidos están indicadas en la mitad superior derecha de la tabla, mientras que las homologías de ADN están indicadas en la mitad inferior izquierda (ambos % de identidad según GAP GCGv8).

50

De los alineamientos en las Figs. 6 y 7 es evidente que diferentes motivos de la secuencia son conservados dentro de las cinco fitasas de basidiomicetos. Basándose en este alineamiento diferentes secuencias conservadas parciales han sido derivadas (SEC ID Nos: 1-14). Adicionalmente, algunas regiones de delecciones, que son también conservadas en las fitasas de basidiomicetos, también han sido derivadas.

55

Algunos ejemplos de secuencias particularmente altamente conservadas son las denominadas secuencias de consenso I, II y III abajo, los alineamientos correspondientes estando mostrados en las Tablas 3 y 4 abajo. En estas tablas, los residuos idénticos en al menos nueve de las secuencias son indicados por un cuadrado gris y los residuos idénticos para las fitasas de basidiomicetos están indicados por un cuadrado blanco.

60

Secuencia de consenso I: I-Q-R-H-G-A-R-[F/W]-P-T-S-G-A-X-X-R (SEC ID N°: 3)

65

Secuencia de consenso II: N-W-T-[A/E]-G-F-X-X-A-S (SEC ID N°: 5)

Secuencia de consenso III: F-V-E-S-Q-X-[Y/F]-A-R-X-X-G-X-G-D-F-[E/A]-K-C (SEC ID N°: 9)

# ES 2 323 440 T3

TABLA 3

*Alineamientos parciales correspondientes a las secuencias de consenso I y II*

5

		AA pos. 68 - 83 en P.lycii												AA pos. 162 - 171 en P.lycii													
		I	Q	R	H	G	A	R	F	P	T	S	G	A	T	T	R	N	W	T	A	G	F	A	S	A	
		I	Q	R	H	G	A	R	F	P	T	S	G	A	A	T	R	N	W	T	A	G	F	A	S	A	
		I	Q	R	H	G	A	R	F	P	T	S	G	A	A	K	R	N	W	T	A	G	F	A	L	A	
		I	Q	R	H	G	A	R	F	P	T	S	G	A	G	T	R	N	W	T	E	G	F	S	A	A	
		I	Q	R	H	G	A	R	W	P	T	S	G	A	R	S	R	N	W	T	A	G	F	G	D	A	
10		L	S	R	H	G	A	R	Y	P	T	S	S	K	S	K	K	K	F	I	E	G	F	Q	Q	A	
		phyA1 P. involutus	phyA2 P. involutus	phyA T. pubescens	phyA A. pediades	phyA P. lycii	phyA A. fumigatus	phyA A. niger	phyA A. terreus	phyA T. lanuginosa	phyA M. thermophila																S
																											S
																											S
15		L	S	R	H	G	A	R	Y	P	T	S	S	K	S	K	K	K	F	I	E	G	F	Q	Q	A	K
																											LA
																											D
																											PG
																											A
																											Q
																											P
																											R
																											A
																											H
																											N
																											S
																											T

20

TABLA 4

*Alineamientos parciales correspondientes a la secuencia de consenso III*

25

		AA pos. 415 - 433 en P.lycii																			
		F	V	E	S	Q	T	F	A	R	S	D	G	A	G	D	F	E	K	C	
		F	V	E	S	Q	A	Y	A	R	S	G	G	A	G	D	F	E	K	C	
		F	V	E	S	Q	A	Y	A	R	N	D	G	E	G	D	F	E	K	C	
		F	V	E	S	Q	K	Y	A	R	E	D	G	Q	G	D	F	E	K	C	
		F	V	E	S	Q	T	Y	A	R	E	N	G	Q	G	D	F	A	K	C	
30		F	V	K	G	L	S	W	A	R	S	G	-	-	G	N	W	G	E	C	
		phyA1 P. involutus	phyA2 P. involutus	phyA T. pubescens	phyA A. pediades	phyA P. lycii	phyA A. fumigatus	phyA A. niger	phyA A. terreus	phyA T. lanuginosa	phyA M. thermophila										
		F	V	R	G	L	S	F	A	R	S	G	-	-	G	D	W	A	E	C	
35		F	V	A	G	L	S	F	A	Q	A	G	-	-	G	N	W	A	D	C	
		W	I	K	G	L	T	F	A	R	Q	G	-	-	G	H	W	D	R	C	
		F	I	E	S	M	A	F	A	R	G	N	-	-	G	K	W	D	L	C	
40																					

45

La Tabla 5 abajo también muestra algunas de las secuencias de consenso, es decir, (SEC ID NO: 2), (SEC ID NO: 5) y (SEC ID NO: 9), respectivamente, en un alineamiento como en la Fig. 7.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

# ES 2 323 440 T3

TABLA 5

*Secuencias de consenso de la fitasa de basidiomicetos en alineamiento*

5

	AA pos. <i>P. lycii</i>	64	70	75	80
10	phyA1 <i>P. involutus</i>	Q V N I Q R H G A R F			S G A
	phyA2 <i>P. involutus</i>	Q V N I Q R H G A R F			P T S G A
	phyA <i>T. pubescens</i>	Q V H I Q R H G A R F			P T S G A
	phyA <i>A. pediades</i>	Q V N I Q R H G A R F			P T S G A
	phyA <i>P. lycii</i>	Q V N L Q R H G A R W			P T S G A
	phyA <i>A. fumigatus</i>	L V Q V L S R H G A R Y			P T S S K
	phyA <i>A. niger</i>	F A Q V L S R H G A R Y			P T D S K
	phyA <i>A. terreus</i>	F V Q V L A R H G A R S			P T H S K
	phyA <i>T. lanuginosa</i>	F V Q V L S R H G A R Y			P T A H K
	phyA <i>M. thermophila</i>	F A Q V L S R H G A R A			P T L K R

	AA pos. <i>P. lycii</i>	162	170	171
30	phyA1 <i>P. involutus</i>	N W T A G F A S A - - - - -	- - - - - - - - - - -	S S
	phyA2 <i>P. involutus</i>	N W T A G F A S A - - - - -	- - - - - - - - - - -	S S
	phyA <i>T. pubescens</i>	N W T A G F A L A - - - - -	- - - - - - - - - - -	S S
	phyA <i>A. pediades</i>	N W T E G F S A A - - - - -	- - - - - - - - - - -	S S
	phyA <i>P. lycii</i>	N W T A G F G D A - - - - -	- - - - - - - - - - -	S S
	phyA <i>A. fumigatus</i>	K T I E G F Q Q A K L A D P G A -	- - - - - - - - - - -	-
	phyA <i>A. niger</i>	K F I E G F Q S T K L K D P R A Q	- - - - - - - - - - -	-
	phyA <i>A. terreus</i>	K F V E G F Q T A R Q D D H H A N	- - - - - - - - - - -	-
	phyA <i>T. lanuginosa</i>	F F N R G F Q D A K D R D P R S N	- - - - - - - - - - -	-
	phyA <i>M. thermophila</i>	N F T Q G F H S A L L A D R G S T	- - - - - - - - - - -	-

	AA pos. <i>P. lycii</i>	415	423	431
50	phyA1 <i>P. involutus</i>	F V E S Q T F A R S D G A G D F E K C	- - - - - - - - - - -	- - - - - - - - - - -
	phyA2 <i>P. involutus</i>	F V E S Q A Y A R S G G A G D F E K C	- - - - - - - - - - -	- - - - - - - - - - -
	phyA <i>T. pubescens</i>	F V E S Q A Y A R N D G E G D F E K C	- - - - - - - - - - -	- - - - - - - - - - -
	phyA <i>A. pediades</i>	F V E S Q K Y A R E D G Q G D F E K C	- - - - - - - - - - -	- - - - - - - - - - -
	phyA <i>P. lycii</i>	F V E S Q T Y A R E N G Q G D F E K C	- - - - - - - - - - -	- - - - - - - - - - -
	phyA <i>A. fumigatus</i>	F V K G L S W A R S G - - G N W G E C	- - - - - - - - - - -	- - - - - - - - - - -
	phyA <i>A. niger</i>	F V R G L S F A R S G - - G D W A E C	- - - - - - - - - - -	- - - - - - - - - - -
	phyA <i>A. terreus</i>	F V A G L S F A Q A G - - G N W A D C	- - - - - - - - - - -	- - - - - - - - - - -
	phyA <i>T. lanuginosa</i>	W I K G L T F A R Q G - - G H W D R C	- - - - - - - - - - -	- - - - - - - - - - -
	phyA <i>M. thermophila</i>	F I E S M A F A R G N - - G K W D L C	- - - - - - - - - - -	- - - - - - - - - - -

60

Secuencia de consenso I (SEC ID N°: 3), posición de residuo 68 a 83 con la numeración para PHYA *P. lycii* en Fig. 7., está alrededor del centro activo, y las cinco fitasas de basidiomicetos tienen esta secuencia de consenso I-Q-R-H-G-A-R-[F/W]-P-T-S-G-A-X-X-R con trece residuos conservados. Adicionalmente, cuatro de las cinco fitasas tienen un decimocuarto residuo común F75. Esto es a diferencia de las fitasas de ascomicetos que sólo tienen ocho residuos conservados en la misma región (Tabla 3).

## ES 2 323 440 T3

5 Cuando la secuencia de consenso II (SEC ID Nº: 5), AA posición 162 - 171 en *P. lycii*, se compara con las fitasas de ascomicetos se puede observar que las fitasas de basidiomicetos carecen de seis a siete residuos entre *P. lycii* F167 (A. niger F177) a *P. lycii* P177 (A. niger P194) (véase Fig. 7) y que las fitasas de basidiomicetos globales tienen un grado de conservación mucho mayor con siete residuos idénticos de diez (tabla 3). Las fitasas de ascomicetos tienen sólo tres residuos conservados de diez en la misma región.

10 Secuencia de consenso III (SEC ID Nº: 9), AA pos. 415-433 en *P. lycii* consiste en diez residuos con trece residuos conservados en las fitasas de basidiomicetos. Hay tres residuos en la secuencia de consenso que son conservados a través de todas las fitasas fúngicas. En la secuencia de *P. lycii* los residuos son A422, G428, y C433 y para *A. niger* estos son A454, G458, y C463. Todas las fitasas de basidiomicetos tienen cinco residuos entre la alanina conservada y glicina mientras que todas las fitasas de ascomicetos sólo tienen tres (tabla 4).

### *Expresión de PHYA en Aspergillus oryzae*

15 Para obtener expresión de alto nivel de las fitasas PHYA en *Aspergillus oryzae* para purificación adicional y caracterización de la proteína, los cinco ADNcs de *phyA* de *A. pediades*, *P. lycii*, *P. involvens*, y *T. pubescens* fueron subclonados en pHD414, un vector de expresión fúngico. El ADNc de *phyA* está aquí insertado 3' a la secuencia del promotor de TAKA-amilasa y 5' a polyA y secuencia del terminador del gen de glucoamilasa de *A. niger*. Los constructos pHD414phyA fueron transformados en *A. oryzae* por cotransformación con el plásmido de selección amdS (véase la sección “Transformación de *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*” en el ejemplo 1). Los transformantes fueron seleccionados para actividad fitasa en los sobrenadantes, y los transformantes con el rendimiento más alto fueron seleccionados para fermentación.

### 25 *Conclusión*

30 El alto grado de regiones conservadas dentro de este grupo de fitasas de basidiomicetos indican que éstas pertenecen a su propia subfamilia dentro del grupo de fitasas fúngicas.

35 Basándose en estas regiones cebadores de PCR específicos para selección molecular de fitasas relacionadas pueden ser diseñados (Ejemplo 5).

### 35 Ejemplo 5

#### *Selección molecular (grupo de cebadores 5221538)*

40 Los siguientes cebadores oligonucleótidos degenerados que codifican para regiones altamente conservadas dentro de las cinco fitasas de basidiomicetos han sido diseñadas para selección molecular:

522 cebador sentido:

45 5' - CCC AAG CTT AAY TGG ACN GMN GGN TT - 3' (SEC ID NO: 15)

corresponde a los aminoácidos N-W-T-[A,E,D]-G-[F,L] con un CCC y cola 5' del sitio HindIII;

537 cebador sentido:

50 5' - CCC AAG CTT GAY AAR TWY GGN AC - 3' (SEC ID NO: 16)

corresponde a los aminoácidos D-K-[F,Y]-Y-G-T con un CCC y cola 5' del sitio HindIII;

55 538 cebador antisentido:

5' - GCT CTA GAC RTA RWA YTT RTC NAR RTC - 3' (SEC ID NO: 17)

60 corresponde a los aminoácidos D-[F,L]-d-K-[F,Y]-Y-G con un GC y una cola 5' del sitio XbaI;

525 cebador antisentido:

65 5' - GCT CTA GAC AYT TNK CRA ART CNC C - 3' (SEC ID NO: 18)

corresponde a los aminoácidos G-D-F-[A,D,E]-K con un GC y una cola 5' del sitio XbaI;

## ES 2 323 440 T3

539 cebador sentido:

5' - CCC AAG CTT CAR GTN MAY MTN ATH CA - 3' (SEC ID NO: 19)

5 corresponde a los aminoácidos Q-V-[N,H]-[I,L,M]-I-[Q,H] con un CCC y cola 5' del sitio HindIII (SEC ID N°: 15);

540 cebador antisentido:

10 5' - GCT CTA GAC RAA NCC NKC NGT CCA RTT - 3' (SEC ID NO: 20)

corresponde a los aminoácidos N-W-T-[A,d,E]-G-F con un GC y una cola 5' del sitio XbaI;

15 donde N=A, C, GoT; R=AoG; Y=CoT; M=AoC; W=AoT.

El diseño de los cebadores se basa en el alineamiento en la Fig. 7.

20 Para una referencia general a la reacción de PCR, se puede hacer referencia a p. ej. Sambrook *et al*, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> edición; o Lubert Stryer: Biochemistry, 4<sup>a</sup> edición, Freeman and Company, New York, 1995, e.g. pp. 132-134.

25 Primero, el grupo de cebadores 522/538 es evaluado en ADN genómico de ascomicetos y basidiomicetos seleccionados mostrados en la Tabla 6 abajo.

El ADN genómico es aislado según el procedimiento siguiente:

### *Procedimiento para aislamiento de ADN genómico fúngico*

- 30 1. Micelios molidos en N2 líquido en un mortero
2. Micelios de transferencia para un tubo de Eppendorf de 2,0 ml hasta la marca de 0,5 ml
- 35 3. Añadir tampón de tisis de 1,0 ml y mezclar
4. Añadir 10 µl 4 mg/ml RNasa sin ADNasa (New England Biolabs)
5. Incubar durante 30 min. a 37°C
- 40 6. Añadir 40 µl 16 mg/ml de proteasa K (New England Biolabs)
7. Incubar durante 1 h. a 50°C con agitación suave
- 45 8. Centrifugar durante 15 minutos a toda velocidad en un microcentrifugador
9. Aplicar sobrenadante a una columna QIAprep-spin. Centrifugar durante 1 min. y descartar el filtrado
10. Lavar con 0,5 ml de tampón PB, girar durante 1 min. y descartar el filtrado
- 50 11. Lavar con 0,75 ml de tampón PE, centrifugar durante 1 min. y descartar el filtrado
12. Drenar cualquier tampón PE existente con una centrifugación rápida y dejar secar completamente
- 55 13. Colocar la columna de centrifugación en un tubo microfuge limpio y eluir añadiendo 125 µl de H<sub>2</sub>O. Dejar reposar 5 min. y después centrifugar durante 3 min

60 Tampón de lisis:

100 mM de EDTA

10 mM de Tris pH. 8 1% Triton X-100

65 200 mM de NaCl

500 mM de Guanidina-HCl

## ES 2 323 440 T3

Para más información en columna de rotación QIAprep, tampón PB y tampón PE hágase referencia al Manual QIAprep™ Plasmid Handbook de Qiagen GmbH.

5      *Procedimiento experimental*

Aproximadamente 100 a 200 ng de ADN genómico o 10-20 ng de ADNc bícatenario se usa como molde para amplificación por PCR en tampón PCR (10 mM de Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM de KCl) conteniendo 200  $\mu$ M de cada dNTP, 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 unidades AmpliTaq Gold™, y 100 pmol de cada uno de los cebadores degenerados 522 y 538. El volumen total es 50  $\mu$ l. La reacción PCR es realizada en un Perkin - Elmer GeneAmp PCR System 2400. La reacción de PCR es realizada usando un perfil de ciclo de:

94°C - 10 min; 1 ciclo

15     94°C - 1 min, 60°C - 1 min, 72°C - 30 seg; 2 ciclos

94°C - 1 min, 59°C - 1 min, 72°C - 30 seg; 2 ciclos

20     94°C - 1 min, 58°C - 1 min, 72°C - 30 seg; 2 ciclos

-

-

25     -

94°C - 1 min, 52°C - 1 min, 72°C - 30 seg; 2 ciclos

30     94°C - 1 min, 50°C - 1 min, 72°C - 30 seg; 14 ciclos

72°C - 7 min; 1 ciclos

Partes alícuotas de 5  $\mu$ l de los productos de amplificación son analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5%.

35     La Tabla 6 abajo muestra los resultados de la prueba de este grupo de cebadores, es decir, si una banda de PCR específica fue detectada o no.

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

## ES 2 323 440 T3

TABLA 6

Prueba de grupo de cebadores 522/538 en ADN genómico de asco- y basidiomicetos				
	Microorganismo	Filo	Número de recogida de cepa	banda de PCR detectada
5	<i>Cladorinum</i> sp.	Ascomycota	CBS 427.97	No
10	<i>Cytospora</i> sp.	Ascomycota	CBS 424.97	No
15	<i>Cytospora</i> sp.	Ascomycota	CBS 425.97	No
20	<i>Gelasinospora</i> sp.	Ascomycota	NN 040455	No
25	<i>Agrocybe pediades</i>	Basidiomycota	CBS 900.96	Sí
30	<i>Amylostereum Chailletii</i>	Basidiomycota	Recogida de cepa NN	Sí
35	<i>Bjerkandera adusta</i>	Basidiomycota	CBS 580.95	Sí
40	<i>Bjerkandera</i> sp.	Basidiomycota	Recogida de cepa NN	Sí
45	<i>Bolbitius aleuritus</i>	Basidiomycota	do	Sí
50	<i>Cerrena unicolor</i>	Basidiomycota	do	Sí
55	<i>Coniophora arida</i>	Basidiomycota	do	Sí
60	<i>Conocybe</i> sp.	Basidiomycota	do	Sí
65	<i>Coprinus cinereus</i>	Basidiomycota	IFO 30116	Sí
	<i>Cystoderma carcharias</i>	Basidiomycota	Recogida de cepa NN	Sí
	<i>Daedalea quercina</i>	Basidiomycota	NN005877	Sí
	<i>Exidia glandulosa</i>	Basidiomycota	CBS 277.96	Sí
	<i>Femsjonia</i> sp.	Basidiomycota	Recogida de cepa NN	Sí
	<i>Fomes fomentarius</i>	Basidiomycota	CBS 276.96	Sí
	<i>Hygrophoropsis pallida</i>	Basidiomycota	Recogida de cepa NN	Sí
	<i>Hyphoderma argillaceum</i>	Basidiomycota	do	Sí
	<i>Hyphodontia pallidula</i>	Basidiomycota	do	Sí
	<i>Hypholoma fasciculare</i>	Basidiomycota	do	Sí
	<i>Irpej lacteus</i>	Basidiomycota	do	Sí
	<i>Laetisaria arvalis</i>	Basidiomycota	do	Sí
	<i>Lyophyllum</i> sp.	Basidiomycota	do	Sí
	<i>Marasmiellus ramealis</i>	Basidiomycota	do	Sí
	<i>Merismodes</i> sp.	Basidiomycota	do	Sí
	<i>Merulius tremellosus</i>	Basidiomycota	do	Sí
	<i>Oxyporus corticola</i>	Basidiomycota	do	Sí

## ES 2 323 440 T3

	<i>Oxyporus</i> sp.	Basidiomycota	CBS 422.97	Sí
5	<i>Panaeolus semiovatus</i>	Basidiomycota	CBS 819.95	Sí
	<i>Paxillus involutus</i>	Basidiomycota	CBS 100231	Sí
10	<i>Peniophora cinerea</i>	Basidiomycota	NN007373	Sí
	<i>Peniophora lycii</i>	Basidiomycota	CBS 686.96	Sí
15	<i>Peniophora quercina</i>	Basidiomycota	NN 009335	Sí
	<i>Podaxis pistillaris</i>	Basidiomycota	ATCC 38868	Sí
20	<i>Scizophyllum commune</i>	Basidiomycota	Recogida de cepa NN	Sí
	<i>Scizophyllum</i> sp.	Basidiomycota	CBS 443.97	Sí
25	<i>Skeletocutis</i> sp.	Basidiomycota	Recogida de cepa NN	Sí
	<i>Steccherinum ochraceum</i>	Basidiomycota	do	Sí
30	<i>Stereum subtomentosum</i>	Basidiomycota	do	Sí
	<i>Strobilurus tenacellus</i>	Basidiomycota	do	Sí
35	<i>Stropharia cubensis</i>	Basidiomycota	ATCC 13966	Sí
	<i>Trametes hirsuta</i>	Basidiomycota	DSM 2987	Sí
40	<i>Trametes pubescens</i>	Basidiomycota	CBS 100232	Sí
	<i>Trametes zonatella</i>	Basidiomycota	Recogida de cepa NN	Sí
45	<i>Trechispora farinaceae</i>	Basidiomycota	do	Sí
	<i>Trichaptum fuscoviolaceum</i>	Basidiomycota	do	Sí
50	<i>Typhula setipes</i>	Basidiomycota	do	Sí
	<i>Volvariella speciosa</i>	Basidiomycota	do	Sí

## Ejemplo 6

## 55 Selección molecular (otros conjuntos de cebadores)

Los grupos de cebadores 522/525, 539/540, 539/538, 539/525 y 537/525 son evaluados como se describe en el ejemplo 5 arriba, usando 100 pmol de cada uno de los cebadores degenerados sentido y antisentido. Touchdown PCR se usa para amplificación (Ref: R.H.Don *et al.* (1991), Nucleic Acid Research, Vol. 19, No. 14) modificada para el AmpliTaq Gold (TM). La reacción de PCR es realizada usando un perfil de ciclo de:

60 94°C - 10 min; 1 ciclo

65 94°C - 1 min, 60°C - 1 min, 72°C - 1.5 min; 2 ciclos

94°C - 1 min, 59°C - 1 min, 72°C - 1.5 min; 2 ciclos

## ES 2 323 440 T3

94°C - 1 min, 58°C - 1 min, 72°C - 1.5 min; 2 ciclos

-

-

94°C - 1 min, 52°C - 1 min, 72°C - 1.5 min; 2 ciclos

10

94°C - 1 min, 50°C - 1 min, 72°C - 1.5 min; 14 ciclos

72°C - 7 min; 1 ciclo.

15

### Ejemplo 7

#### *Purificación y secuenciación de bandas de PCR*

20 Los fragmentos de la PCR pueden ser purificados y secuenciados usando el kit de extracción en gel Jet-sorb (Genomed GmbH, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de la PCR amplificados son determinados directamente en los productos de PCR purificados usando 200-300 ng como molde, el kit de secuenciación de ciclos Taq desoxi-terminal (Perkin-Elmer, EEUU), terminadores marcados fluorescentes y el cebador de secuencia de 5 pmol en un secuenciador de ADN ABI PRISM 377, Perkin Elmer.

25

Los fragmentos de la PCR generados con el grupo de cebadores 522/538, y con aproximadamente 10-20 ng de ADNc bicatenario de *Schizophyllum sp.* CBS 443.97 como molde, fue purificado y secuenciado como se ha descrito anteriormente y la secuencia de ADN fue deducida para (5'- a 3'):

30

TCTGCCGCATCTGACGGTGTCTATAACCCCGTCCTAACCTGATTATATCAGAAGAGCTTAA  
CGACACCCTCGATGATGCGATGTGCCCGAACGTCGGCGAATCGGACGCCAACGGACGAAT

35

GGACGTCTATTTACGCAGCGCCCATCGCTGAGCGTCTGAACAACAACGCCGTGGCGCTAAC  
CTGACCACCAACGAACGTTACAACCTCATGTCTTATGCCCTTCGACACGCTTGCAGAGGA  
GACGCCGAGCCCCCTCTGCGATCTCTTT (SEC ID NO: 31)

40

y traducida en la secuencia de aminoácidos:

45

Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Arg	Xaa	Pro	Phe	Ser							
1				5					10				15		

El ADNc bicatenario fue sintetizado como se describe en el Ejemplo 1.

### Ejemplo 8

#### *Purificación y caracterización de la fitasa de *Peniophora lycii* expresada en *Aspergillus oryzae**

55 La fitasa de *Peniophora lycii* fue expresada en y excretada de *Aspergillus oryzae* IFO 4177.

55

Un ayudante de la filtración fue añadido al caldo de cultivo que fue filtrado a través de una tela de filtración. Esta solución fue filtrada adicionalmente a través de una placa de filtración de profundidad de Seitz dando como resultado una solución clara. El filtrado fue concentrado por ultrafiltración en membranas de polietersulfona de corte de 3 kDa seguido de diafiltración con agua destilada para reducir la conductividad. El pH de la enzima concentrada fue ajustado a pH 7.5. La conductividad de la enzima concentrada fue 1,2 mS/cm.

65

La fitasa fue aplicada a una columna Q-Sepharose FF equilibrada en 20 mM de Tris/CH<sub>3</sub>COOH, pH 7.5 y la enzima fue eluida con un gradiente lineal de NaCl en aumento (0 - 0.5M). La actividad fitasa se eluyó como un único pico. Este pico fue agrupado y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fue añadido a 1,5M de concentración final. Una columna Phenyl Toyopearl 650S fue equilibrada en 1,5M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 6.0 y la fitasa fue aplicada a esta columna y eluida con un gradiente lineal en disminución de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,5 - 0M). Las fracciones conteniendo fitasa fueron agrupadas y el tampón fue cambiado por 20 mM de Tris/CH<sub>3</sub>COOH, pH 7.5 en una columna Sephadex

## ES 2 323 440 T3

G25. El filtrado de G25 fue aplicado a una columna Q-Sepharose FF equilibrada en 20 mM de Tris/CH<sub>3</sub>COOH, pH 7.5. Después de lavar la columna extensivamente con el tampón de equilibrio, la fitasa fue eluida con un gradiente lineal de NaCl en aumento (0 - 0.5M). La actividad fitasa fue agrupada y el tampón fue cambiado por 20 mM de Tris/CH<sub>3</sub>COOH, pH 7.5 por diálisis. La fitasa dializada fue aplicada a una columna SOURCE 30Q equilibrada en 20 mM de Tris/CH<sub>3</sub>COOH, pH 7.5. Después del lavado de la columna íntegramente con el tampón de equilibrio una fitasa fue eluida con un gradiente lineal de NaCl en aumento (0 → 0.3M). Las fracciones de la columna SOURCE 30Q fueron analizadas por SDS-PAGE y las fracciones de fitasa pura fueron agrupadas.

La fitasa de *Peniophora* emigra en el gel como una banda con M<sub>r</sub> = 67 kDa. La secuenciación de aminoácidos N-terminales del componente de 67 kDa se efectuó después de SDS-PAGE y la electrotransferencia sobre una membrana de PVDF. La secuencia de aminoácidos N-terminal siguiente podría ser deducida:

Leu-Pro-Ile-Pro-Ala-Gln-Asn-

La secuencia corresponde a los residuos de aminoácidos 31-37 en la secuencia de aminoácidos derivada del ADNC.

Por consiguiente una secuencia de aminoácidos madura de la fitasa cuando se expresa en *Aspergillus* es supuesta que sea nº. 31-439 de SEC ID NO 24.

### Ejemplo 9

#### *Caracterización adicional de la fitasa purificada de Peniophora lycii*

La fitasa de *Peniophora lycii* fue expresada en *Aspergillus* y purificada como se describe en el Ejemplo 8.

La actividad fitasa es medida usando el ensayo siguiente:

10  $\mu\text{l}$  de muestras de enzima diluida (diluidas en 0,1 M de acetato sódico, 0,01% Tween20, pH 5.5) fueron añadidos en 250  $\mu\text{l}$  fitato de sodio 5 mM (Sigma) en 0,1 M de acetato sódico, 0,01% Tween20, pH 5.5 (pH ajustado después de disolver el fitato de sodio; el sustrato fue precalentado) e incubado durante 30 minutos a 37°C. La reacción fue detenida añadiendo 250  $\mu\text{l}$  de ATC al 10% y el fosfato libre fue medido añadiendo 500  $\mu\text{l}$  7,3 g FeSO<sub>4</sub> en 100 ml de reactivo de molibdato (2,5 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O en 8 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido a 250 ml). La absorbancia a 750 nm fue medida en muestras de 200  $\mu\text{l}$  en placas de microtitulación de 96 pocillos. Pruebas en blanco de sustrato y de enzimas fueron incluidos. Una curva estándar de fosfato fue también incluida (0-2 mM fosfato). 1 FYT es igual a la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de fosfato/min en las condiciones dadas.

Los perfiles de temperatura fueron obtenidos haciendo fluir el ensayo a varias temperaturas (precalentando el sustrato).

La estabilidad de temperatura fue investigada preincubando las fitasas en 0,1 M de fosfato sódico, pH 5.5 a varias temperaturas antes de medir la actividad residual.

La estabilidad del pH fue medido incubando la enzima a pH 3 (25 mM glicina-HCl), pH 4-5 (25 mM acetato sódico), pH 6 (25 mM MES), pH 7-9 (25 mM tris-HCl) durante 1 hora a 40°C, antes de medir la actividad residual.

Los perfiles del pH fueron obtenidos haciendo fluir el ensayo a varios pH usando los mismos sistemas tampón (50 mM, pH fue readjustado disolviendo el sustrato).

Los resultados del perfil de pH anterior, estabilidad del pH, perfil de temperatura y estudios de estabilidad de temperatura están mostrados en las Figs. 8, 9, 10 y 11, respectivamente. De la Fig. 9 resulta que la fitasa de *Peniophora lycii* es muy estable (es decir, más del 80% de la actividad máxima retenida) durante 1 hora a 40°C en toda la gama de pH 3-9. Y en lo que respecta a los resultados de la estabilidad de temperatura mostrados en la Fig. 11, resulta que a 60-80°C un 50-60% de la actividad residual continua permaneciendo. Se considera que este hecho se debe a la enzima que es sorprendentemente capaz de replegarse después de su desnaturización térmica. El grado de replegamiento dependerá de las condiciones exactas (pH, concentración enzimática).

Fig. 12 muestra el resultado de mediciones de calorimetría de barrido diferencial (DSC) en la fitasa de *Peniophora*. En la DSC el calor consumido para mantener un aumento de temperatura constante en la célula de muestra es medida respecto a una célula de referencia. Un nivel de calentamiento constante es mantenido (p. ej. 90°C/hora). Un proceso endotérmico (proceso que consume el calor - p. ej. el desdoblamiento de una enzima/proteína) es observado como un aumento en el calor transferido a la célula para mantener el aumento de temperatura constante. DSC fue realizada usando el aparato de MC2 de MicroCal. Las células fueron equilibradas 20 minutos a 20°C antes del barrido a 90°C a una frecuencia de exploración de 90°/h. Las muestras de alrededor de 2,5 mg/ml de fitasa de *Peniophora* en 0,1 M de acetato sódico, pH 5.5 fueron cargadas.

# ES 2 323 440 T3

## Ejemplo 10

### *Determinación de la actividad específica de la fitasa de Peniophora*

5 La actividad específica es determinada en una muestra altamente purificada de la fitasa (la pureza fue controlada previamente en un gel de SDS poli acrilamida mostrando la presencia de sólo un componente).

10 La concentración de proteína en la muestra de fitasa fue determinada por análisis de aminoácido como sigue: una alícuota de la muestra de fitasa fue hidrolizada en 6N de HCl, 0,1% fenol durante 16 h a 110 C en un tubo de vidrio evacuado. Los aminoácidos resultantes fueron cuantificados usando un sistema de análisis de aminoácidos de Applied Biosystems 420A accionado según las instrucciones del fabricante. A partir de las cantidades de los aminoácidos la masa total - y por lo tanto también la concentración - de proteína en la alícuota hidrolizada puede ser calculada.

15 La actividad es determinada en las unidades de FYT. Una FYT es igual a la cantidad de enzima que libera 1 micromol de fosfato inorgánico de fitato (5 mM de fitato) por minuto a pH 5.5, 37 C; ensayo descrito p. ej. en el ejemplo 11.

20 La actividad específica es calculada a 987 FYT/mg de proteína enzimática.

## Ejemplo 11

### *Perfilación de producto con resolución de tiempo de hidrólisis catalizada por fitasa de ácido fítico por espectroscopia <sup>1</sup>H RMN*

30 La hidrólisis de ácido fítico (PA) catalizada por la fitasa de Peniophora y por una fitasa comercial de *Aspergillus niger* (Phytase Novo<sup>®</sup>) fue investigada (27 mM de fitato, 1 FYT/ml, pH 5.5 y 3.5, y 27°C) por <sup>1</sup>H RMN perfilando la mezcla de producto en el transcurso de 24 horas.

35 A continuación (Ins(p,q,r,...)P<sub>n</sub>) se refiere a mio-inositol que lleva en total n grupos de fosfato fijados en las posiciones p, q, r,.. Para conveniencia Ins(1,2,3,4,5,6)P<sub>6</sub> (ácido fítico) es abreviado PA. Hágase referencia, no obstante, a la sección "Nomenclatura y especificidad de posición de fitasas" en la parte general de esta solicitud.

40 La técnica proporciona información específica sobre puntos iniciales de ataque por la enzima en la molécula de PA, al igual que información sobre la identidad del producto final. Por otro lado los modelos de evolución de picos que reflejan la composición de las mezclas de producto intermedio, proporcionan una medida cualitativa, una huella distintiva, adecuada para la identificación de similitudes y diferencias entre enzimas individuales.

45 RMN, como muchos otros métodos analíticos, pueden distinguir entre estereoisómeros que no son imágenes especulares (diastereómeros), pero no entre un grupo de isómeros, que son reflejos exactos (enantiómeros), puesto que estos muestran espectros de RMN idénticos.

Así, Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> (3-fosfato eliminado) muestra un espectro de RMN diferente de Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> (6-fosfato eliminado) porque los isómeros son diastereómeros.

50 No obstante, los espectros de RMN de Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> y Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> (1-fosfato eliminado) son idénticos porque los isómeros son enantiómeros. Lo mismo se aplica para el par Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> y Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub> (4-fosfato eliminado).

55 Así, por RMN no es posible distinguir entre una 3- y 1-fitasa, y no es posible distinguir entre una 6 y 4-fitasa (o una L-6- y una D-6-fitasa usando la regla de localizador mínimo).

Influenciados por la descripción de 3 y 6-fitasas en la bibliografía, hemos usado los términos 3 y 6-fitasas para nuestras enzimas, pero, aunque es improbable, no conocemos en realidad si tenemos una 1 y una 4-fitasa en su lugar.

## *Experimental*

60 Espectros de RMN fueron registrados a 300 K (27°C) en un instrumento Bruker DRX400 equipado con un cabezal de sonda inverso selectivo de 5 mm. 16 barridos precedidos por 4 barridos simulados fueron acumulados usando una anchura de barrido de 2003 Hz (5 ppm) cubierta por puntos de datos de 8 K. Atenuación de la resonancia de HOD residual fue conseguida por un periodo de presaturación de 3 segundos. Los espectros fueron referenciados a la señal HOD ( $\delta$  4.70).

65 Muestras de PA para el análisis de RMN fueron preparadas como sigue: PA (100 mg, sal de dipotasio de ácido fítico, Sigma P-5681) fue disuelto en agua desionizada (4,0 ml) y pH ajustado a 5.5 o 3.5 por adición de NaOH acuosa (4 N). Se añadió agua desionizada (hasta 5 ml) y partes de 1 ml, cada una correspondiente a 20 mg de ácido fítico, fueron transferidas a frascos de tapón roscado y el solvente fue evaporado (centrifugador de vacío). Las muestras secas

## ES 2 323 440 T3

fueron disueltas en óxido de deuterio (2 ml, Merck 99.5% D) y nuevamente evaporadas hasta la sequedad (almacenadas a -18°C hasta el uso).

- Para el análisis de RMN una muestra de ácido fítico de 20 mg fue disuelta en óxido de deuterio (1,0 ml, Merck 99.95% D). La solución fue transferida a un tubo de RMN y el espectro de  $^1\text{H}$  RMN fue registrado. Solución enzimática (1 FTU, disuelta/diluida en, según fuera apropiado, con óxido de deuterio) fue añadida seguida de una mezcla exhaustiva (1 minuto). Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN fueron registrados inmediatamente después de la adición de enzima ( $t=0$ ), luego después de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180, 195, 210 minutos (= 3.5 horas), 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5, 11.5, 13.5, 15.5, 17.5, 19.5, 21.5, y 23.5 horas. El pH en el tubo de RMN fue medido.
- Espectros adicionales fueron adquiridos después de 48 y 120 horas (5 días), donde una parte de sustrato (PA, 6 mg) fue añadida para evaluar si la enzima retenía su actividad catalítica.

Mediante análisis RMN 2D de mezclas de inositol fosfato obtenidas por digestión parcial de PA, en conjunción con los datos de RMN publicados (Scholz, P.; Bergmann, G., and Mayr, G.W.: Methods in Inositide Research (Ed. 15 Irvine, R.F.), págs. 65-82, Raven Press, Ltd., New York (1990), señales de  $^1\text{H}$  RMN características atribuibles a Ins(1,2,3,4,5,6)P<sub>6</sub>, (PA), Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>, Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>, Ins(1,2,5,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,2,6)P<sub>3</sub>, Ins(1,2)P<sub>2</sub>, y Ins(2)P, fueron identificadas y permitieron una cuantificación relativa de estas especies durante el transcurso de la reacción.

Gráficos en cascada de perfiles de producto para la fitasa de *Aspergillus* y la fitasa de *Peniophora* que cubre un tiempo de reacción de 24 horas a pH 5.5 están presentados en la Fig. 13 y Fig. 14, respectivamente.

La señal a  $\delta$  3,25(t) representa H-5 en Ins(1,2)P<sub>2</sub> mientras que la señal a  $\delta$  3,18(t) representa H-5 en Ins(2)P. Ins(1,2)P<sub>2</sub> comienza a acumularse después de aproximadamente 4 horas de tiempo de reacción con la fitasa de *Aspergillus* y después de aproximadamente 1 horas de tiempo de reacción con la fitasa de *Peniophora*. Ins(2)P es observado después de aproximadamente 10 horas de reacción con la fitasa de *Aspergillus* y después de aproximadamente 3 horas de reacción con la fitasa de *Peniophora*. Después de 24 horas de reacción, la cantidad o nivel de Ins(1,2)P<sub>2</sub> está muy bajo para ambas fitasas, mientras que la cantidad de Ins(2)P es máxima para ambas fitasas después de 24 horas.

Por consiguiente, los perfiles observados después de 24 horas de tiempo de reacción demuestran que ambas fitasas degradan PA a Ins(2)P.

Para ambas enzimas la mezcla reactiva a 24 h comprendió además de Ins(2)P cantidades menores de Ins(1,2)P<sub>2</sub>. Los tiempos de reacción prolongados (diferentes días) resultaron en la desaparición del Ins(1,2)P<sub>2</sub> residual, pero las especies completamente desfosforiladas, inositol (Ins), no se observaron en absoluto. La observación no se explica por inhibición/desnaturalización irreversible de la enzima, puesto que las enzimas retuvieron sus actividades catalíticas durante períodos prolongados, como está demostrado por su capacidad para digerir partes frescas de PA añadidas a tubos de RMN después de mantenerlos 5 días a la temperatura ambiente.

Volviendo ahora a las Figs. 15 y 16, éstas ilustran con más detalle los perfiles que evolucionan a pH 5.5 durante las 4.5 horas iniciales. Se deduce de la Fig. 10 que H-3 en Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> (designado A) muestra una señal a  $\delta$  3,66 (dd), H-6 en Ins(1,2, 3,4,5)P<sub>5</sub> (B) una señal a  $\delta$  3,87(t) y H-3 en Ins(1,2,5,6)P<sub>4</sub> (C) una señal a  $\delta$  3,56(dd). Ahora, el compuesto A corresponde al fosfato en la posición 3 que ha sido hidrolizado, B a la posición 6 y C a la posición 3 y 4.

Es evidente de la Fig. 15 que el compuesto A aparece como el producto primario más importante ( $t=5$  min) que usa la fitasa de *Aspergillus*, mientras que el compuesto B no aparece. El compuesto C aparece después de 20-25 minutos.

A partir de la Fig. 16 (la fitasa de *Peniophora*) se deduce que el compuesto B aparece como el producto primario más importante ( $t=5$  min) que usa la fitasa de *Peniophora*.

Las señales a  $\delta$  4.82(dt, H-2), 4.38 (q, H-4/H-6), 4.13(q, H-5) y 4.11(dt,H1/H3) son atribuibles al sustrato, ácido fítico, PA. Comparando las Figs. 15 y 16 es evidente, que estos picos disminuyen más rápido con la fitasa de *Peniophora* que con la fitasa de *Aspergillus*.

Estas diferencias son resaltadas en la Fig. 17, que presentan los perfiles observados después de 20 min a pH 5.5 con las señales diagnósticas arriba indicadas (A,B,C) marcadas.

Fig. 18 muestra el resultado final (bajo estas condiciones) de la hidrólisis de ácido fítico a pH 5.5 (es decir, correspondiente a la línea superior de las Figs. 13 y 14). Todas las señales marcadas en la forma de realización superior de *Peniophora* representan el compuesto Ins(2)P, es decir, los protones de los mismos, de derecha a izquierda: H-5, H1 y H3, H4 y H6 y finalmente H-2. Intensidad relativa: 1:2:2:1. Las señales correspondientes son encontradas en la forma de realización de la parte inferior de *Aspergillus*. Esto significa que el producto final está en ambas formas de realización Ins(2)P. No obstante, una cantidad menor de Ins(1,2)P<sub>2</sub> es también detectada en ambas formas de realización, los picos correspondientes estando indicados en la forma de realización de *Aspergillus* sólo.

Diferencias marcadas son observadas:

*Aspergillus*: el producto inicial más importante fue identificado como Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> (A) apariencia seguida de Ins(1,2,5,6)P<sub>4</sub> (C), y Ins(1,2,6)P<sub>3</sub> (D) (H-3 a  $\delta$  3,49(dd) después de 11/2 horas) correspondiente a la eliminación

## ES 2 323 440 T3

consecutiva de los grupos fosfato en las posiciones 3, 4 y 5. La concentración Ins(1,2)P<sub>2</sub> (E) aumenta lentamente comenzando a 4 horas y se reduce de forma muy pronunciada entre 12 y 14 horas con un aumento concomitante rápido del nivel de Ins(2)P (F). Esto está visualizado en la Fig. 11 que representa la concentración dependiente del tiempo de Ins(1,2)P<sub>2</sub> y Ins(2)P, respectivamente, determinada midiendo el área segú las señales correspondientes a 5 H-5 en Ins(1,2)P<sub>2</sub> ( $\delta$  3,25(t)) y Ins(2)P ( $\delta$  3,18 (t)), respectivamente, relativo al área segú las señales correspondientes a los sustratos (t=0).

10 *Peniophora*: a pH 5.5 sólo la posición 6 es inicialmente atacada. Una peculiaridad característica es que PA es digerido a un nivel más rápido en comparación con la fitasa de *Aspergillus*. Peculiaridades características adicionales son que el producto final, Ins(2)P (F) aparece muy temprano (3 horas) y aumenta lentamente, en contraste con aumento 15 muy brusco en el nivel de Ins(2)P hacia el final de la reacción observado para la fitasa de *Aspergillus*.

15 La Fig. 19 es un gráfico similar a la Fig. 17, pero a pH 3.5. Sorprendentemente, a este pH la fitasa de *Peniophora* vuelve a tener afinidad alta inicial a la posición 6 al igual que a la posición 3 de PA (B al igual que A son observados), probablemente con una preferencia ligera por la posición 6. Los datos generados permiten entre otras cosas las conclusiones siguientes:

20 A pH 5.5 al igual que 3.5 la fitasa de *Aspergillus* ataca con un alto grado de selectividad de PA en la posición 3, mientras que la fitasa de *Peniophora* a pH 5.5 con un alto grado de selectividad ataca a PA en la posición 6, a pH 3.5 no obstante parece hidrolizar los grupos fosfato en las posiciones 3 y 6 a índices comparables.

A pH 5.5, la fitasa de *Peniophora* digiere PA a un nivel más rápido en comparación con la fitasa de *Aspergillus*.

25 El producto final es, a pH 3.5 al igual que 5.5, bajo las condiciones aplicadas, Ins(2)P (F).

25 Los índices de reacción globales (PA → Ins(2)P) fueron comparables, aproximadamente 20 horas (Fig. 20. pH 5.5).

30 Por consiguiente, la fitasa de *Aspergillus* resulta ser una 3-fitasa esencialmente limpia, mientras que la fitasa de *Peniophora* a pH 5.5 representa una 6-fitasa esencialmente limpia y a pH 3.5 una fitasa de un tipo hasta ahora desconocido, es decir una 3+6-fitasa.

35 La configuración exacta de mio-inositol tetraquisfosfato producido por hidrólisis parcial de ácido fítico con la fitasa de *Peniophora* podría ser determinada como se perfila abajo, también permitiéndonos concluir si la fitasa de *Peniophora* es una D-, L- o una D/L-6-fitasa.

Otras vías de determinar la especificidad exacta es determinando la rotación óptica o usando una columna de HPLC quiral.

40 1. Aislamiento de HPLC de mio-inositol tetraquisfosfato producido por degradación parcial de ácido fítico con la fitasa de *Peniophora*. Desalación (intercambio fónico, diálsis, (2), (4) y (9) y referencias en la presente)

45 2. Análisis de RMN para controlar la pureza (i), determinar si diferentes diastereómeros tetraquisfosfatos son producidos (ii), y determinar cuáles de estos son producidos (iii)

45 3. Síntesis de polioles pertinentes usando la reducción por borohidruro (BH) de los carbohidratos correspondientes (10)

50 4. Desintegración usando peryodato, reducción por borohidruro y desfosforilación después de (2). Identificación de poliol usando HPLC

55 5. Oxidación de poliol usando L-iditol deshidrogenasa e identificación final de carbohidruro usando HPLC.

55 Referencias:

(2) Van der **Kaay** *et al*, *Biochem. J.*, 312 (1995), 907-910

60 (4) **Irving** *et al*, *J. Bacteriology*, 112 (1972), 434-438

(9) **Stevens**, L.R. en "Methods in Inositide Research" (Irvine, R.F. Ed.), 9-30 (1990), Raven Press, Ltd., New York.

(10) **Stephens**, L. *et al*, *Biochem. J.*, 249 (1988), 271-282

# ES 2 323 440 T3

## Ejemplo 12

### *Ensayo comparativo, liberación de fitasa de Aspergillus y Peniophora de fosfato inorgánico del maíz*

5 El ejemplo presente da un ensayo simple para la liberación catalizada de fitasa con fósforo del maíz a pH 3.5 y 5.5. Dos parámetros han sido enfocados en - velocidad y nivel de liberación de P.

#### *Materiales y métodos*

10 El maíz se obtuvo por la North Carolina State University (muestra nº. R27), y se molió en un triturador (Bühler Universal) en el punto 6.8.

15 Una suspensión de maíz (16,7% p/p) fue preparada pesando 20 g de maíz molido en una botella de tapón azul de 250 ml y añadiendo 100 ml de tampón.

El tampón siguiente fue usado:

pH 5.5: 0,22 M tampón de acetato

20 El valor del pH de 3.5 fue ajustado por 8N de HCl/NaOH.

25 *Enzimas evaluadas:* dos fitasas fueron evaluadas: una fitasa comercial de *Aspergillus niger* (Phytase Novo®) y una fitasa de *Peniophora* de la invención, purificada como se describe en el ejemplo 2.

25 *Dosificación:* todas las enzimas fueron aplicadas a 25 FYT/20 g de maíz (correspondiendo a 1250 FYT/kg).

30 Las botellas con la suspensión de maíz fueron cerradas con tapones, e inmediatamente colocadas al baño maría a 37°C y sometidas a agitación constante. El pH fue medido en esta fase y nuevamente después de 24 horas. Después de 30 min de agitación una muestra de 5 ml fue recogida.

Después las enzimas de fitasa fueron añadidas a una dosificación de 25 FYT/20 g de maíz.

35 Despues se recogieron muestras 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 y 120 min después de la adición de las fitasas, y el contenido de P liberado fue determinado como sigue:

40 Muestras conteniendo fitasa fueron diluidas 1+4 en tampón. Despues las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min, y 1,0 ml del sobrenadante fue recogido. 2,0 ml de tampón y 2,0 ml de solución de parada MoV (véase, el ensayo FYT del Ejemplo 6) fue añadida. Las muestras fueron colocadas en un frigorífico a 3-5°C hasta que todas las muestras pudieron ser medidas en el espectrofotómetro a 415 nm.

El pH fue medido a las 0 y 20 horas.

45 Para las determinaciones una solución estándar o stock de fosfato de 50 mM fue usada preparada. 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ml de solución stock es diluida a un volumen total de 50 ml usando el tampón. A 3.0 ml de cada solución se le añade 2.0 ml de solución de parada MoV.

50 Dos experimentos fueron realizados: a pH 5.5 y a pH 3.5. Los resultados del análisis están mostrados en las Figs. 21 y 22 (pH 5.5 y 3.5, respectivamente). En estas figuras, el símbolo “◆” representa el experimento de control, “◆” la fitasa de *Peniophora* y “■” la fitasa de *Aspergillus*.

#### *Resultados y discusión*

55 Fig. 21 (pH 5.5) muestra que a este pH la fitasa de *Peniophora* libera P de maíz a un nivel significativamente mejorado en comparación con la fitasa de *Aspergillus*.

60 De la Fig. 22 (pH 3.5) es claramente evidente que a este pH la fitasa de *Peniophora* es mucho más rápida en la liberación de fósforo del maíz molido en comparación con la fitasa de *Aspergillus* (0-120 minutos).

65 El tiempo de pasaje del sistema digestivo de por ejemplo pollos/pollos de granja es normalmente del orden de magnitud de 30 minutos a 2 horas, así la diferencia observada es ciertamente importante, cualquiera que sea el pH. Sin embargo el valor de pH de 3.5 es más pertinente en este aspecto que el valor de pH 5.5.

65 Esto implica que la enzima de *Peniophora* es sorprendentemente más eficaz que la fitasa de *Aspergillus* conocida como un liberador de P en el sistema digestivo de p. ej. pollos de granja.

## ES 2 323 440 T3

### Ejemplo 13

#### *Fermentación, purificación y caracterización de la fitasa de Agrocybe pediades expresada en levadura*

5 Un cultivo de semillas es preparado por incubación de la cepa de levadura en 100 ml de medio A a 250 rpm durante la noche a 30°C. 100 ml de medio B es inoculado con 2 ml de cultivo de semilla y las cepas se incuban durante 7 a 12 días a 30°C 250 rpm.

10 La fitasa de *Agrocybe pediades* fue expresada en levadura como se describe en el Ejemplo 2. El clon de levadura comprende una secuencia clonada que codifica una fitasa de la invención que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO 22.

15 Un ayudante de la filtración fue añadido al sobrenadante del cultivo que fue filtrado a través de un tejido de filtración. Esta solución fue adicionalmente filtrada a través de una placa de filtración de profundidad de Seitz dando como resultado una solución clara. El filtrado fue concentrado por ultrafiltración en membranas de polietersulfona con corte de 3 kDa y refiltrado en una placa de filtración de germen. El pH del filtrado fue ajustado a pH 7.5 y la conductividad fue ajustada a 2 mS/cm por dilución con agua destilada.

20 La fitasa fue aplicada a una columna Q-Sepharose FF equilibrada con 20 mM de Tris/CH<sub>3</sub>COOH, pH 7.5 y la enzima fue eluida con un gradiente lineal de NaCl en aumento (0 → 0.5M). Las fracciones conteniendo fitasa de la columna Q-sepharose fueron agrupadas y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fue añadido a una concentración final de 1.3M. Una columna Phenyl Toyopearl 650S fue equilibrada con 1.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 6.0 y la fitasa fue aplicada para esta columna y eluida con un gradiente lineal de disminución (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.3 → 0M). Las fracciones conteniendo fitasa fueron agrupadas y el tampón fue intercambiado por 20 mM de Tris/CH<sub>3</sub>OOOH, pH 7.5 en una columna Sephadex G25. La fitasa fue adicionalmente purificada en una columna SOURCE Q equilibrada con 20 mM de Tris/CH<sub>3</sub>OOOH, pH 7.5, y eluida con un gradiente lineal de NaCl (0 → 0.5M). Finalmente, las fracciones que contienen fitasa de la columna SOURCE Q, fueron agrupadas concentradas en una membrana de celulosa regenerada con corte de 10 kDa, y aplicada a una columna Superdex 200 equilibrada en 25 mM de CH<sub>3</sub>COOH/NaOH, 100 mM de NaCl, pH 5.0.

30 Las fracciones de la columna Superdex 200 fueron analizadas por SDS-PAGE. La fitasa emigra en el gel como una banda muy ancha y difusa con aprox. M<sub>r</sub> = 150 kDa indicando que la enzima estaba altamente glicosilada.

35 La secuenciación de aminoácidos N-terminales del componente de 150 kDa se efectuó después de SDS-PAGE y la electrotransferencia sobre una membrana de PVDF.

Dos secuencias N-terminales podrían ser deducidas en las cantidades relativas de aproximadamente 4:1 (secuencia superior: secuencia inferior):

40 Val-Gln-Pro-Phe-Phe-Pro-Pro-Gln-Ile-Gln-Asp-Ser-Trp-Ala-Ala-  
Tyr-Thr-Pro-Tyr-Tyr-Pro-Val-Gln-

45 y

Thr-Phe-Val-Gln-Pro-Phe-Phe-Pro-Pro-Gln-Ile-Gln-Asp-Ser-Trp-  
Ala-Ala-Tyr-Thr-Pro-Tyr-Tyr-Pro-

50 Los dos aminoácidos N-terminales “Val” y “Thr” se encuentran en la posición 27 y 25, respectivamente, en la SEC ID NO 22. Esto indica que la enzima fitasa madura de la invención, cuando se expresa en levadura, comienza en la posición 27 o 25 en SEC ID NO 22.

55 Por consiguiente la secuencia de aminoácidos madura de la fitasa expresada en levadura es supuesta que sea nº. 27-453 o 25-453 de la SEC ID NO 22.

### Ejemplo 14

#### *Purificación y caracterización de la fitasa de Agrocybe pediades expresada en Aspergillus oryzae*

La fitasa de *Agrocybe pediades* fue expresada en y excretada de *Aspergillus oryzae* IFO 4177.

65 Un ayudante de la filtración fue añadido al caldo de cultivo que fue filtrado a través de un tejido de filtración. Esta solución fue adicionalmente filtrada a través de una placa de filtración de profundidad de Seitz dando como resultado una solución clara. El filtrado fue concentrado por ultrafiltración en membranas de polietersulfona de corte de 3 kDa

## ES 2 323 440 T3

seguido de diafiltración con agua destilada para reducir la conductividad. El pH de la enzima concentrada fue ajustado a pH 7.5.

La fitasa fue aplicada a una columna de Q-Sepharose FF equilibrada en 20 mM de Tris/CH<sub>3</sub>COOH, pH 7.5 y la enzima fue eluida con un gradiente lineal de NaCl en aumento (0 → 0.5M). La actividad fitasa se eluyó como un único valor máximo. Este valor máximo fue agrupado y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fue añadido a una concentración final de 1.3M. Una columna Phenyl Toyopearl 650S fue equilibrada en 1,3M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 6.0 y la fitasa fue aplicada a esta columna y eluida con un gradiente lineal en disminución (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.3 → 0M). Las fracciones conteniendo fitasa fueron agrupadas y el tampón fue cambiado por 20 mM de Tris/CH<sub>3</sub>COOH, pH 7.5 por diálisis. La fitasa fue aplicada a una columna SOURCE 30Q equilibrada en 20 mM de Tris/CH<sub>3</sub>COOH, pH 7.5 y la enzima fue eluida con un gradiente lineal de NaCl en aumento (0 → 0.25M). La actividad fitasa fue agrupada y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fue añadida a una concentración final de 1.6M. Una columna de SOURCE Phenyl fue equilibrada en 1.6M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 mM de ácido succínico/NaOH, pH 6.0 y la fitasa fue aplicada a esta columna y eluida con un gradiente lineal de disminución (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.6 0M). Las fracciones de la columna de SOURCE Phenyl fueron analizadas por SDS-PAGE y las fracciones de fitasa puras fueron agrupadas. La agrupación de fitasa fue dializada contra 20 mM de Tris/CH<sub>3</sub>COOH, pH 7.5, aplicada a una columna HighTrap Q equilibrada en el mismo tampón, y eluida en fases con 20 mM de Tris/CH<sub>3</sub>COOH, 0,5M de NaCl, pH 7.5.

La fitasa de *Agrocybe* emigra en SDS-PAGE como una banda con M<sub>r</sub> = 60 kDa.

La secuenciación de aminoácidos N-terminales del componente de 60 kDa se efectuó después de SDS-PAGE y la electrotransferencia sobre una membrana de PVDF. Dos secuencias de aminoácidos N-terminales podrían ser deducidas en cantidades relativas de aproximadamente 2:1 (secuencia superior:secuencia inferior).

Phe-Pro-Pro-Gln-Ile-Gln-Asp-Ser-Trp-Ala-Ala-Tyr-Thr-Pro-Tyr-Tyr-Pro-Val-Gln-

y

Gln-Pro-Phe-Phe-Pro-Pro-Gln-Ile-Gln-Asp-Ser-Trp-Ala-Ala-Tyr-Thr-Pro-Tyr-Tyr-

La secuencia superior corresponde a los residuos de aminoácidos 31-49 en la secuencia de aminoácidos derivada de ADNc mientras que la secuencia inferior corresponde a los residuos de aminoácidos 28-46.

Por consiguiente la secuencia de aminoácidos madura de la fitasa cuando se expresa en *Aspergillus* es supuesta que sea nº. 31-453 o 28-453 de SEC ID NO 22.

Por consiguiente, sumando los resultados del ejemplo 13 y el ejemplo presente, en la SEC ID NO 21, las secuencias siguientes son sub-secuencias que codifican la fitasa: posición 79 a 1362, 73-1362, 91-1362 o 82-1362 (es decir, posiciones de aminoácidos correspondientes a 27-453, 25-453, 31-453 o 28-453, respectivamente, en SEC ID NO 22).

Por consiguiente, hay una variabilidad ligera en la secuencia N-terminal de la enzima fitasa madura. Esta variabilidad es observada también cuando la enzima es expresada en una única cepa, como cuando se expresa en cepas diferentes. En levadura, la enzima fitasa madura comienza en el aminoácido nº. 27 o 25 (abundancia relativa aproximadamente el 80%:20%, respectivamente); en *Aspergillus* la enzima fitasa madura comienza en el aminoácido nº. 31 o 28 (abundancia relativa: aproximadamente el 65%:35%, respectivamente).

Ejemplo 15

### *Caracterización de la fitasa purificada de Agrocybe pediades*

La fitasa de *Agrocybe pediades* fue expresada en *Aspergillus* y purificada como se describe en el ejemplo 14.

La actividad fitasa es medida usando el ensayo siguiente:

10 µl de muestras de enzima diluida (diluidas en 0,1 M de acetato sódico, 0,01% Tween20, pH 5.5) fueron añadidos en 250 µl de fitato de sodio 5 mM (Sigma) en 0,1 M de acetato sódico, 0,01% Tween20, pH 5.5 (el pH fue ajustado después de disolver el fitato de sodio; el sustrato fue precalentado) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. La reacción fue detenida añadiendo 250 µl de ATC al 10% y el fosfato libre fue medido añadiendo 500 µl 7.3 g FeSO<sub>4</sub> en 100 ml de reactivo de molibdato (2.5 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O en 8 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido a 250 ml). La absorbancia a 750 nm fue medida en muestras de 200 µl en placas de microtitulación de 96 pocillos. Pruebas en blanco de sustrato y de enzimas fueron incluidos. Una curva estándar de fosfato fue también incluida (0-2 mM de fosfato). 1 FYT es igual a la cantidad de enzima que libera 1 µmol de fosfato/min en las condiciones dadas.

## ES 2 323 440 T3

Los perfiles de temperatura fueron obtenidos haciendo fluir el ensayo a varias temperaturas (precalentando el sustrato).

La estabilidad de la temperatura fue investigada preincubando las fitasas en 0,1 M de fosfato sódico, pH 5.5 a 5 varias temperaturas antes de medir la actividad residual.

La estabilidad del pH fue medida incubando la enzima a pH 3 (25 mM de glicina-HCl), pH 4-5 (25 mM de acetato sódico), pH 6 (25 mM de MES), pH 7-9 (25 mM de Tris-HCl) durante 1 hora a 40°C, antes de medir la actividad residual.

10 Los perfiles del pH fueron obtenidos haciendo fluir el ensayo a varios pH usando los mismos sistemas tampón (50 mM, pH fue reajustado disolviendo el sustrato).

15 Los resultados del perfil del pH anterior, estabilidad del pH, perfil de temperatura y estudios de estabilidad de la temperatura están mostrados en la Fig. 23, 24, 25 y 26, respectivamente.

De la Fig. 23 resulta que la fitasa de *Agrocybe pediades* tiene una actividad razonable a pH 3-6 (es decir, más del 50% de la actividad máxima). A pH 4-6 más del 70% de la actividad máxima es encontrado, a pH 5-6 más del 90%. El pH óptimo parece estar en el área del pH 5.5-6.

20 Es evidente de Fig. 24 que la fitasa de *Agrocybe pediades* es muy estable (es decir, más del 80% de la actividad máxima retenida) durante 1 hora a 40°C en la gama entera del pH 3-9.

25 En cuanto al perfil de temperatura, es evidente de la Fig. 25, que la fitasa de *Agrocybe pediades* tiene una actividad razonable a temperaturas de 35-55°C (es decir, más del 60% de la actividad máxima), mientras que a temperaturas de 40-52°C la actividad es superior al 70% de la actividad máxima y la temperatura óptima es próxima a 50°C.

30 Y finalmente, en cuanto a los resultados de estabilidad de temperatura mostrados en la Fig. 26, la fitasa es muy estable a temperaturas de 0 a aproximadamente 55°C (es decir, más del 60% de la actividad residual). Un notable descenso en la actividad residual está visto después de la preincubación a 60°C. De cualquier forma, a 60°C permanece al menos el 20%, preferiblemente el 25% y más preferiblemente el 30% de la actividad residual. También a temperatura de preincubación por encima de 60°C, p. ej. a 70°C y 80°C, permanece una actividad residual sorprendentemente alta, es decir, permanece más del 20%, preferiblemente más del 30%, especialmente más del 40%.

35 Este hecho está contemplado que se debe a la enzima que es sorprendentemente capaz de replegarse después de su desnaturalización térmica. El grado de replegamiento dependerá de las condiciones exactas (pH, concentración enzimática).

40 Fig. 27 muestra el resultado de mediciones de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en la fitasa de *Agrocybe*.

45 En DSC el calor consumido para mantener un aumento de la temperatura constante en la célula de la muestra es medido respecto a una célula de referencia. Un nivel de calentamiento constante es mantenido (p. ej. 90°C/hora). Un proceso endotérmico (proceso que consume calor - p. ej. el desdoblamiento de una enzima/proteína) es observado como un aumento en el calor transferido a la célula para mantener el aumento de temperatura constante.

50 La DSC fue realizada usando el aparato MC2 de MicroCal. Las células fueron equilibradas 20 minutos a 20°C antes del barrido a 90°C a una frecuencia de exploración de 90°/h. Las muestras de alrededor de 2,5 mg/ml de fitasa de *Agrocybe* en 0,1 M de acetato sódico, pH 5.5 fueron cargadas.

55 Los estudios de estabilidad de la temperatura fueron confirmados por DSC, puesto que de la Fig. 5 es evidente que la fitasa de *Agrocybe* tiene una temperatura de desnaturalización o “derretimiento” de aproximadamente 58°C a pH 5.5. El nuevo barrido de la fitasa de *Agrocybe* muestra un valor máximo menor a 58°C, y esto también es indicativo de que una fracción de la enzima es en realidad redoblada doblando la inactivación térmica en el primer barrido.

### Ejemplo 16

Perfilación de producto de resolución de tiempo de hidrólisis catalizada por fitasa de ácido fítico por espectroscopía <sup>1</sup>H RMN

60 La hidrólisis de ácido fítico (PA) catalizada por la fitasa de *Agrocybe* y por una fitasa comercial de *Aspergillus niger* (Phytase Novo<sup>®</sup>) fue investigada (27 mM de fitato, 1 FYT/ml, pH 5.5, y 27°C) por perfilación de <sup>1</sup>H RMN de la mezcla del producto en el transcurso de 24 horas.

65 A continuación (Ins(p,q,r,...)P<sub>n</sub>) se refiere a mio-inositol que lleva en total n grupos fosfato fijados en las posiciones p, q, r,... para conveniencia Ins(1,2,3,4,5,6)P<sub>6</sub> (ácido fítico) se abrevia PA. Hágase referencia, no obstante, a la sección “Nomenclatura y especificidad de posición de fitasas” en la parte general de esta solicitud.

## ES 2 323 440 T3

La técnica proporciona información específica sobre puntos iniciales de ataque por la enzima en la molécula de PA, al igual que información sobre la identidad del producto final. Por otro lado los modelos de evolución de picos que reflejan la composición de las mezclas del producto intermedio, proporcionan una medida cualitativa, una huella distintiva adecuada para la identificación de similitudes y diferencias entre enzimas individuales.

5

RMN, como muchos otros métodos analíticos, pueden distinguir entre estereoisómeros que no son imágenes especulares (diastereómeros), pero no entre un grupo de isómeros, que son imágenes especulares exactas (enantiómeros), puesto que estos muestran espectros de RMN idénticos.

10 Así, Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> (3-fosfato eliminado) muestra un espectro de RMN diferente Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> (6-fosfato eliminado) porque los isómeros son diastereómeros.

15 No obstante, los espectros de RMN de Ins (1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> e Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> (1-fosfato eliminado) son idénticos porque los isómeros son enantiómeros. Lo mismo se mantiene para el par Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> y Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub> (4-fosfato eliminado).

Así, por RMN no es posible distinguir entre una 3- y 1-fitasa y no es posible distinguir entre una 6 y una 4-fitasa (o una L-6 y una D-6-fitasa usando la regla de localizador másnimo).

20 Influenciados por la descripción de 3 y 6-fitatas en la bibliografía, hemos usado los términos 3 y 6-fitatas para nuestras enzimas, pero, aunque es improbable, en realidad sabemos si tenemos una 1- y una 4-fitasa en su lugar.

### *Experimental*

25 Espectros de RMN fueron registrados a 300 K (27°C) en un instrumento Bruker DRX400 equipado con un cabezal de sonda inversa selectiva de 5 mm. 16 barridos precedidos por 4 barridos simulados fueron acumulados usando una anchura de barrido de 2003 Hz (5 ppm) cubierta por puntos de datos de 8 K. Atenuación de la resonancia de HOD residual fue conseguida por un periodo de presaturación de 3 segundos. Los espectros fueron referenciados a la señal HOD ( $\delta$  4.70).

30

Muestras de PA para análisis por RMN fueron preparados como sigue: PA (100 mg, sal de dipotasio de ácido fítico, Sigma P 5681) fue disuelto en agua desionizada (4,0 ml) y el pH fue ajustado a 5.5 por adición de NaOH acuoso (4 N). Agua desionizada fue añadida (hasta 5 ml) y partes de 1 ml, cada una correspondiente a 20 mg de ácido fítico, fueron transferidos a frascos con tapón de rosca y el solvente fue evaporado (centrifugador de vacío).

35

Las muestras secas fueron disueltas en óxido de deuterio (2 ml, Merck 99,5% D) y nuevamente evaporadas hasta la sequedad (almacenadas a -18°C hasta el uso).

40

Para el análisis de RMN una muestra de ácido fítico de 20 mg fue disuelta en óxido de deuterio (1,0 ml, Merck 99,95% D). La solución fue transferida a un tubo de RMN y el espectro de <sup>1</sup>H RMN fue registrado. Solución enzimática (1 FTU, disuelto/diluido en, según fuera apropiado, con óxido de deuterio) fue añadida seguido de la mezcla exhaustiva (1 minuto). Espectros de <sup>1</sup>H RMN fueron registrados inmediatamente después de la adición de enzima ( $t=0$ ), luego después de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180, 195, 210 minutos (= 3.5 horas), 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5, 11.5, 13.5, 15.5, 17.5, 19.5, 21.5, y 23.5 horas. El pH en el tubo de RMN fue medido. Espectros adicionales fueron adquiridos después de 48 y 120 horas (5 días), donde una parte de sustrato (PA, 6 mg) fue añadida para evaluar si la enzima retenía su actividad catalítica.

45

Mediante el análisis de RMN 2D de mezclas de inositol fosfato obtenidas por digestión parcial de PA, en conjunción con datos de RMN publicados (Scholz, P.; Bergmann, G., and Mayr, G.W.: Methods in Inositide Research (Ed. Irvine, R.F.), págs. 65-82, Raven Press, Ltd., New York (1990)), señales de <sup>1</sup>H RMN características atribuibles a Ins(1,2,3,4,5,6)P<sub>6</sub> (PA), Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>, Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>, Ins(1,2,5,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,2,6)P<sub>3</sub>, Ins(1,2)P<sub>2</sub>, y Ins(2)P, fueron identificadas y permitieron una cuantificación relativa de estas especies durante el transcurso de la reacción.

50

Gráficos en cascada de perfiles de producto para la fitasa de Aspergillus y la fitasa de Agrocybe que cubre 24 horas de tiempo de reacción están presentados en la Fig. 28 y Fig. 29, respectivamente.

55

La señal a  $\delta$  3,25(t) representa H-5 en Ins(1,2)P<sub>2</sub> mientras que la señal a  $\delta$  3,18(t) representa H-5 en Ins(2)P. Ins(1,2)P<sub>2</sub> comienza la acumulación después de aproximadamente 4 horas de tiempo de reacción con la fitasa de Aspergillus y después de aproximadamente 2 horas de tiempo de reacción con la fitasa de Agrocybe. Ins(2)P es observado después de aproximadamente 10 horas de reacción con la fitasa de Aspergillus y después de aproximadamente 5 horas de reacción con la fitasa de Agrocybe. Después de 24 horas de reacción la cantidad o nivel de Ins(1,2)P<sub>2</sub> es muy baja para ambas fitasas, mientras que la cantidad de Ins(2)P es máxima para ambas fitasas después de 24 horas.

60

Por consiguiente, los perfiles observados después de 24 horas de tiempo de reacción demuestran que ambas fitasas degradan PA para Ins(2)P. Las especies completamente desfosforiladas, inositol (Ins), no se observaron en absoluto.

65

Para ambas enzimas la mezcla reactiva a 24 h comprendió además de Ins(2)P cantidades menores de Ins(1,2)P<sub>2</sub>. Tiempos de reacción prolongados (varios días) resultaron en la desaparición del Ins(1,2)P<sub>2</sub> residual, pero las especies completamente desfosforiladas, inositol (Ins), no se observaron en absoluto. La observación no es explicada por

## ES 2 323 440 T3

inhibición/desnaturalización irreversible de la enzima, puesto que las enzimas retuvieron sus actividades catalíticas durante períodos prolongados, como se demuestra por sus capacidad para digerir partes frescas de PA añadido a los tubos de RMN después de mantenerlos 5 días a la temperatura ambiente.

5 Volviendo ahora a las Figs. 30 y 31, estas representan con más detalle los perfiles que evolucionan durante las 4.5 horas iniciales. Es inferido ahora de Fig. 32 que H-3 en Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> (designado A) muestra una señal a δ 3,66 (dd), H-6 en Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> (B) una señal a δ 3,87(t) y H-3 en Ins(1,2,5,6)P<sub>4</sub> (C) una señal a δ 3,56(dd). Ahora, el compuesto A corresponde al fosfato en posición 3 que ha sido hidrolizado, B a la posición 6 y C a la posición 3 y 4.

10 Es evidente de la Fig. 30 que el compuesto A aparece como el producto primario más importante (t=5 min) que usa la fitasa de *Aspergillus*, mientras que el compuesto B no aparece. El compuesto C aparece después de 20-25 minutos.

A partir de la Fig. 31 (la fitasa de *Agrocybe*) se deduce que el compuesto A al igual que el compuesto B aparece muy temprano, es decir, dentro de los primeros 15 minutos, probablemente más del compuesto B que A.

15 Las señales a δ 4.82(dt, H-2), 4.38 (q, H-4/H-6), 4.13(q, H-5) y 4.11(dt,H1/H3 son atribuibles al sustrato, ácido fítico, PA. Comparando las Figs. 30 y 31 es evidente que estos picos disminuyen mucho más rápido (es decir, dentro de una hora) con la fitasa de *Agrocybe* que con la fitasa de *Aspergillus*.

20 Estas diferencias están resaltadas en la Fig. 32, que presentan los perfiles observados después de 20 min con las señales diagnósticas marcadas (A,B,C) arriba indicadas.

La Fig. 33 muestra el resultado final (bajo estas condiciones) de la hidrólisis de ácido fítico (es decir, correspondiente a la línea superior de las Figs. 28 y 29). Todas las señales marcadas en la forma de realización de *Agrocybe* superior representan el compuesto Ins(2)P, es decir, los protones de los mismos, de derecha a izquierda: H-5, H1 y H3, H4 y H6 y finalmente H-2. Intensidad relativa: 1:2:2: 1. Las señales correspondientes son encontradas en la forma de realización inferior de *Aspergillus*. Esto significa que el producto final está en ambas formas de realización Ins(2)P. No obstante, una cantidad menor Ins(1,2)P<sub>2</sub> es también detectada en ambas formas de realización, los picos correspondientes estando indicados en la forma de realización de *Aspergillus* sólo.

30 Diferencias marcadas son observadas:

*Aspergillus*: el producto inicial más importante fue identificado como Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> (A) seguido de la aparición de Ins(1,2,5,6)P<sub>4</sub> (C), y Ins(1,2,6)P<sub>3</sub> (D) (H-3 a δ 3,49(dd) después de 1½ horas) correspondiente a la eliminación consecutiva de los grupos fosfato en las posiciones 3, 4 y 5. La concentración de Ins(1,2)P<sub>2</sub> (E) aumenta lentamente empezando a las 2 horas y se reduce muy bruscamente entre 12 y 14 horas con un aumento concomitante rápido del nivel de Ins(2)P (F). Esto está visualizado en las Fig. 34 y 35, que representan la concentración en función del tiempo de Ins(1,2)P<sub>2</sub> y Ins(2)P, respectivamente, construida a partir de cortes a lo largo de la dimensión de tiempo en la Fig. 28-29 en los valores de cambio químico (S) de H-5 en Ins(1,2)P<sub>2</sub> y Ins(2)P, respectivamente (nótese que la escala de tiempo es sólo lineal en segmentos).

40 *Agrocybe*: Ambas posiciones 3 y 6 son inicialmente atacadas, con cierta preferencia por la posición 6. Una peculiaridad característica es que PA es digerido a un nivel más rápido en comparación con la fitasa de *Aspergillus*. Peculiaridades características adicionales son que el producto final, Ins(2)P (F) aparece muy temprano (5 horas) y aumenta lentamente, a diferencia del aumento muy brusco en el nivel de Ins(2)P hacia el final de la reacción observada para la fitasa de *Aspergillus*.

Los datos generados permiten entre otras cosas las conclusiones siguientes:

50 La fitasa de *Aspergillus* ataca con un alto grado de selectividad de PA en la posición 3, mientras que la fitasa de *Agrocybe* resulta menos específica.

La fitasa de *Agrocybe* digiere el PA a un nivel más rápido en comparación con la fitasa de *Aspergillus*.

55 El producto final en ambos casos, bajo las condiciones, aplicadas, es Ins (2) P (F).

Los índices de reacción globales (PA→Ins(2)P) fueron comparables, aproximadamente 20 horas (Fig. 35).

60 Por consiguiente, la fitasa de *Aspergillus* resultan ser una 3-fitasa esencialmente limpia, mientras que la fitasa de *Agrocybe* resulta ser menos específica, no obstante, con alguna preferencia por la posición 6.

Por aplicación de técnicas de correlación 2D-homo- y heteronucleares (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C), estos problemas circunvinientes con resonancias de <sup>1</sup>H que se superponen gravemente tomando ventaja de la dispersión del cambio químico más grande de los núcleos <sup>13</sup>C, en combinación con el software informático adecuado, en principio sería posible identificar y cuantificar los productos intermedios presentes a cualquier tiempo dado y de ese modo delinear completamente la secuencia de reacción. En otras palabras, las curvas como aquellas mostradas en las Fig. 34 y 35 representan la concentración como función del tiempo, podrían en teoría ser construidas para otros inositol fosfatos intermedios.

# ES 2 323 440 T3

## Ejemplo 17

### *Ensayo comparativo, fitasa de Aspergillus y de Agrocybe*

#### 5    *Liberación de fosfato inorgánico del maíz*

El presente ejemplo da un ensayo simple para la liberación catalizada por fitasa con fósforo del maíz a pH 3.5 y 5.5. Dos parámetros han sido enfocados en - velocidad y nivel de liberación de P.

#### 10    *Materiales y métodos*

Se obtuvo maíz de North Carolina State University (muestra N°. R27), y se molió en un triturador (Bühler Universal) en el punto 6.8.

15    Una suspensión del maíz (16,7% p/p) fue preparada pesando 20 g de maíz molido en una botella de tapón azul de 250 ml y añadiendo 100 ml de tampón.

Los tampones siguientes fueron usados:

20    pH 5.5: 0.22 M de tampón acetato

pH 3.5: 0.05 M de tampón citrato.

25    *Enzimas evaluadas:* dos fitasas fueron evaluadas: una fitasa comercial de *Aspergillus niger* (Phytase Novo®) y una fitasa de *Agrocybe* de la invención, purificada como se describe en el ejemplo 3 y 4.

*Dosificación:* todas las enzimas fueron aplicadas a 25 FYT/20 g de maíz (correspondiendo a 1250 FYT/kg).

30    Las botellas con la suspensión del maíz fueron cerradas con tapones e inmediatamente colocadas al baño maría a 37°C y sometidas a agitación constante. El pH fue medido en esta fase y nuevamente después de 24 horas. Despues de 30 min de agitación una muestra de 5 ml fue recogida.

Después las enzimas de fitasa fueron añadidas a una dosificación de 25 FYT/20 g de maíz.

35    Las muestras fueron después recogidas 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120 min, y aprox. 20 horas después de la adición de las fitasas, y el contenido de liberación de P determinado como sigue:

40    Las muestras que contenían fitasa fueron diluidas 1+4 en tampón. Despues las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min, y 1,0 ml del sobrenadante fue recogido. Se añadieron 2,0 ml de solución tampón y 2,0 ml de solución de parada MoV (véase, el ensayo de FYT del ejemplo 15). Las muestras fueron colocadas en un frigorífico a 3-5°C hasta que todas las muestras pudieron ser medidas en el espectrofotómetro a 415 nm.

El pH fue medido a las 0 y 20 horas.

45    Para las determinaciones una solución estándar o stock de fosfato de 50 mM fue usada preparada. 0.5: 1.0: 1.5 y 2.0 ml de solución stock es diluida a un volumen total de 50 ml usando el tampón. A 3.0 ml de cada solución se le añade 2,0 ml de solución de parada MoV.

50    Dos experimentos fueron conducidos: a pH 5.5 y a pH 3.5. Los resultados del análisis están mostrados en las Figs. 36 y 37 (pH 5.5 y 3.5, respectivamente). En estas figuras, el símbolo “◆” representa el experimento de control, “◆” la fitasa de *Agrocybe* y “■” la fitasa de *Aspergillus*.

#### *Resultados y discusión*

55    Las Figs. 36 y 37 muestran claramente que la fitasa de *Agrocybe* inicialmente libera fósforo del maíz molido más rápido que la fitasa de *Aspergillus* a pH 5.5 y a pH 3.5.

60    No obstante, después de 40 min. a pH 5.5 (Fig. 36) y después de 120 min. a pH 3.5 (Fig. 37), la fitasa de *Aspergillus* está aproximadamente en el mismo nivel de fosfato liberado que la fitasa de *Agrocybe*.

Pero considerando el tiempo de pasaje del sistema digestivo de por ejemplo pollos/pollos de granja, que normalmente es del orden de magnitud de 30 minutos a 2 horas, esta diferencia es ciertamente importante. Además, debe ser mencionado, que el valor del pH de 3.5 es más pertinente en este aspecto que el valor de pH 5.5.

65    Esto implica que la enzima *Agrocybe* es sorprendentemente más eficaz que la fitasa de *Aspergillus* conocida como un liberador de P en el sistema digestivo de p. ej. pollos de granja.

# ES 2 323 440 T3

## Ejemplo 18

### *Purificación y caracterización de las fitasas de Paxillus involutus y Trametes pubescens*

#### 5      *La fitasa PhvA1 de Paxillus involutus*

La fitasa phyA1 de *Paxillus involutus* fue expresada en y excretada de *Aspergillus oryzae* IFO 4177 como se describe en los Ejemplos 3 y 1.

10     Un ayudante de la filtración fue añadido al caldo de cultivo que fue filtrado a través de un tejido de filtración. Esta solución fue adicionalmente filtrada a través de una placa de filtración de profundidad de Seitz dando como resultado una solución clara. El filtrado fue concentrado por ultrafiltración en membranas de polietersulfona con un corte de 3 kDa y la fitasa fue transferida a 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 6.0 en una columna Sephadex G25. El pH del filtrado de G25 fue ajustado a pH 7.0.

15     La fitasa fue aplicada a una columna Q-Sepharose FF equilibrada en 20 mM de HEPES/NaOH, pH 7.0. La enzima resultó estar en el producto filtrado de la columna.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fue añadida al producto filtrado a una concentración final de 2.0M. Una columna Butyl Toyopearl 650S fue equilibrada en 2.0M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 mM de  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaOH}$ , pH 5.5 y la fitasa fue aplicada a esta columna y eluida con un gradiente lineal en disminución  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2.0 → 0M). Las fracciones conteniendo fitasa fueron agrupadas y el tampón fue cambiado por 20 mM de HEPES/NaOH, pH 7.5 en una columna Sephadex G25. El filtrado de G25 fue aplicado a una columna Q-Sepharose FF equilibrada en 20 mM de HEPES/NaOH, pH 7.5. Después de lavar la columna extensivamente con el tampón de equilibrio, la fitasa fue eluida con un gradiente lineal de NaCl en aumento (0 → 0.5M). La actividad fitasa fue agrupada y el tampón fue cambiado por 20 mM de Tris/ $\text{CH}_3\text{COOH}$ , pH 8.0 en una columna Sephadex G25. El filtrado de G25 fue aplicado a una columna SOURCE 30Q equilibrada en 20 mM de Tris/ $\text{CH}_3\text{OOOH}$ , pH 8.0. Después de lavar la columna íntegramente con el tampón de equilibrio, la fitasa fue eluida con un gradiente lineal en aumento de NaCl (0 - 0.3M). Las fracciones conteniendo fitasa fueron agrupadas y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fue añadido a una concentración final de 2.0M. Una columna Phenyl Toyopearl 650S fue equilibrada en 2.0M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 mM de  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaOH}$ , pH 5.5 y la fitasa fue aplicada a esta columna y eluida con un gradiente lineal en disminución  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2.0 → 0M). Las fracciones conteniendo fitasa fueron agrupadas y reapplyadas a la misma columna de Phenyl Toyopearl después de añadir  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a una concentración final de 2.0M. Las fracciones de la segunda columna de Phenyl Toyopearl fueron analizadas por SDS-PAGE y las fracciones de fitasa pura fueron agrupadas.

35     La fitasa PhyA1 de *Paxillus involutus* emigra en SDS-PAGE como una banda con  $M_r = 65$  kDa. La secuenciación de aminoácidos N-terminales del componente de 65 kDa se efectuó después de SDS-PAGE y la electrotransferencia sobre una membrana de PVDF. La siguiente secuencia de aminoácidos N-terminales podría ser deducida.

Ser-Val-Pro-Lys-Asn-Thr-Ala-Pro-Thr-Phe-Pro-Ile-Pro

40     La secuencia corresponde a los residuos de aminoácidos 21-33 en la secuencia de aminoácidos derivada de ADNc.

Por consiguiente una secuencia de aminoácidos madura de la fitasa cuando se expresa en *Aspergillus* es supuesta que sea nº. 21-442 de SEC ID nº. 26. Por consiguiente, el péptido señal predicho en la Fig. 3 no corresponde con el péptido señal real cuando esta fitasa es expresada en *Aspergillus*. Ocurre también lo mismo para las indicaciones con respecto al péptido maduro del listado de secuencias bajo los encabezamientos SEC ID Nos: 25 y 26.

#### *La fitasa PhvA2 de Paxillus involutus*

50     La fitasa PhyA2 de *Paxillus involutus* fue expresada en y excretada de *Aspergillus oryzae* IFO 4177 como se describe en los Ejemplos 3 y 1.

55     Un ayudante de la filtración fue añadido al caldo de cultivo que fue filtrado a través de un tejido de filtración. Esta solución fue adicionalmente filtrada a través de una placa de filtración de profundidad de Seitz dando como resultado una solución clara. El filtrado fue concentrado por ultrafiltración en membranas de polietersulfona con corte de 3 kDa y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fue añadido a la concentración final de 2.0M.

60     La fitasa fue aplicada a una columna de Phenyl sepharose FF equilibrada en 2.0M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 mM de  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaOH}$ , pH 5.5 y la enzima fue eluida con un gradiente lineal en disminución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2.0 → 0M). La actividad fitasa se eluyó como un único pico. Este pico fue agrupado y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fue añadido a una concentración final de 2.0M. Una columna de Butyl Toyopearl 650S fue equilibrada en 2.0M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 mM de  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaOH}$ , pH 5.5 y la fitasa fue aplicada a esta columna y eluida con un gradiente lineal en disminución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2.0 → 0M). Las fracciones conteniendo fitasa fueron agrupadas y el tampón fue cambiado por 20 mM de HEPES/NaOH, pH 7.0 en una columna Sephadex G25. El filtrado de G25 fue aplicado a una columna Q-Sepharose FF equilibrada en 20 mM de HEPES/NaOH, pH 7.0. Después del lavado de la columna extensamente con el tampón de equilibrio, la fitasa fue eluida con un gradiente lineal de NaCl en aumento (0 → 0.5M). La actividad fitasa fue agrupada y el tampón fue cambiado por 20 mM de HEPES/NaOH, pH 7.0 por dialisis. La fitasa dializada fue aplicada a una columna SOURCE 30Q equilibrada en 20 mM de HEPES/NaOH, pH 7.0. Después de lavar la columna íntegramente con el tampón de

## ES 2 323 440 T3

equilibrio, la fitasa fue eluida con un gradiente lineal de NaCl en aumento (0 → 0.3M). Las fracciones de la columna SOURCE 30Q fueron analizadas por SDS-PAGE y las fracciones de fitasa pura fueron agrupadas.

La fitasa PhyA2 de *Paxillus involutus* emigra en SDS-PAGE como una banda con  $M_r = 52$  kDa. La secuenciación de aminoácidos N-terminales del componente 52 kDa se efectuó después de SDS-PAGE y la electrotransferencia sobre una membrana de PVDF. La siguiente secuencia de aminoácidos N-terminales podía ser deducida.

Asn-Ile-Ala-Pro-Lys-Phe-

La secuencia corresponde a los residuos de aminoácidos 25-30 en la secuencia de aminoácidos derivada de ADNc.

Por consiguiente una secuencia de aminoácidos madura de la fitasa cuando se expresa en *Aspergillus* es supuesta que sea nº. 25-442 de la SEC ID nº. 28. Por consiguiente, el péptido señal predicho en la Fig. 4 no corresponde con el péptido señal real cuando esta fitasa es expresada en *Aspergillus*. Ocurre también lo mismo para las indicaciones que respectan al péptido maduro del listado de secuencias bajo los encabezamientos de las SEC ID Nos: 27 y 28.

### La fitasa de *Trametes pubescens*

La fitasa de *Trametes pubescens* fue expresada en y se excreta de *Aspergillus oryzae* IFO 4177.

Un ayudante de la filtración fue añadido al caldo de cultivo que fue filtrado a través de un tejido de filtración. Esta solución fue adicionalmente filtrada a través de una placa de filtración de profundidad de Seitz dando como resultado una solución clara. El filtrado fue concentrado por ultrafiltración en membranas de polietersulfona con corte de 10 kDa seguido de diafiltración con agua destilada para reducir la conductividad. El pH de la enzima concentrada fue ajustado a pH 6.0 y la conductividad fue ajustada a aquella de 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 6.0 por dilución con agua desionizada.

La fitasa fue aplicada a una columna Q-Sepharose FF equilibrada en 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 6.0 y la enzima fue eluida con un gradiente lineal de NaCl en aumento (0 → 0.5M). La actividad fitasa eluida como un único pico. Este pico fue agrupado y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fue añadido a una concentración final de 2.0M. Una Butyl Toyopearl 650S fue equilibrada en 2.0M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 mM de  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaOH}$ , pH 5.5 y la fitasa fue aplicada a esta columna y eluida con un gradiente lineal en disminución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2.0 → 0M). Las fracciones conteniendo fitasa fueron agrupadas y el tampón fue cambiado por 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 6.5 en una columna Sephadex G25. El filtrado de G25 fue aplicado a una columna Q- sepharose FF equilibrada en 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 6.5. Despues de lavar la columna extensivamente con el tampón de equilibrio, la fitasa fue eluida con un gradiente lineal de NaCl en aumento (0 - 0.3M). La actividad fitasa fue agrupada y el tampón fue cambiado por 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 7.0 en una columna Sephadex G25. El filtrado de G25 fue aplicado a una columna SOURCE 30Q equilibrada en 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 7.0. Despues de lavar la columna íntegramente con el tampón de equilibrio, la fitasa fue eluida con un gradiente lineal de NaCl en aumento (0 → 0.2M). Las fracciones de la columna SOURCE 30Q fueron analizadas por SDS-PAGE y las fracciones de fitasa pura fueron agrupadas.

La fitasa de *Trametes pubescens* emigra en SDS-PAGE como una banda con  $M_r = 57$  kDa. La secuenciación de aminoácidos N-terminales del componente de 57 kDa se efectuó después de SDS-PAGE y la electrotransferencia sobre una membrana de PVDF. La siguiente secuencia de aminoácidos N-terminales podía ser deducida.

Xxx-Ala-Cys-Leu-Asp-Val-Thr-Arg-Asp-(Ala/Val)-Gln

La secuencia corresponde a los residuos de aminoácidos 31-41 en la secuencia de aminoácidos derivada de ADNc.

Por consiguiente una secuencia de aminoácidos madura de la fitasa cuando se expresa en *Aspergillus* es supuesta que sea nº. 31-443 de SEC ID nº. 30. Por consiguiente, el péptido señal predicho en la Fig. 5 no corresponde con el péptido señal real cuando esta fitasa es expresada en *Aspergillus*. Ocurre también lo mismo para las indicaciones que se refieren al péptido maduro del listado de secuencias bajo los encabezamientos de las SEC ID Nos: 29 y 30.

Los pesos moleculares (kDa) de las tres fitasas de *Trametes pubescens* y PhyA2 y PhyA1 de *Paxillus involutus* son 65, 55 y 65 kDa, respectivamente.

Los perfiles de pH de estas tres fitasas son similares a Figs. 8 y 23 para las fitasas de *Peniophora* y de *Agrocybe* (pH óptimo alrededor de 5-6; muy poca actividad a pH por encima de 7). En comparación con la fitasa conocida de *Aspergillus ficuum* (en esta prueba con una temperatura óptima alrededor de 50°C) PhyA1 de *Paxillus involutus* tiene una temperatura óptima ligeramente más alta alrededor de 60°C, mientras que PhyA2 tiene una temperatura óptima alrededor de 40°C. La termoestabilidad de la fitasa phyA1 de *Paxillus involutus* es comparable a aquella de la fitasa de *Aspergillus ficuum*, y mejor que aquella de la fitasa PhyA2 de *Paxillus involutus* y la fitasa de *Trametes pubescens*. Despues de 60 minutos de incubación a 70°C y 80°C, respectivamente, la actividad residual de PhyA1 está alrededor del 60% y 40%, respectivamente.

En DSC, Td's alrededor de 48°C, 59°C y 55°C son encontradas para las fitasas PhyA2 y PhyA1 de *Paxillus involutus* y para la fitasa de *Trametes pubescens*, respectivamente.

Las actividades específicas son sorprendentemente altas para todas estas fitasas, es decir, 1450, 1370 y 810 FYT/mg de proteína enzimática para las fitasas de *Trametes pubescens*, PhyA2 y PhyA1 de *Paxillus involutus*, respectivamente ( $A_{280}$  de 3.58, 5.72 y 3.08; FYT/ml de 5184, 7808 y 2497. Coeficiente de extinción asumido de 1 l/(g x cm), respectivamente).

5

### Referencias citadas en la descripción

*Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector.*

10 *No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.*

### Documentos de Patentes citados en la descripción

- 15 • AU 2484095 A [0015]
- EP 0420358 A [0016]
- EP 0684313 A [0016]
- 20 • WO 9114782 A [0092]
- WO 9114772 A [0092]
- 25 • US 9507743 W [0098]
- WO 9311249 A [0145] [0197] [0200] [0202]
- WO 9414953 A [0145] [0200] [0202] [0203] [0214] [0226]
- 30 • EP 238023 A [0197]
- WO 9502043 A [0217]

### 35 Bibliografía distinta de Patentes citada en la descripción

- THOMLINSON *et al. Biochemistry*, 1962, vol. 1, 166-171 [0013]
- BARRIENTOS *et al. Plant. Physiol.*, 1994, vol. 106, 1489-1495 [0013]
- 40 • PAVER JAGANNATHAN *Journal of Bacteriology*, 1982, vol. 151, 1102-1108 [0014]
- COSGROVE *Australian Journal of Biological Sciences*, 1970, vol. 23, 1207-1220 [0014]
- 45 • GREINER *et al. Arch. Biochem. Biophys.*, 1993, vol. 303, 107-113 [0014]
- NAYINI *et al. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 1984, vol. 17, 24-26 [0015]
- 50 • WODZINSKI *et al. Adv. Appl. Microbiol.*, vol. 42, 263-303 [0015]
- YAMADA *et al. Agric. Biol. Chem.*, 1986, vol. 322, 1275-1282 [0016]
- PIDDINGTON *et al. Gene*, 1993, vol. 133, 55-62 [0016]
- 55 • Die Nahrung, 1995, vol. 39, no. 5, 6. 483-489 [0017]
- Mycological Research, 1993, vol. 97, no. 6. 725-732 [0018]
- Biochem. J., 1989, vol. 258, 1-2 [0023]
- 60 • Gene, 1993, vol. 133, 55-62 [0026]
- Gene, 1993, vol. 127, 87-94 [0026]
- 65 • JÜLICH Higher Taxa of Basidiomycetes, 1981, [0033]
- AINSWORTH BISBY Dictionary of the Fungi 1995. [0033]

## ES 2 323 440 T3

- Nordic Macromycetes 1992. vol. 2, [0033]
- NORDIC MACROMYCETES 1997. vol. 3, [0033]
- 5 • NEEDLEMAN, S.B. WUNSCH, C.D. *Journal of Molecular Biology*, 1970, vol. 48, 443-453 [0047] [0055]
- EGNELL, P. *et al. Molecular Microbiol.*, 1992, vol. 6, no. 9. 1115-19 [0052]
- 10 • STRYER, L. Biochemistry W.H., Freeman and Company [0052]
- J. SAMBROOK E.F. FRITSCH T. MANIATIS Molecular Cloning, A Laboratory Manual *Cold Spring Harbor* 1989. [0056]
- 15 • FEINBERG, A. P. VOGELSTEIN, B. *Anal. Biochem.*, 1983, vol. 132, 6-13 [0056]
- Current protocols in Molecular Biology John Wiley and Sons 1995. [0062] [0063] [0191]
- 20 • SAMBROOK *et al.* Molecular Cloning. A Laboratory Manual *Cold Spring Harbor* 1989. [0070]
- HAWKSWORTH *et al.* Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi CAB International, University Press 1995. [0078]
- 25 • TAGUE *et al. Plant Phys.*, 1988, vol. 86, 506- [0088]
- GASSER *et al. Science*, vol. 244, 1293- [0089]
- 30 • POTRYKUS *Bio/Techn.*, 1990, vol. 8, 535- [0089]
- SHIMAMOTO *et al. Nature*, 1989, vol. 338, 274- [0089]
- HOOYKAS SCHILPEROORT *Plant Mol. Biol.*, 1992, vol. 19, 15- 38 [0093]
- 35 • CHRISTOU *Plant J.*, 1992, vol. 2, 275-281 [0093]
- SHIMAMOTO *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1994, vol. 5, 158-162 [0093]
- VASIL *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 667-674 [0093]
- 40 • JOSHI JOSHI *FEBS Lett.*, 1991, vol. 281, 1-8 [0094]
- POTYRKUS *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1991, vol. 42, 205-225 [0094]
- CROSSWAY *et al. Mol. Gen. Genet.*, 1986, vol. 202, 79-85 [0094]
- 45 • DE LA PENA *et al. Nature*, 1987, vol. 325, 274-276 [0094]
- PIETRZAK *et al. Nucleic Acids Res.*, 1986, vol. 14, 5857-5868 [0095]
- 50 • AKAMA *et al. Plant Cell Reports*, 1992, vol. 12, 7-11 [0095]
- ZUPAN ZAMBRYSKI *Plant Physiol.*, 1995, vol. 107, 1041-1047 [0095]
- DEBLAERE *et al. Nucleic Acids Res.*, 1985, vol. 13, 4777-4788 [0095]
- 55 • KLEE *et al. Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1987, vol. 38, 467-486 [0095]
- FRANCK *et al. Cell*, 1980, vol. 21, 285-294 [0096]
- STITT SONNEWALD *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1995, vol. 46, 341-368 [0096]
- 60 • EDWARDS CORUZZI *Annu. Rev. Genet.*, 1990, vol. 24, 275-303 [0096]
- ITO *et al. Plant Mol. Biol.*, 1994, vol. 24, 863-878 [0096]
- 65 • SAMBROOK *et al.* Molecular cloning: A laboratory manual *Cold Spring Harbor* lab. 1989. [0138] [0191] [0204] [0209] [0222] [0234] [0246]
- The Merck Veterinary Manual Merck & CO., Inc. 1991. 1268- [0156]

# ES 2 323 440 T3

- **JEROCH** *et al. Bodenkultur*, 1994, vol. 45, no. 4. 361-368 [0156]
- **POULTRY Science**, 1996, vol. 75, no. 1.62-68 [0156]
- 5 • *Canadian Journal of Animal Science*, 1995, vol. 75, no. 3. 439-444 [0156]
- **POULTRY Science**, 1995, vol. 74, no. 5. 784-787 [0156]
- 10 • **POULTRY Science**, 1994, vol. 73, no. 10. 1590-1596 [0156]
- Molecular Biological Methods for *Bacillus* *John Wiley and Sons* 1990. [0191]
  - VAN DEN HAZEL, H.B. **KIELLAND-BRANDT**, M.C. **WINTHER**, J.R. *Eur. J. Biochem.*, 1992, vol. 207, 277-283 [0195]
- 15 • H. **DALBOEGE** *et al. Mol. Gen. Genet.*, 1994, vol. 243, 253-260 [0200] [0202]
- **GUBLER HOFFMAN Gene**, 1983, vol. 25, 263-269 [0204]
- 20 • **BECKER GUARANTE** *Methods Enzymol.*, 1991, vol. 194, 182-187 [0210]
- **TOVE CHRISTENSEN** *et al. Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 1419-1422 [0218]
- 25 • **COVE Biochem. Biophys. Acta**, 1966, vol. 113, 51-56 [0218]
  - HENRIK NIELSEN JACOB **ENGELBRECHT** STREN **BRUNAK** GUNNAR VON **HEIJNE** Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites *Protein Engineering*, 1997, vol. 10, 1-6 [0269]
- 30 • **SAMBROOK** *et al. Molecular Cloning, a Laboratory Manual* [0289]
- **LUBERT STRYER** *Biochemistry* Freeman and Company 1995. 132-134 [0289]
- 35 • R.H. **DON** *et al. Nucleic Acid Research*, 1991, vol. 19, no. 14. [0298]
- **SCHOLZ**, P. **BERGMANN**, G. **MAYR**, G.W. *Methods in Inositide Research Raven Press, Ltd.* 1990. 65-82 [0331] [0413]
- 40 • VAN DER KAAJ *et al. Biochem. J.*, 1995, vol. 312, 907-910 [0352]
- **IRVING** *et al. J. Bacteriology*, 1972, vol. 112, 434-438 [0352]
- **STEVENS**, L.R. *Methods in Inositide Research Raven Press, Ltd.* 1990. 9-30 [0352]
- 45 • **STEPHENS**, L. *et al. Biochem. J.*, 1988, vol. 249, 271-282 [0352]

50

55

60

65

# ES 2 323 440 T3

## REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado que presenta actividad fitasa,

- 5           i) el polipéptido comprendiendo I-Q-R-H-G-A-R-[F/W]-P-T-S-G-A-X-X-R (SEC ID N°: 3), N-W-T-[A/E]-G-F-X-X-A-S (SEC ID N°: 5), y F-V-E-S-Q- X-[Y/F]-A-R-X-X-G-X-G-D-F-[E/A]-K-C (SEC ID N°: 9), donde "X" se refiere a cualquier aminoácido; o
- 10          ii) el polipéptido que tiene un grado de identidad de al menos el 50% a la parte del polipéptido maduro de bien una de la SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 24, SEC ID NO: 26, SEC ID NO: 28, o SEC ID NO: 30.

15          2. Polipéptido según la reivindicación 1 donde el grado de identidad es al menos el 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90%, 95%, o al menos un 97%.

16          3. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 comprendiendo al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos, haciendo referencia al alineamiento en la Fig. 7 y usando la numeración correspondiente a *phyA\_P\_lycii*:

- 20          (SEC ID NO: 1) en la posición 46 a 57  
              (SEC ID NO: 2) en la posición 64 a 80  
25          (SEC ID NO: 3) en la posición 68 a 83  
              (SEC ID NO: 4) en la posición 155 a 167  
              (SEC ID NO: 5) en la posición 162 a 171  
30          (SEC ID NO: 6) en la posición 166 a 177  
              (SEC ID NO: 7) en la posición 358 a 373  
35          (SEC ID NO: 8) en la posición 395 a 405  
              (SEC ID NO: 9) en la posición 415 a 433  
              (SEC ID NO: 10) en la posición 162 a 167  
40          (SEC ID NO: 11) en la posición 273 a 278  
              (SEC ID NO: 12) en la posición 271 a 277  
45          (SEC ID NO: 13) en la posición 428 a 432  
              (SEC ID NO: 14) en la posición 64 a 69.

50          4. Polipéptido según la reivindicación 3 comprendiendo al menos uno de los siguientes conjuntos de secuencias de aminoácidos:

- 55          (SEC ID NO: 10) y (SEC ID N°: 12); o  
              (SEC ID NO: 10) y (SEC ID N°: 13); o  
              (SEC ID NO: 14) y (SEC ID N°: 10); o  
              (SEC ID NO: 14) y (SEC ID N°: 12); o  
60          (SEC ID NO: 14) y (SEC ID N°: 13); o  
              (SEC ID NO: 11) y (SEC ID N°: 13).

# ES 2 323 440 T3

5. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que comprende una secuencia de aminoácidos que cumple una o más de las siguientes condiciones, haciéndose referencia al alineamiento en la Fig. 7 y usando la numeración correspondiente a *phyA\_P\_lycii*:

- 5           (a) hay 10 residuos de aminoácidos entre P46 y P57;  
             (b) hay 9 residuos de aminoácidos entre F167 y P177;  
10          (c) hay 10 residuos de aminoácidos entre P177 y N188;  
             (d) hay 6 residuos de aminoácidos entre C196 y D203;  
             (e) hay 17 residuos de aminoácidos entre L353 y P371.

15          6. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los residuos -26-427; -2-427, 1-427, 2-427 y 5-427 de la SEC ID NO 22; y/o que es codificada por

- 20           (i) nucleótidos 17-1375: 89-1375: 95-13375: 98-1375 o 107-1375 de SEC ID NO 21.0  
             (ii) la secuencia de ADN clonada en el plásmido pYES 2.0 presente en *Escherichia coli* DSM 11313.

25          7. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los residuos -19-423, 1-423, y 2-423 de la SEC ID NO 26; y/o que es codificada por

- 30           (i) nucleótidos 58-1383: 115-1383 y 118-1383 de la SEC ID NO 25. o  
             (ii) la secuencia de ADN clonada en el plásmido pYES 2.0 presente en *Escherichia coli* DSM 11842.

35          8. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los residuos -19-423, 1-423, y 6-423 de la SEC ID NO 28; y/o que es codificada por

- 40           (i) nucleótidos 48-1373: 105-1373 o 120-1373 de la SEC ID NO 27. o  
             (ii) la secuencia de ADN clonada en plásmido pYES 2.0 presente en *Escherichia coli* DSM 11843.

45          9. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los residuos -17-426, 1-426, y 14-426 de la SEC ID NO 30. y/o que es codificada por

- 50           (i) nucleótidos 79-1407: 130-1407 o 169-1407 de la SEC ID NO 29. o  
             (ii) la secuencia de ADN clonada en plásmido pYES 2.0 presente en *Escherichia coli* DSM 11844.

55          10. Molécula de ADN que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

55          11. Molécula de ADN según la reivindicación 10 que codifica un polipéptido que presenta actividad fitasa y que comprende al menos una de las siguientes secuencias de ADN

55           5' - AAY TGG ACN GMN GGN TT - 3'

60           (residuos 10-26 de SEC ID NO: 15)

65           5' - GAY AAR TWY GGN AC-3'

65           (residuos 10-23 de SEC ID NO: 16)

65           5' - CAR GTN MAY MTN ATH CA-3'

65           (residuos 10-26 de SEC ID NO: 19)

# ES 2 323 440 T3

donde

N se refiere a cualquiera de A, C, G, T;

5 R se refiere a cualquiera de A y G;

Y se refiere a cualquiera de C y T;

10 M se refiere a cualquiera de A y C; y

W se refiere a cualquiera de A y T.

12. Molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, y que comprende una secuencia de ADN  
15 seleccionada de las siguientes:

(i) nucleótidos 17-1375, 89-1375, 95-1375, 98-1375, o 107-1375 de la SEC ID NO 21.0

(ii) nucleótidos 58-1383, 115-1383, o 118-1383 de la SEC ID NO 25, o

20 (iii) nucleótidos 48-1373, 105-1373 o 120-1373 de la SEC ID NO o

(iv) nucleótidos 79-1407, 130-1407 o 169-1407 de la SEC ID NO 29; o

25 (v) las secuencias de ADN clonadas en el plásmido pYES 2.0 presente en cualquiera de *Escherichia coli* DSM 11312, 11313, 11842, 11843, o 11844.

13. Molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, que codifica un polipéptido comprendiendo

30 (i) residuos -26-427; -2-427; 1-427; 2-427; o 5-427 de la SEC ID NO 22; o

(ii) residuos -19-423; 1-423; o 2-423 de la SEC ID NO 26; o

35 (iii) residuos -19-423; 1-423; o 6-423 de la SEC ID NO 28; o

(iv) residuos -17-426, 1-426, o 14-426 de la SEC ID NO 30.

40 14. Vector que comprende la molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 10-13.

15. Célula huésped que comprende la molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 10-13 o el vector  
según la reivindicación 14.

45 16. Proceso para preparar un polipéptido que presenta actividad fitasa, el proceso comprendiendo el cultivo de la  
célula huésped según la reivindicación 15 bajo condiciones que permiten la producción del polipéptido, y la recuperación  
del polipéptido del caldo de cultivo.

50 17. Planta transgénica o parte de la planta, que lleva (a) una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 10-13, o (b) una molécula de ADN que codifica un polipéptido que presenta actividad fitasa, donde la molécula  
de ADN comprende

(i) una secuencia de ADN que codifica los residuos -30-409; o 1-409 de la SEC ID NO:24; o

55 (ii) nucleótidos 123-1439 o 213-1439 de la SEC ID NO:23; o

(iii) la secuencia de ADN clonada en plásmido pYES 2.0 presente en *Escherichia coli* DSM 11312; para expresar o producir la fitasa codificada.

60 18. Alimento o pienso que comprende al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o al menos  
una planta transgénica o parte de la planta según la reivindicación 17.

19. Proceso para preparar un alimento o pienso según la reivindicación 18, donde al menos un polipéptido o planta  
65 o parte de la planta se añade a los alimentos o componentes alimentarios.

20. Composición comprendiendo al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

## ES 2 323 440 T3

21. Composición según la reivindicación 20 que contiene otras enzimas mejoradoras de alimentos o piensos.
22. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 20-21 que es un aditivo de pienso.
- 5 23. Proceso para reducir los niveles de fitato en abono animal comprendiendo alimentar un animal con una cantidad eficaz de pienso según la reivindicación 18.
- 10 24. Uso del polipéptido de cualquiera de reivindicaciones 1-9 o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 20-22 para liberar fósforo de un sustrato de fitasa; o para mejorar la utilización del alimento o pienso.
- 15 25. *Escherichia coli* DSM nº. 11312, *Escherichia coli* DSM nº. 11313, *Escherichia coli* DSM nº. 11842, *Escherichia coli* DSM nº. 11843, o *Escherichia coli* DSM nº. 11844.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 323 440 T3

Fig. 1

ES 2 323 440 T3

**Fig. 2**

ES 2 323 440 T3

**Fig. 3**

ES 2 323 440 T3

Fig. 4

ES 2 323 440 T3

**Fig. 5**

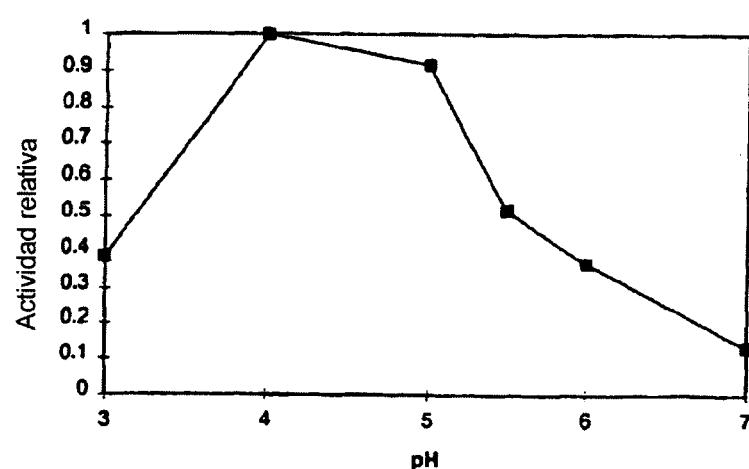
ES 2 323 440 T3

**Fig. 6**

ES 2 323 440 T3

Fig. 7

**Perfil de pH de fitasa de Peniophora, 5mM fitato, 30 min a 37°C**



**Fig. 8**

**Estabilidad del pH de fitasa de Peniophora  
- preincubación 1 h a 40°C**

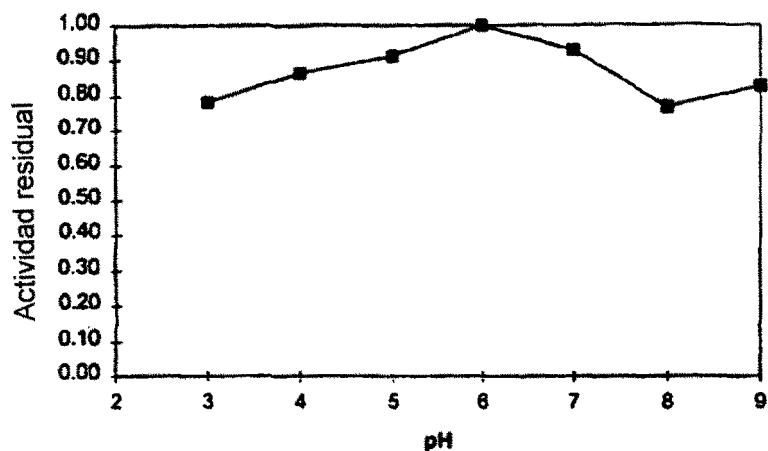
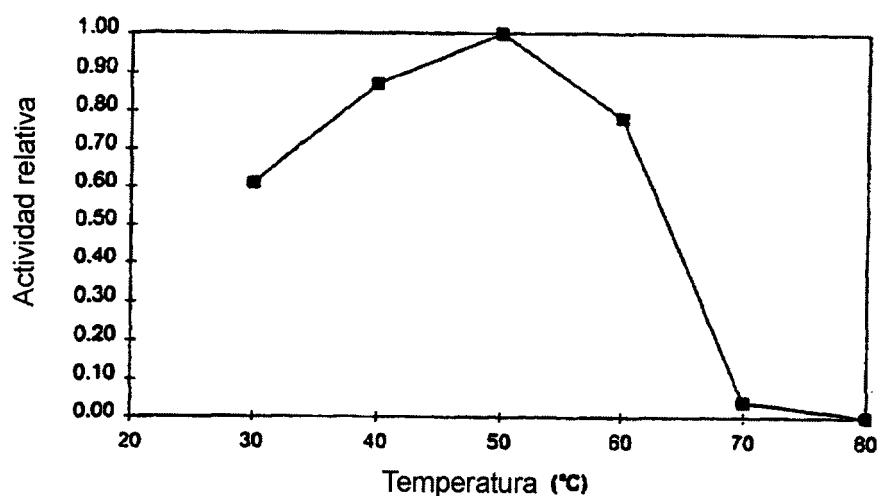


Fig. 9

**Perfil de temperatura de fitasa de Peniophora  
0,1M acetato de Na , 5mM de fitato, pH 5.5, 30 min**



**Fig. 10**

**Estabilidad de la temperatura de fitasa de Peniophora -  
preincubación 60 min en 0,1 M de acetato de Na**

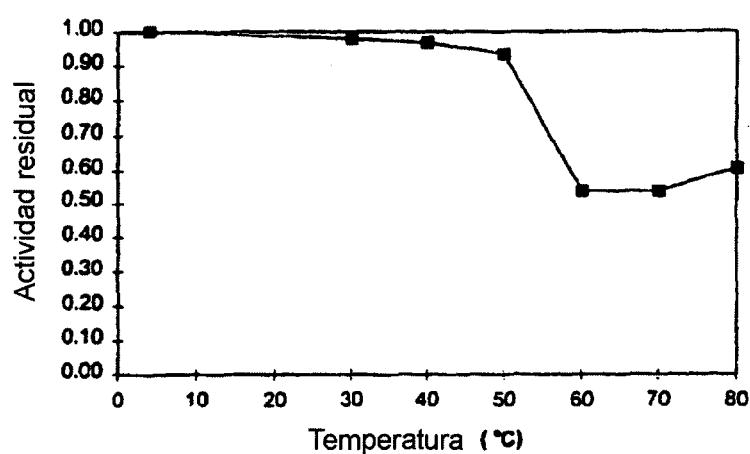


Fig. 11

DSC de fitasa de Peniophora en 0,1 M de acetato de sodio, pH 5.5

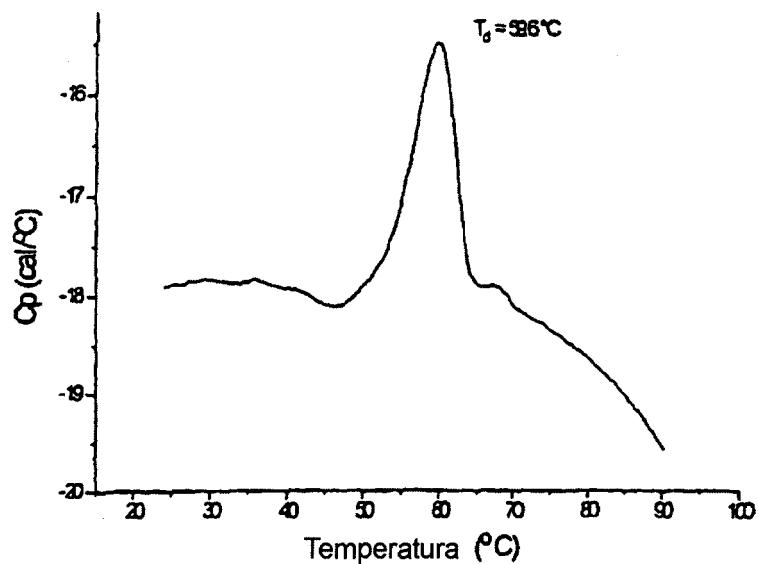


Fig. 12

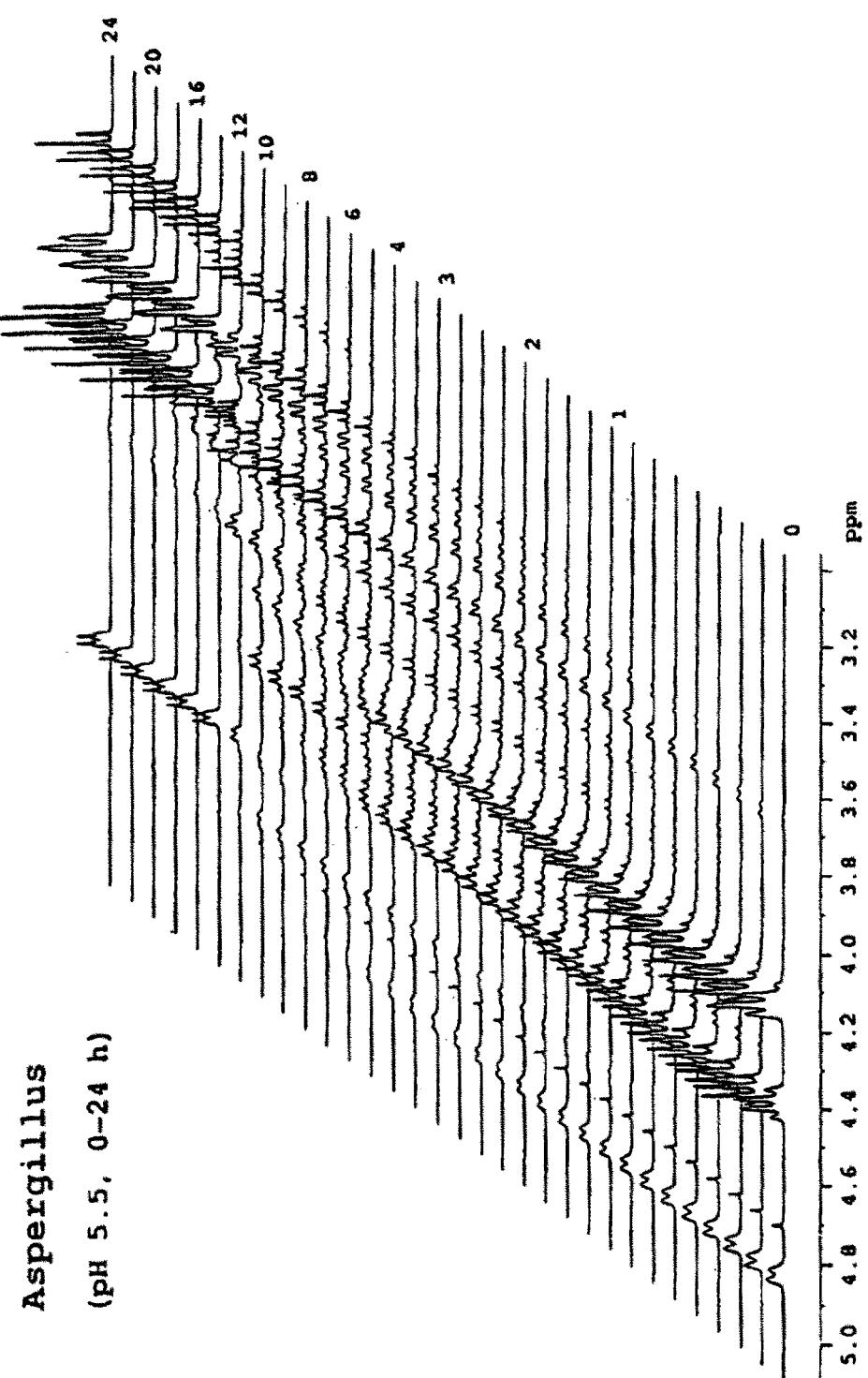


Fig. 13

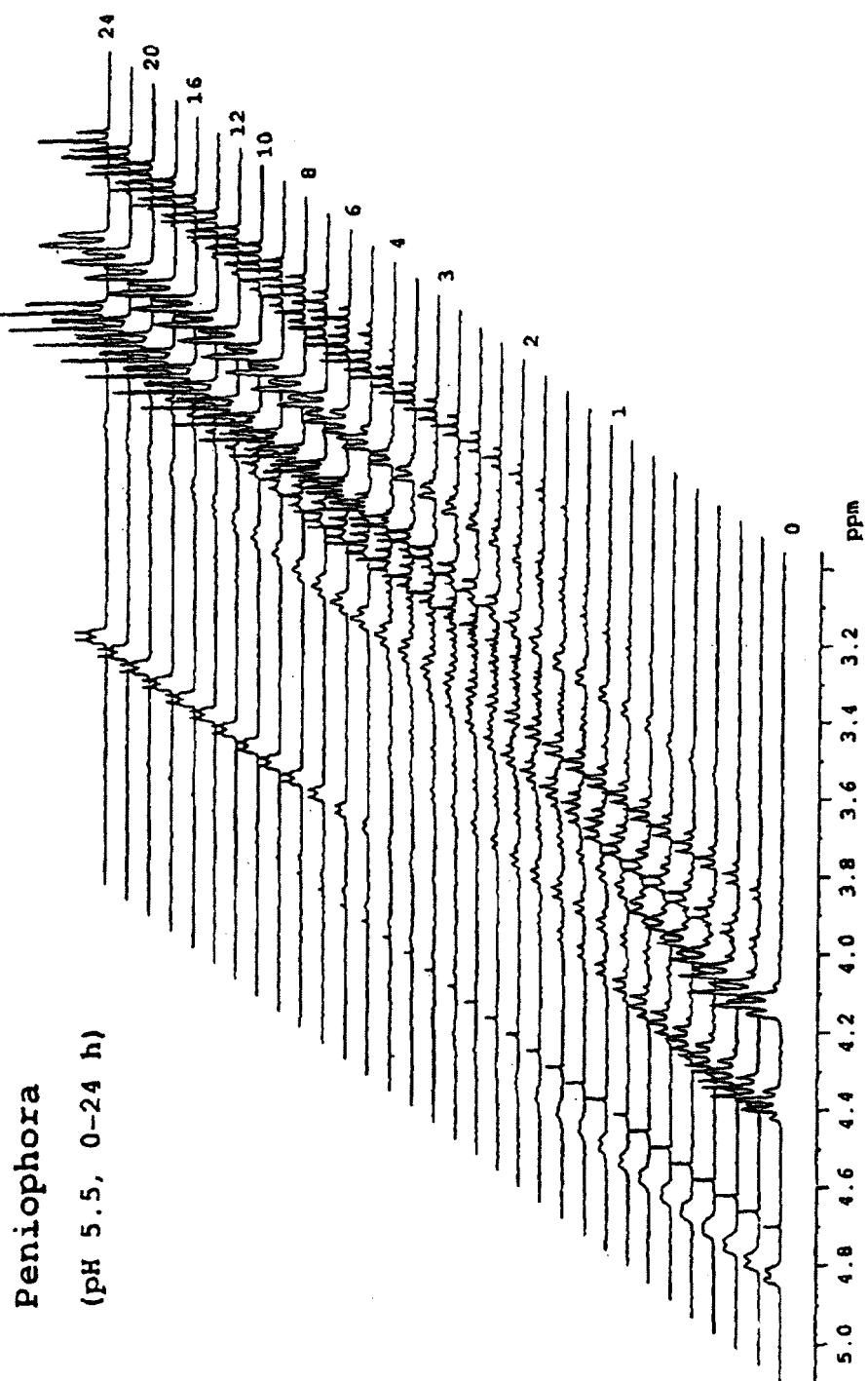


Fig. 14

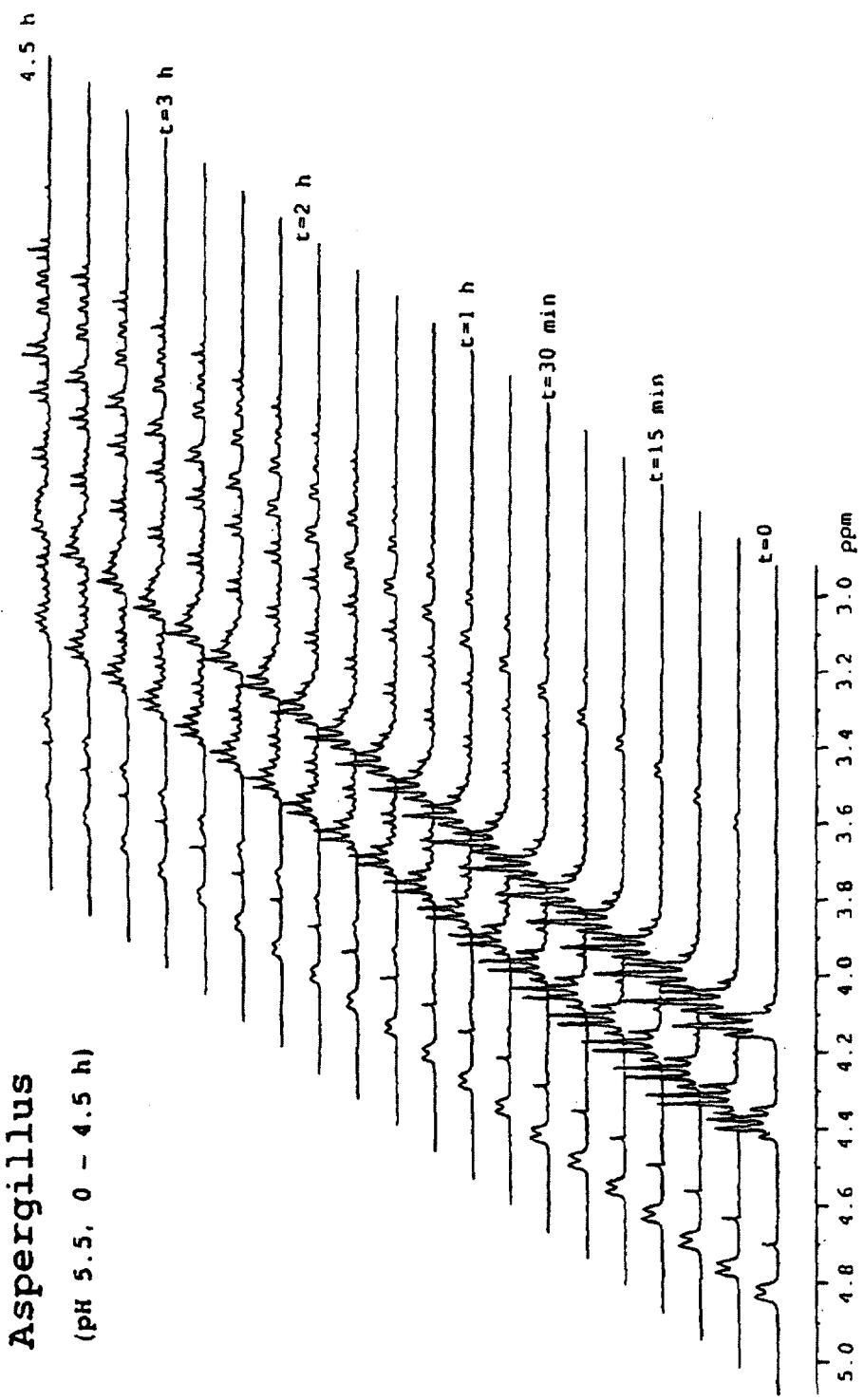


Fig. 15

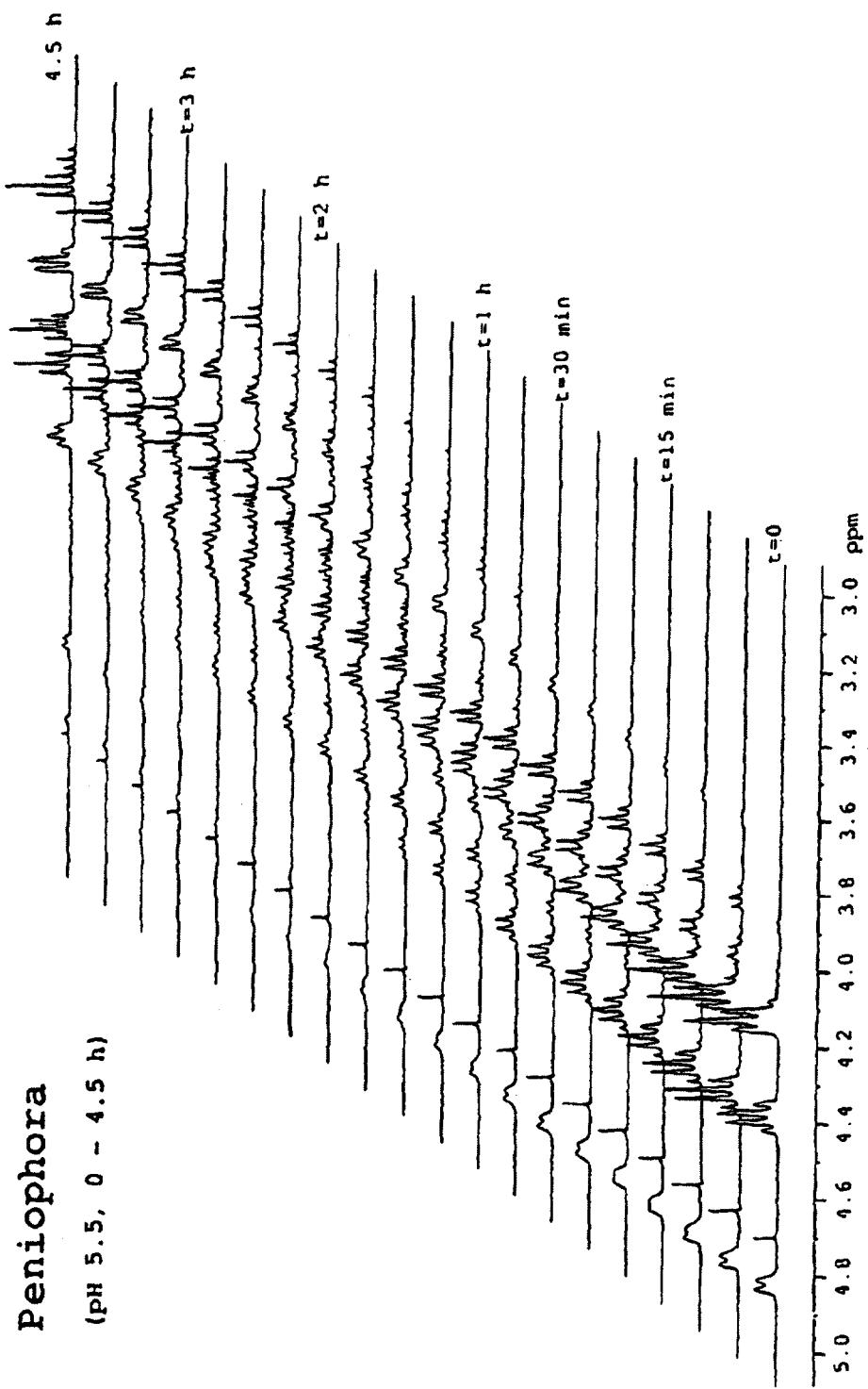


Fig. 16

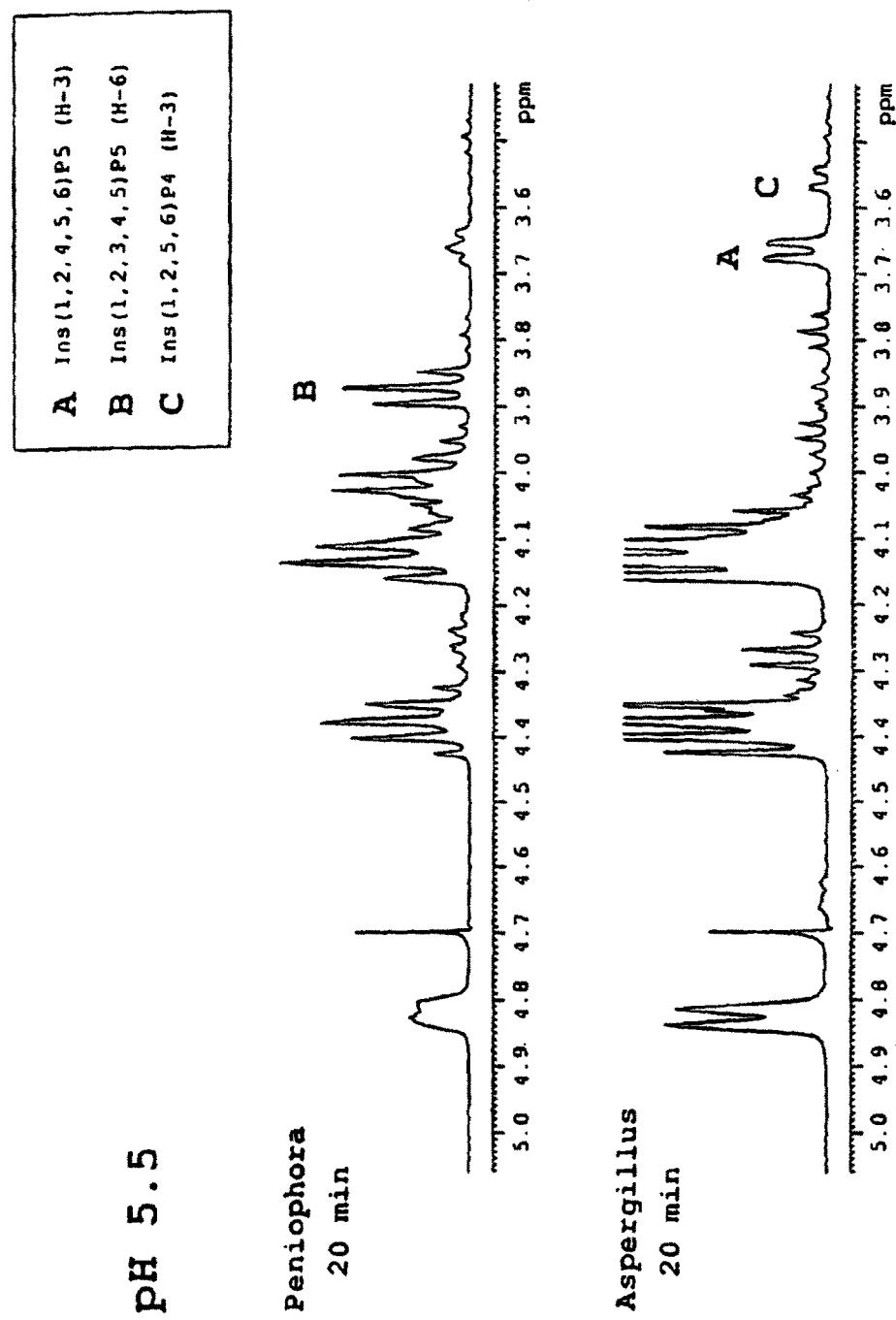


Fig. 17

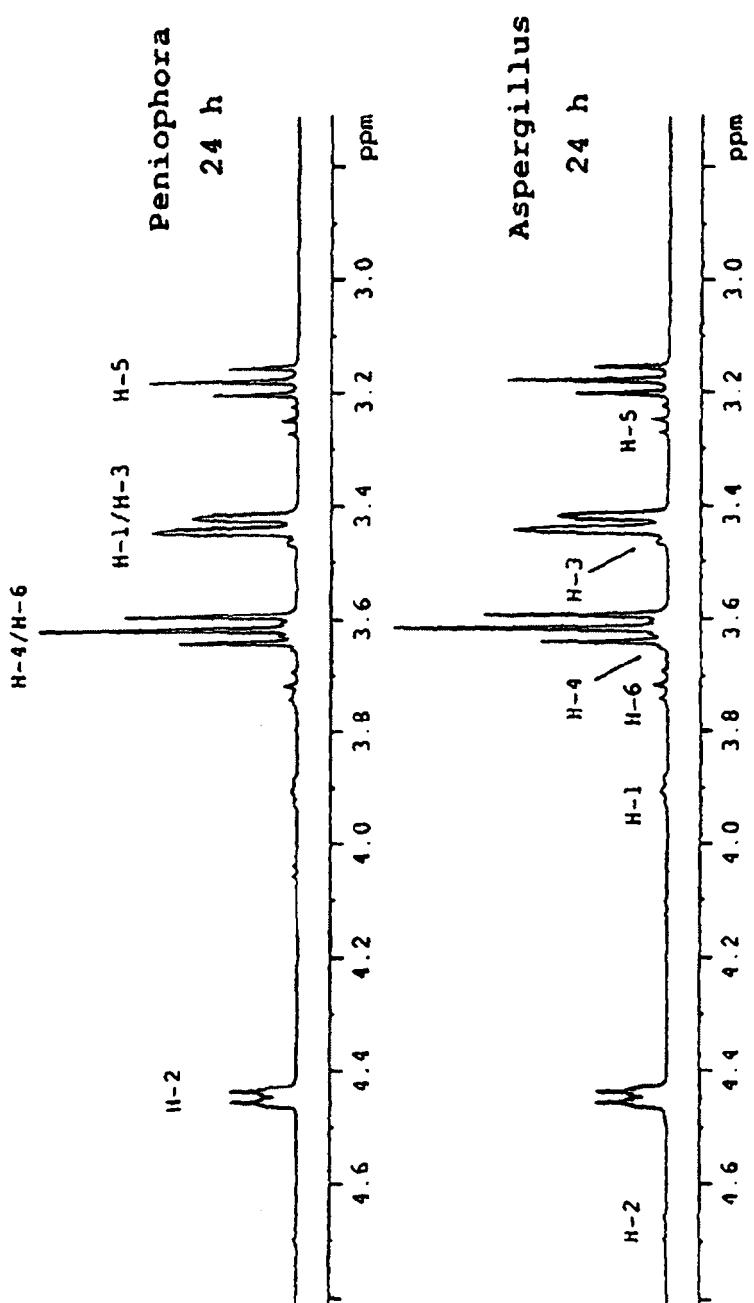


Fig. 18

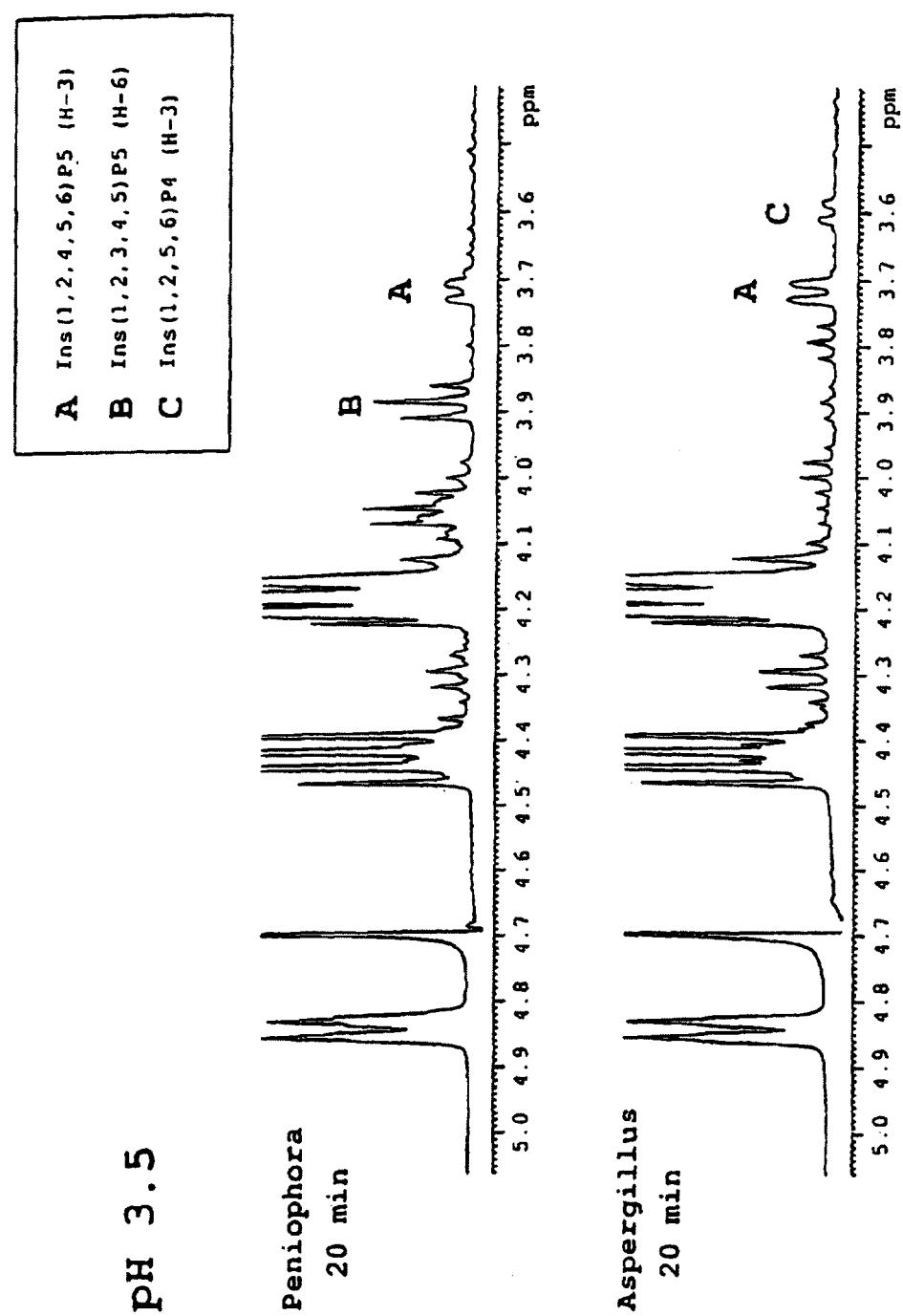


Fig. 19

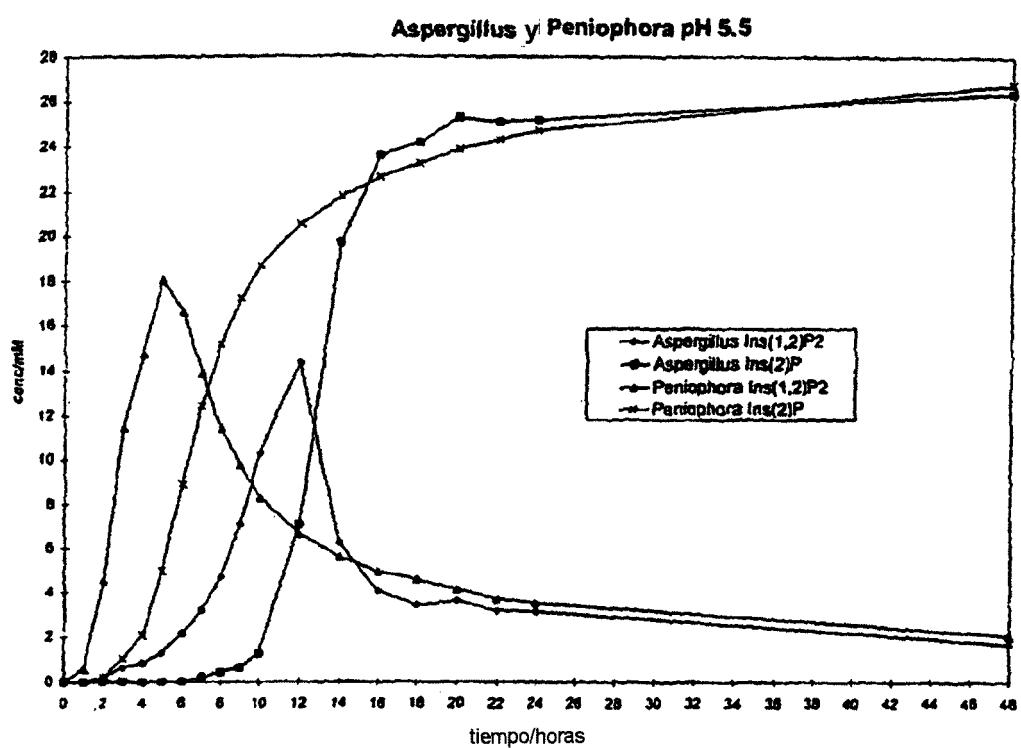


Fig. 20

ES 2 323 440 T3

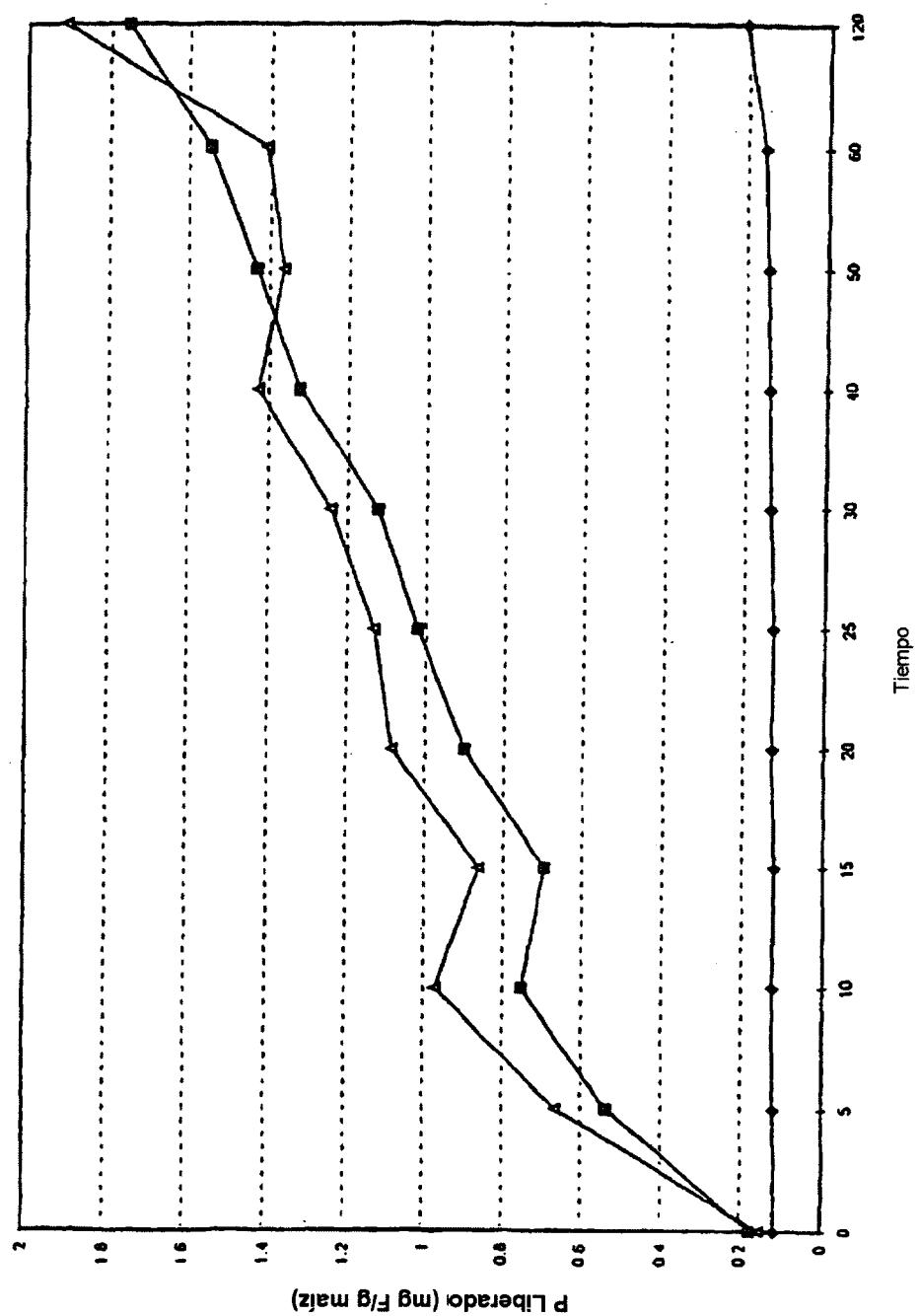


Fig. 21

ES 2 323 440 T3

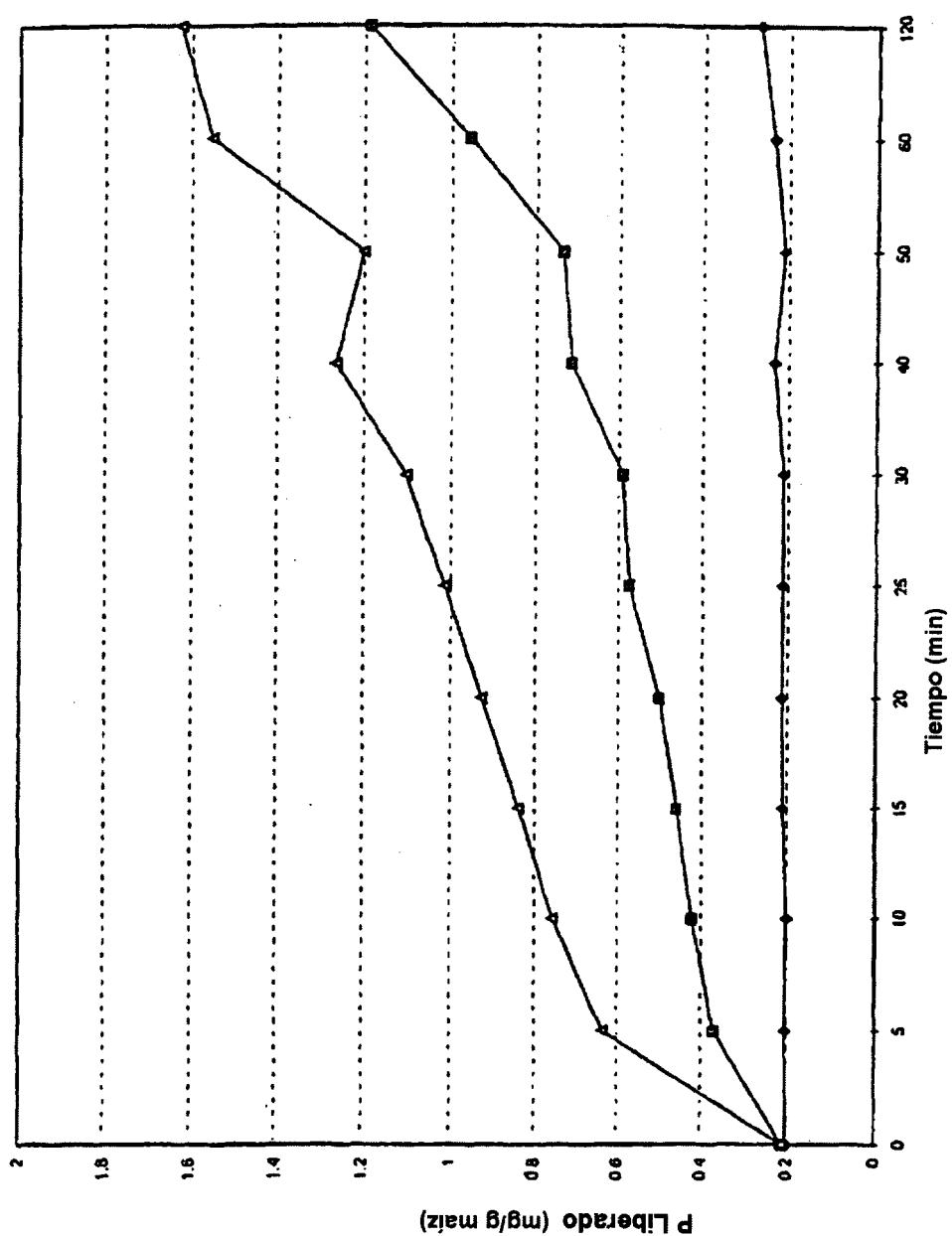


Fig. 22

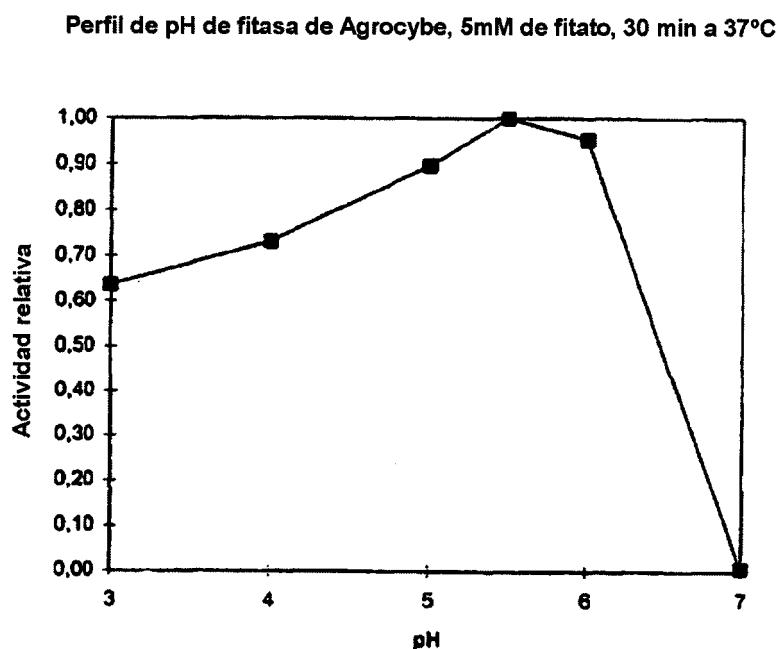


Fig. 23

Estabilidad del pH de fitasa de Agrocybe  
preincubación 1 h a 40°C

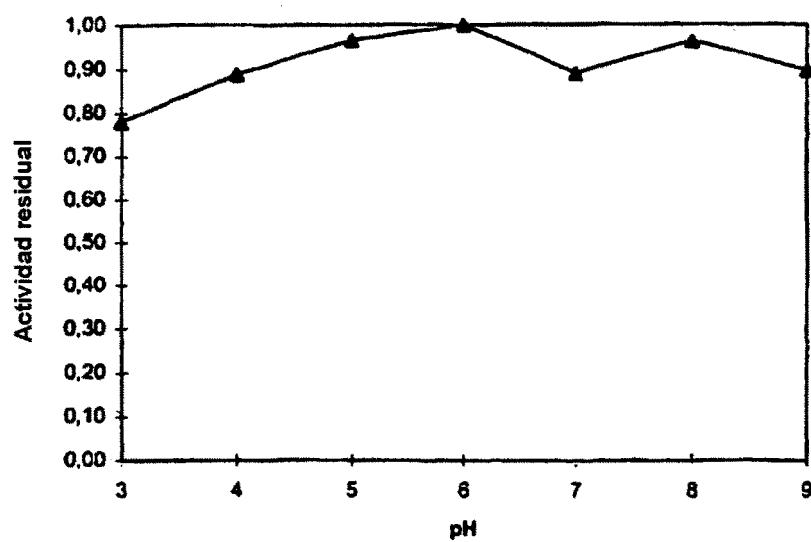


Fig. 24

Perfil de temperatura de fitasa de Agrocybe en 0,1 M de acetato sódico,  
5 mM de fitato, pH 5,5

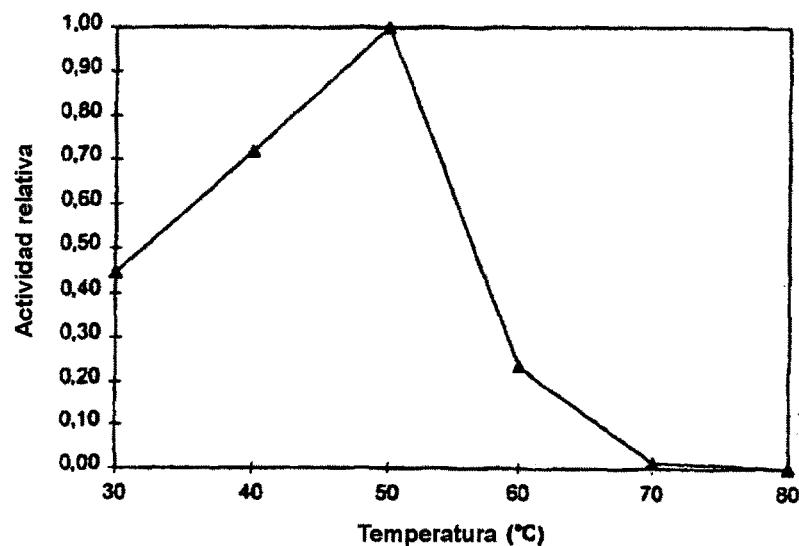
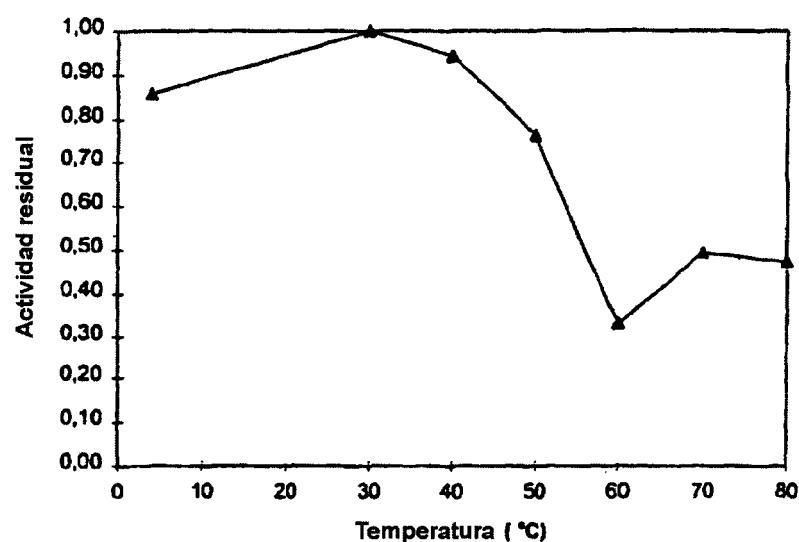


Fig. 25

**Estabilidad de la temperatura de fitasa de Agrocybe -  
preincubación 60 min en 0,1 M de acetato sódico pH 5,5**



**Fig. 26**

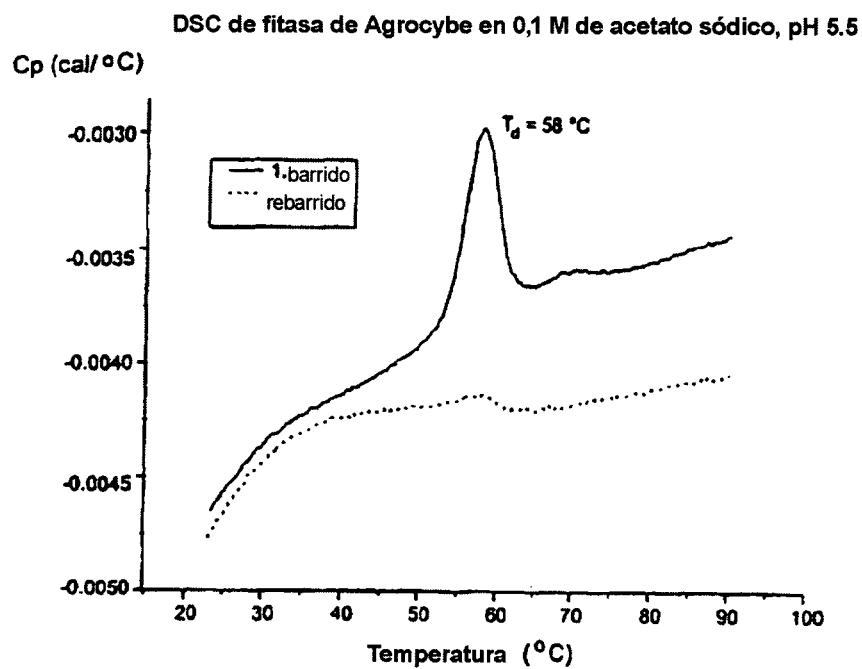


Fig. 27

ES 2 323 440 T3

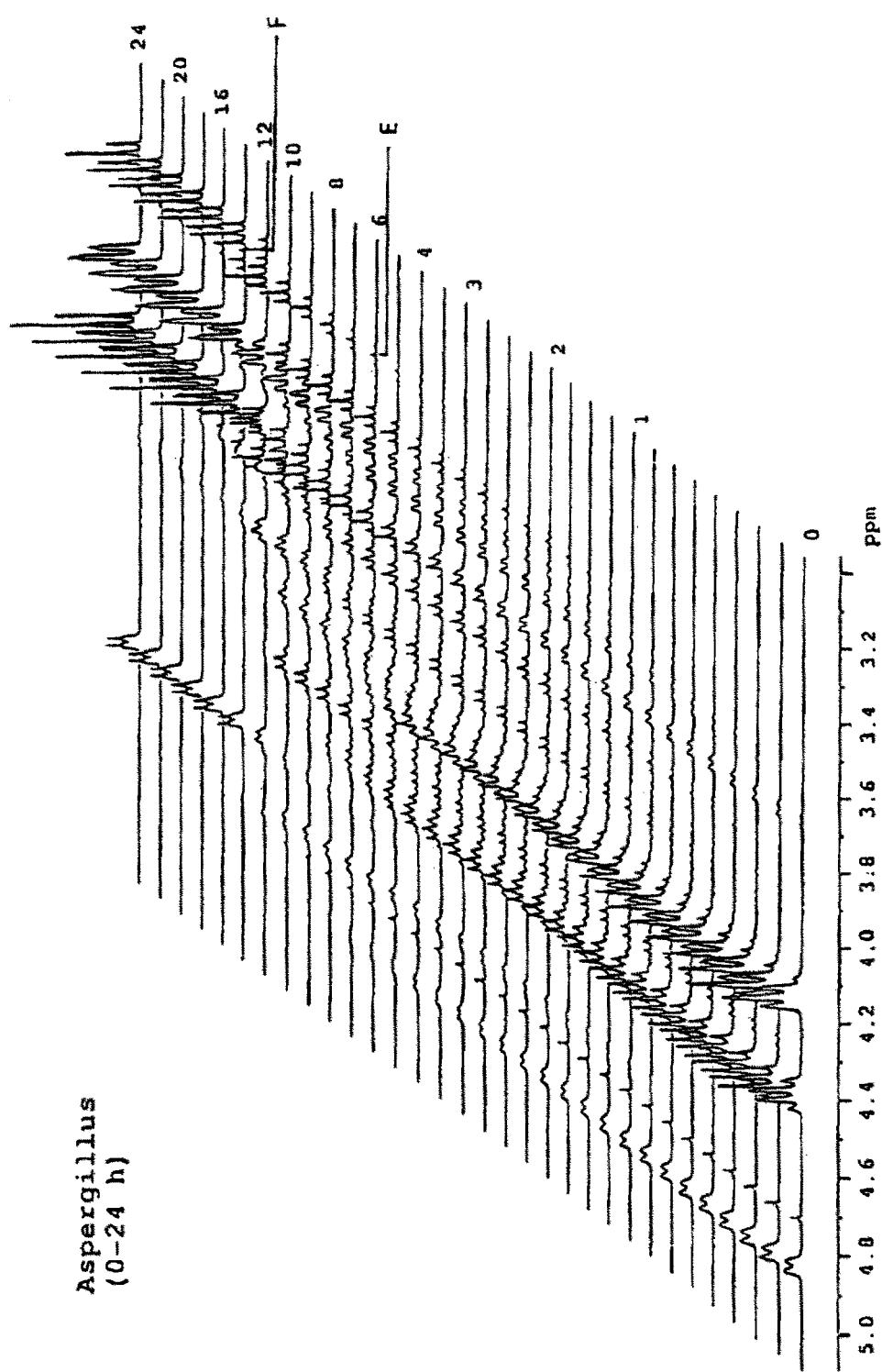


Fig. 28

ES 2 323 440 T3

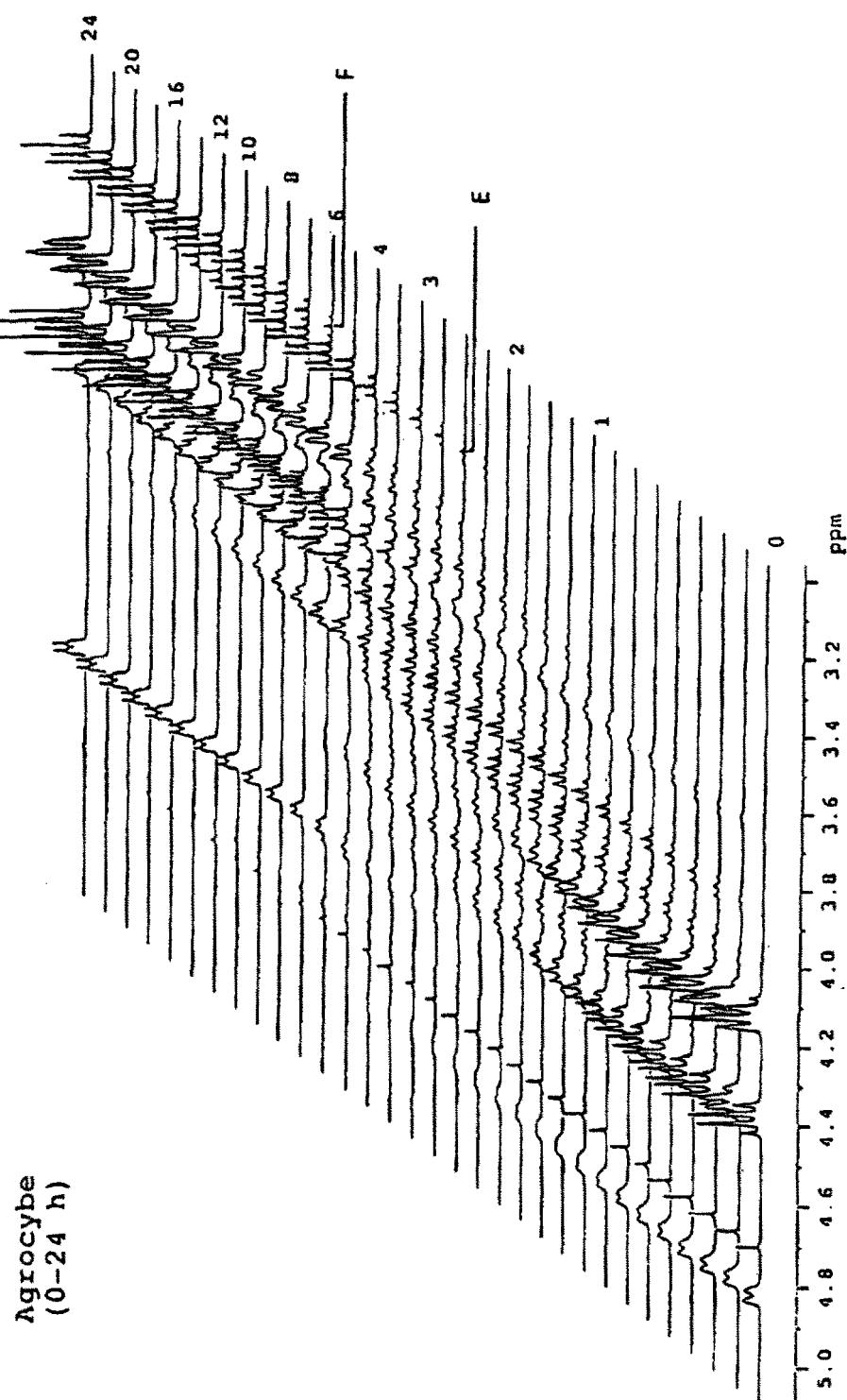


Fig. 29

ES 2 323 440 T3

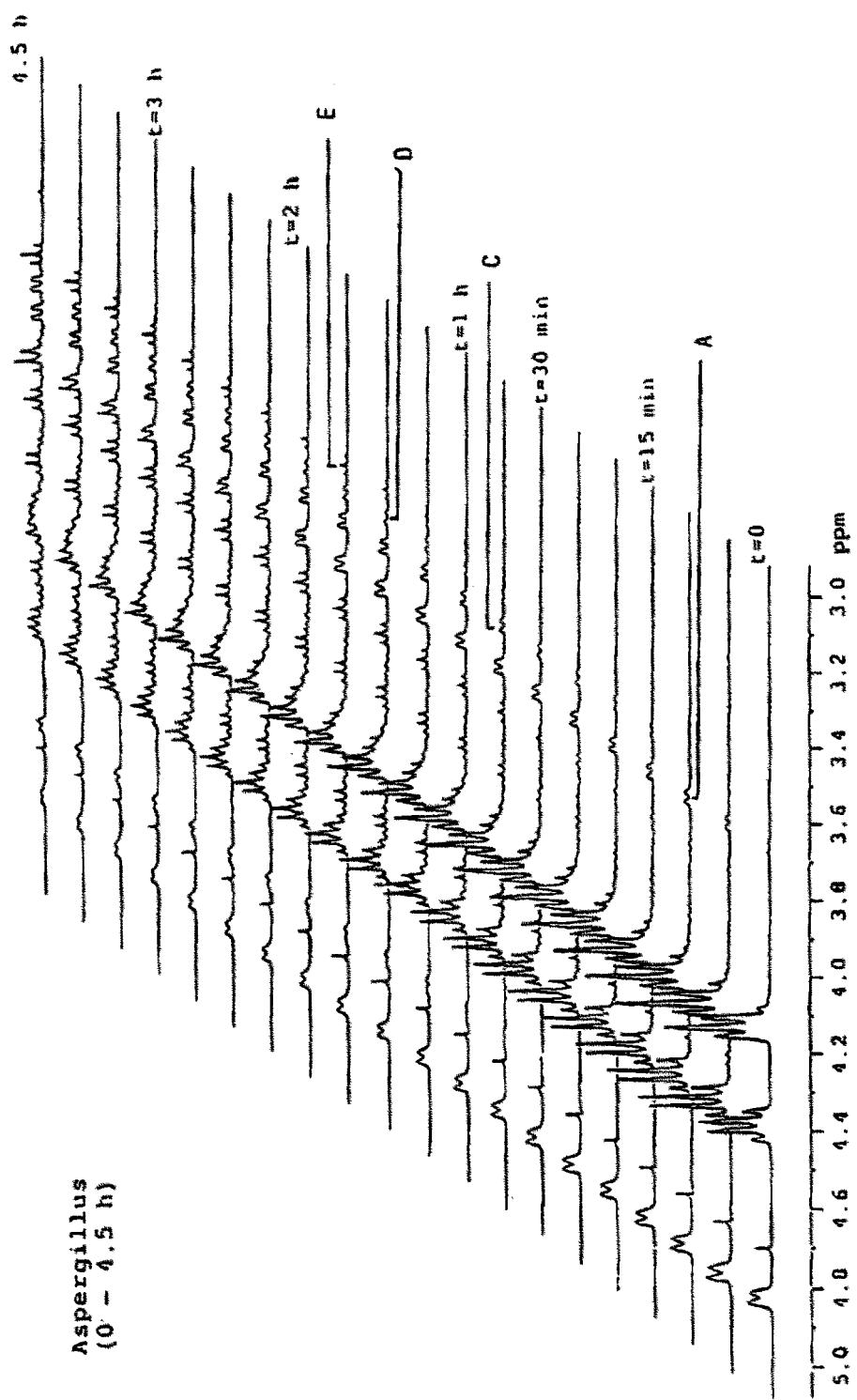


Fig. 30

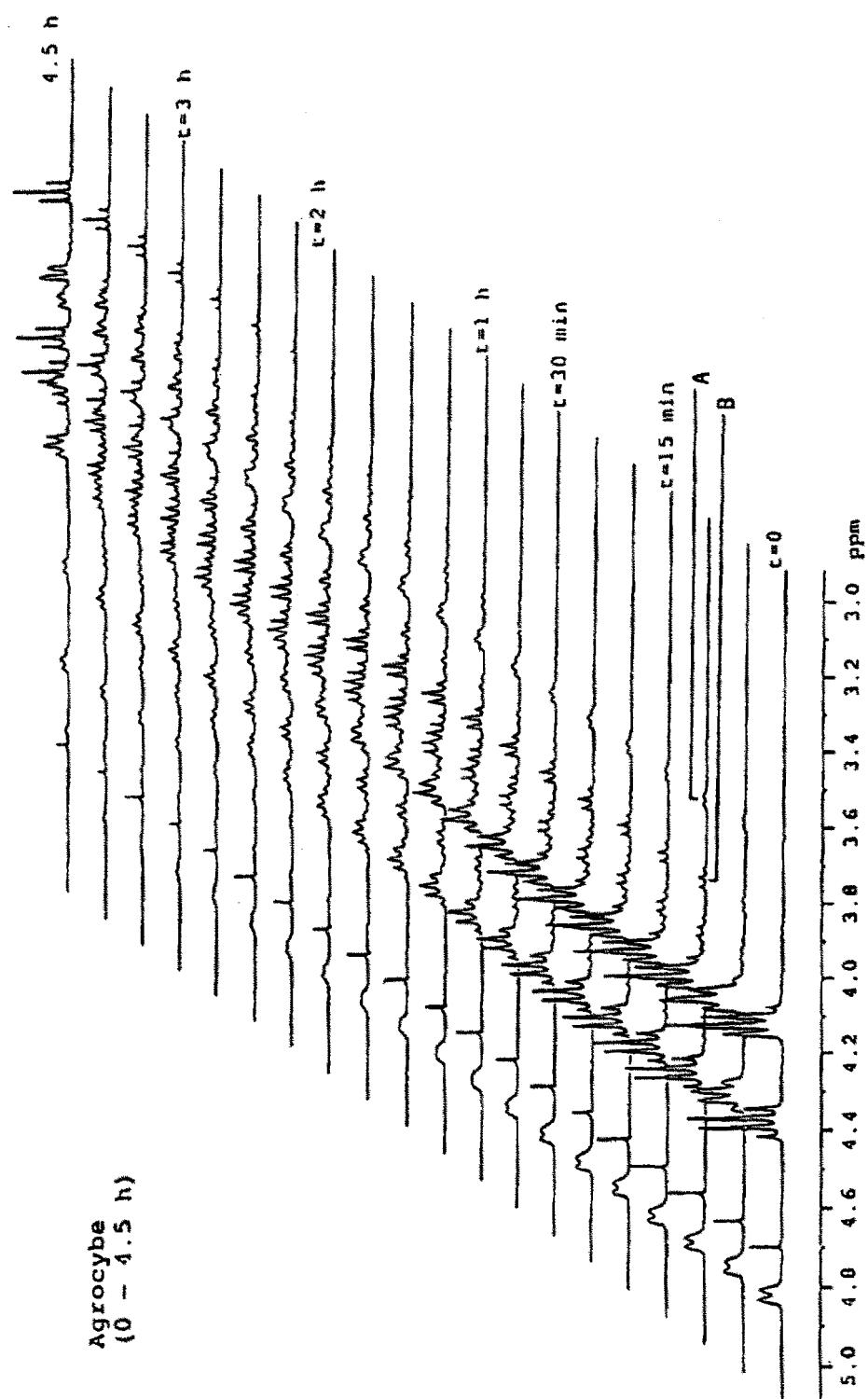


Fig. 31

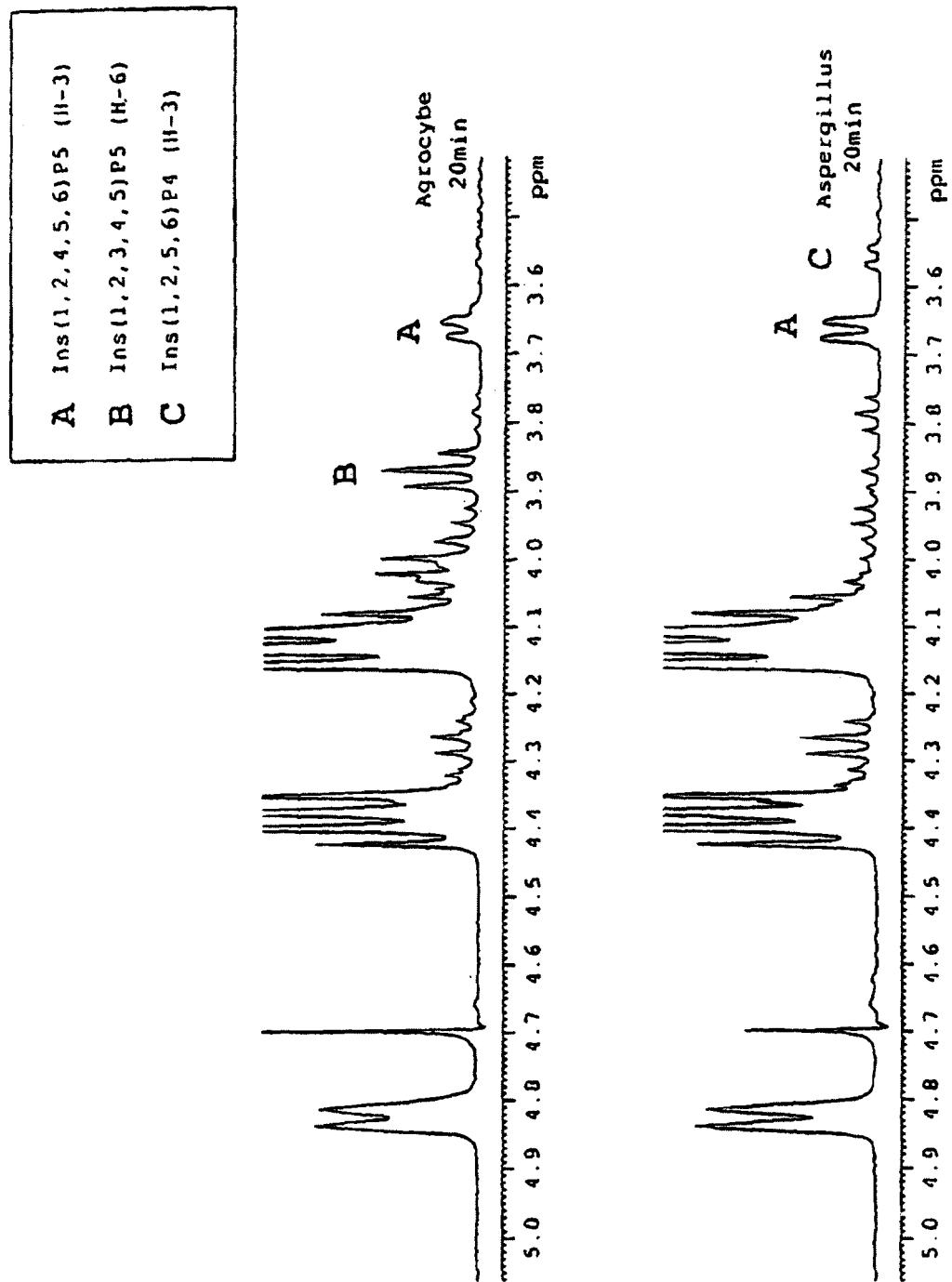


Fig. 32

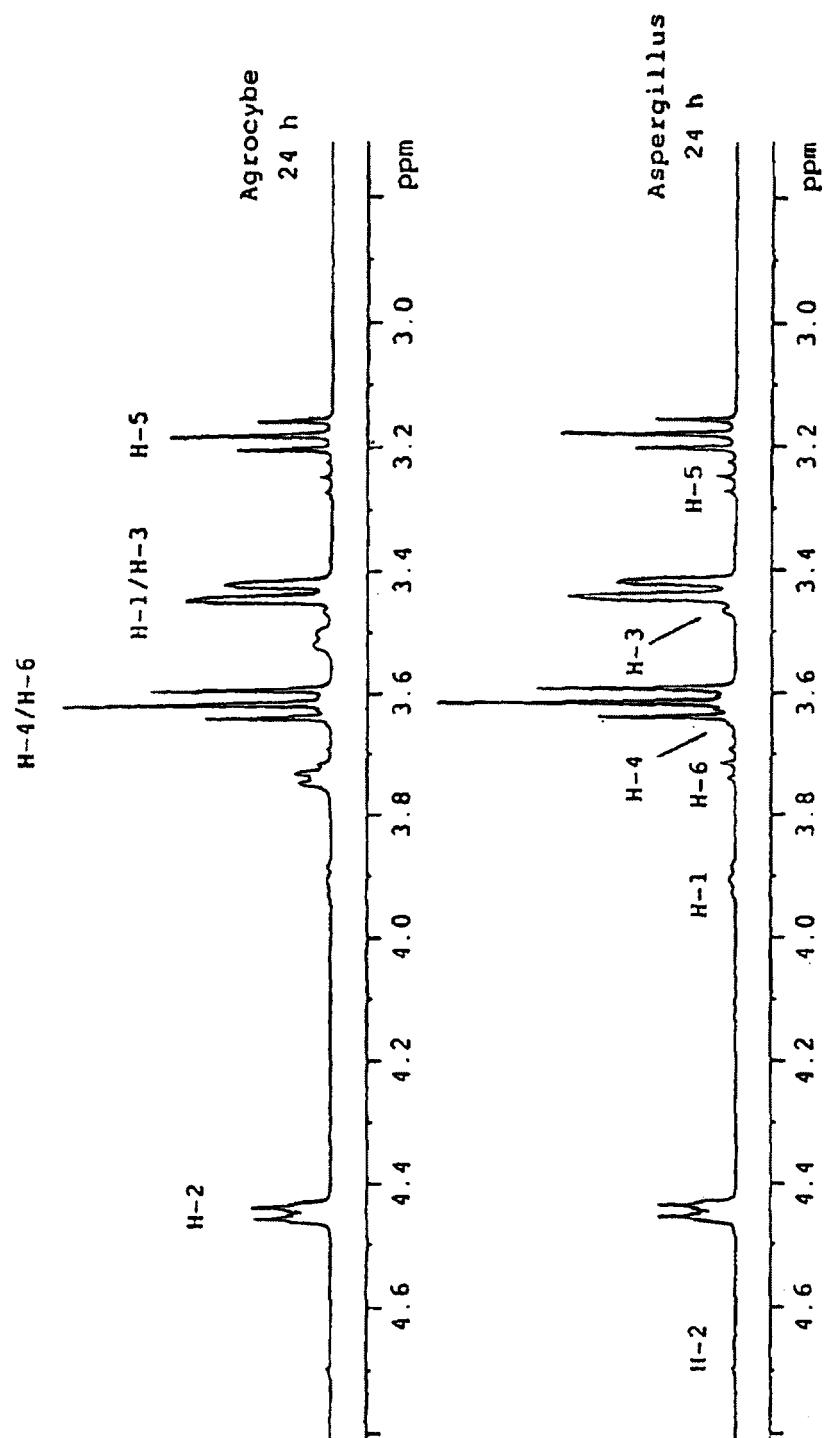


Fig. 33

ES 2 323 440 T3

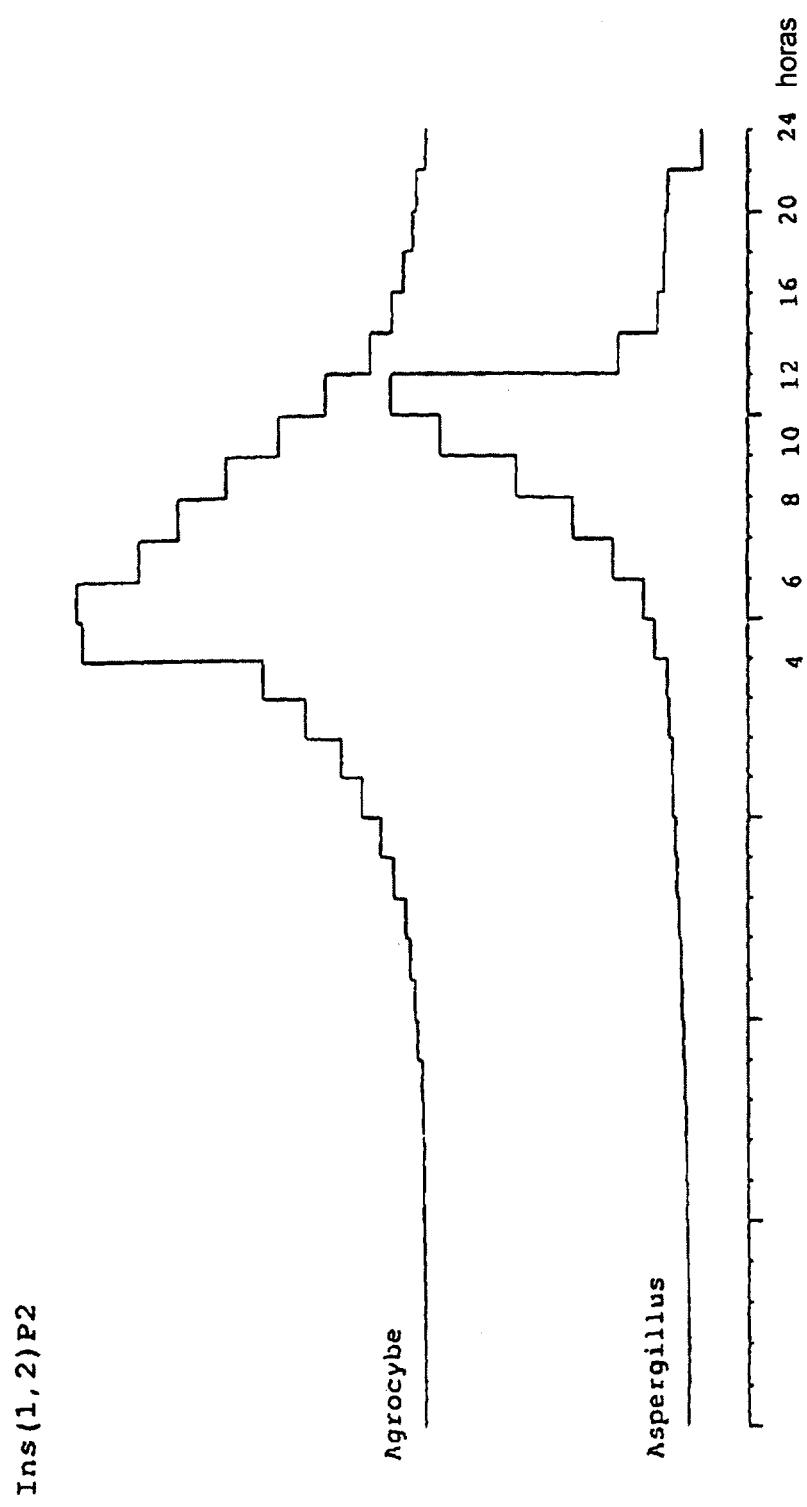


Fig. 34

ES 2 323 440 T3

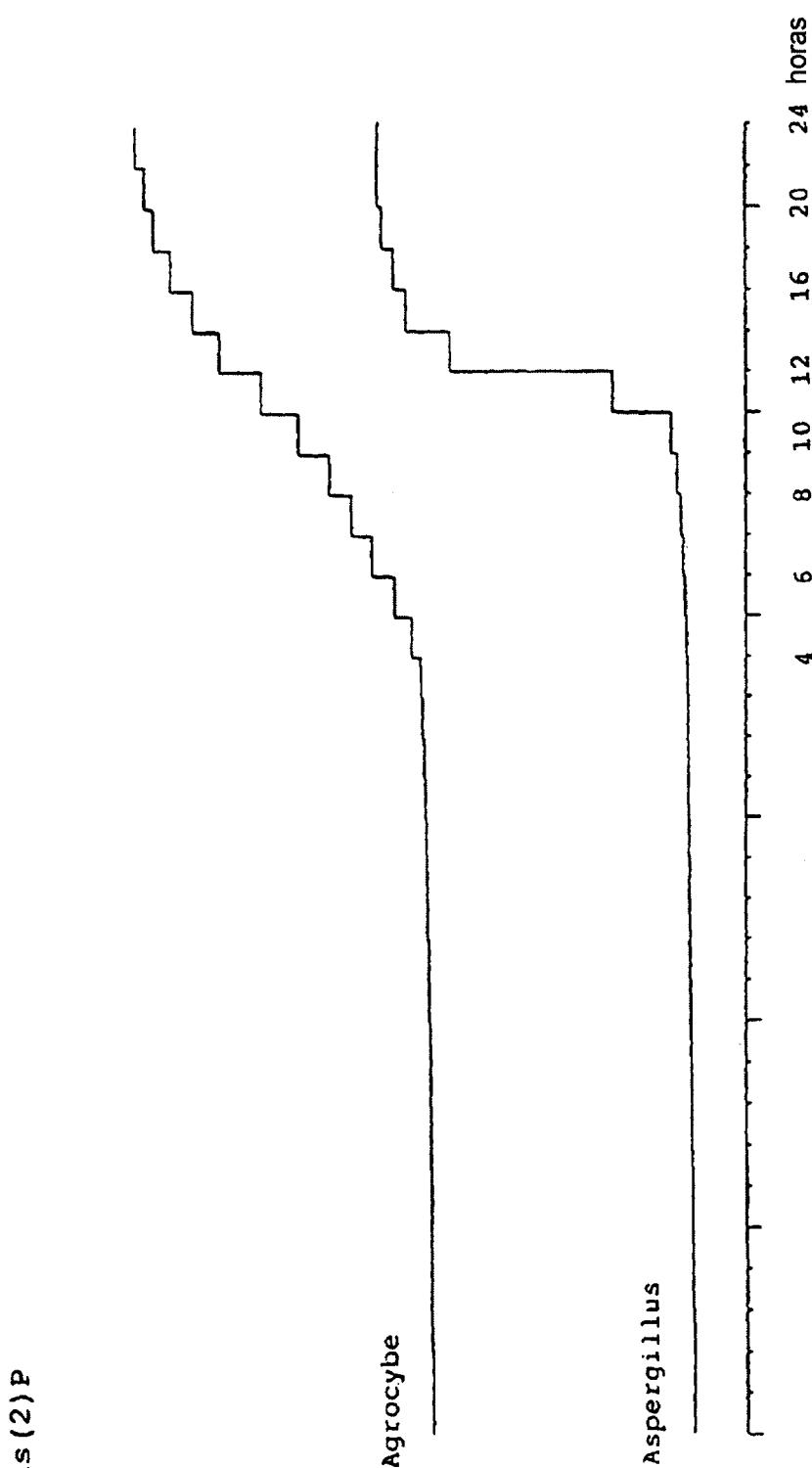


Fig. 35

ES 2 323 440 T3

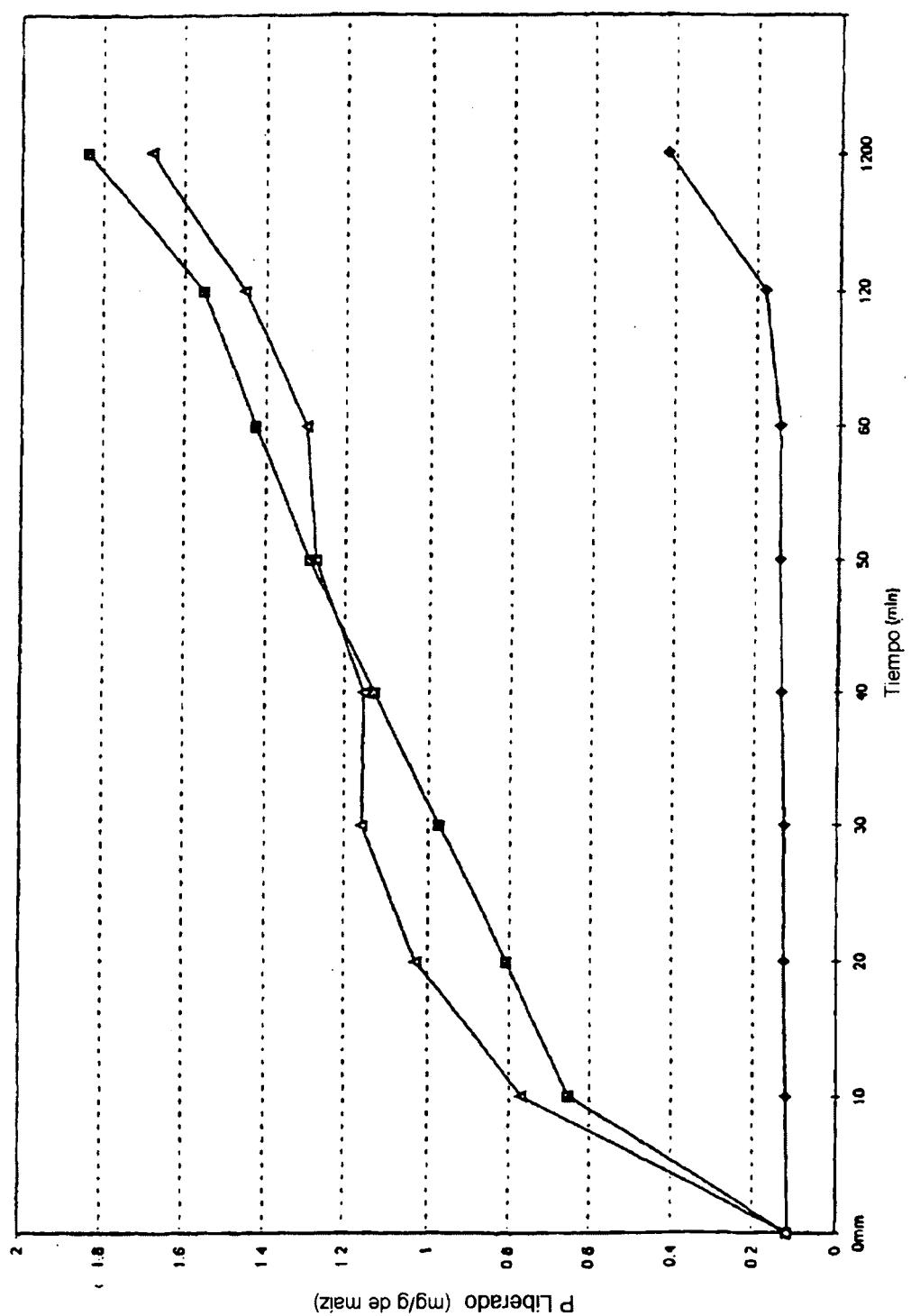


Fig. 36

ES 2 323 440 T3

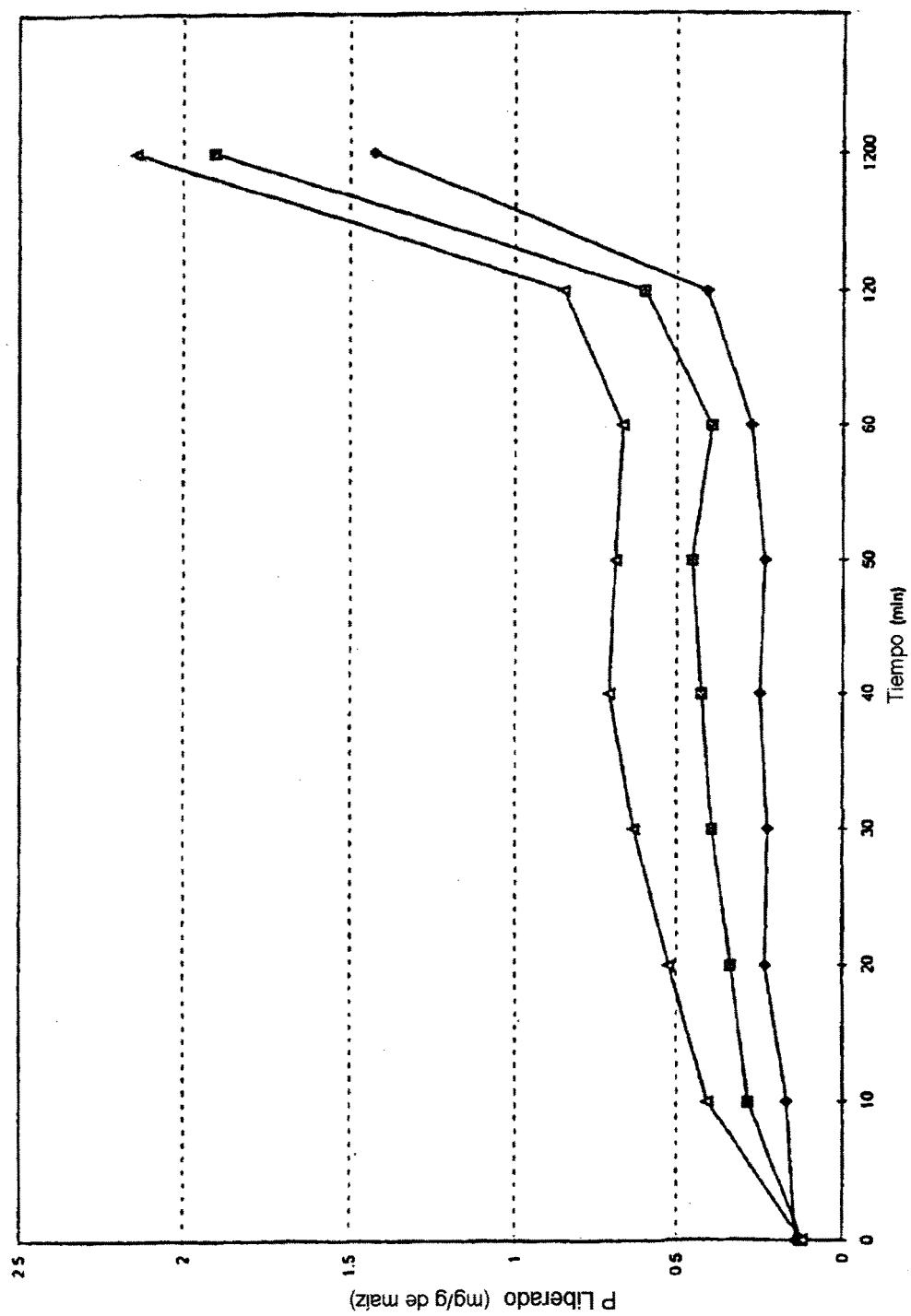
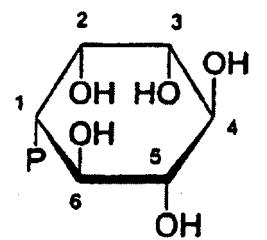
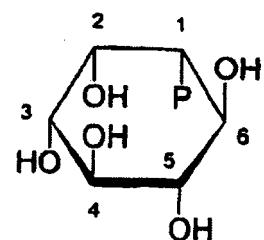


Fig. 37



1D-Ins(1)P



1L-Ins(1)P

Fig. 38

ES 2 323 440 T3

## **LISTA DE SECUENCIAS**

## (1) INFORMACIÓN GENERAL:

5 (i) S

- (A) NOMBRE: Novo Nordisk A/S
  - (B) CALLE: novo Alle
  - (C) CIUDAD: DK-2880 Bagsvaerd
  - (D) ESTADO: Dinamarca
  - (E) PAÍS: Dinamarca
  - (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 2880
  - (G) TELÉFONO: +45 4444 8888
  - (H) TELEFAX: +45 4449 3256

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: polipéptidos de fitasa

<sup>20</sup> (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 32

(iv) FORMA DE LECTURA INFORMÁTICA:

- (A) TIPO DE MEDIO: disquete
  - (B) ORDENADOR: PC compatible IBM
  - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, versión #1.30 (EPO)

**30 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 1:**

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 12 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - (C) TIPO DE CADENA: único
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado
  - (B) UBICACIÓN:2
  - (D) OTRA INFORMACIÓN:/producto= “OTRA” /nota= “X en posición 2 es Y o F”

## 50 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado
  - (B) UBICACIÓN:3
  - (D) OTRA INFORMACIÓN:/producto= '.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 1:

Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Pro Pro  
1 5 10

60

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 17 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - (C) TIPO DE CADENA: único

ES 2 323 440 T3

- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

  - (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado
  - (B) UBICACIÓN:3
  - (D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= “X en posición 3 es N o H”

(ix) CARACTERÍSTICA:

  - (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado
  - (B) UBICACIÓN:4
  - (D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= “X en posición 4 es I o L”

(ix) CARACTERÍSTICA:

  - (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado
  - (B) UBICACIÓN:12
  - (D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= “X en posición 12 es F o W”

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 2:

Gln Val Xaa Xaa Ile Gln Arg His Gly Ala Arg Xaa Pro Thr Ser Gly  
1 5 10 15

Ala

- (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 3:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
    - (A) LONGITUD: 16 aminoácidos
    - (B) TIPO: aminoácido
    - (C) TIPO DE CADENA: único
    - (D) TOPOLOGÍA: lineal
  - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
  - (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
  - (ix) CARACTERÍSTICA:
    - (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado
    - (B) UBICACIÓN: 8
    - (D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= “X en posición 8 es F o W”
  - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 3;

Ile Gln Arg His Gly Ala Arg Xaa Pro Thr Ser Gly Ala Xaa Xaa Arg  
1 5 10 15

- (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 4:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

  - (A) LONGITUD: 13 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - (C) TIPO DE CADENA: único
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

# ES 2 323 440 T3

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) UBICACIÓN:4

(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= “X en posición 4 es D o A”

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) UBICACIÓN: 5

(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= “X en posición 5 es S o T”

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) UBICACIÓN:6

(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= “X en posición 6 es A o S”

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) UBICACIÓN:7

(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= “X en posición 7 es T o N”

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) UBICACIÓN:11

(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= “X en posición 11 es A o E”

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 4:

Arg Val Val Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Trp Thr Xaa Gly Phe  
1                       5   10

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) UBICACIÓN:4

(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= “X en posición 4 es A o E”

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 5:

Asn Trp Thr Xaa Gly Phe Xaa Xaa Ala Ser  
1                       5   10

# ES 2 323 440 T3

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID Nº: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 12 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 6:

Gly Phe Xaa Xaa Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro  
1 5 10

20

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID Nº: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 16 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado
- (B) UBICACIÓN:2
- (D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= "X en posición 2 es N o D"

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado
- (B) UBICACIÓN:3
- (D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= "X en posición 3 es P o E"

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado
- (B) UBICACIÓN:6
- (D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= "X en posición 6 es T o L"

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado
- (B) UBICACIÓN:7
- (D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= "X en posición 7 es W o F"

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado
- (B) UBICACIÓN:10
- (D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= "X en posición 10 es S o K"

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

ES 2 323 440 T3

- (B) UBICACIÓN:13  
(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= “X en posición 13 es V o T”

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 7:

Pro Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Phe Ser  
1 5 10 15

10 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 8:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 11 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(C) TIPO DE CADENA: único  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

25 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado  
(B) UBICACIÓN:2  
(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= “X en posición 2 es Q o A”

30 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado  
(B) UBICACIÓN:3  
(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= “X en posición 3 es V o L”

35 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado  
(B) UBICACIÓN:11  
(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= “X en posición 11 es G o A”

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 8:

45 Asp Xaa Xaa Gln Pro Leu Xaa Phe Cys Gly Xaa  
1 5 10

50 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 9:

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(C) TIPO DE CADENA: único  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

65 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado  
(B) UBICACIÓN:7

# ES 2 323 440 T3

(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= "X en posición 7 es Y o F"

5 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) UBICACIÓN:17

(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= "X en posición 17 es E o A"

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 9:

Phe Val Glu Ser Gln Xaa Xaa Ala Arg Xaa Xaa Gly Xaa Gly Asp Phe  
1 5 10 15

15 Xaa Lys Cys

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID Nº: 10:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

25 (C) TIPO DE CADENA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

30 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

35 (B) UBICACIÓN:4

(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= "X en posición 4 es A o E"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 10:

40 Asn Trp Thr Xaa Gly Phe  
1 5

45 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID Nº: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

50 (B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

60 (B) UBICACIÓN:3

(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= "X en posición 3 es F o Y"

ES 2 323 440 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 11:

Asp Lys Xaa Tyr Gly Thr  
1 5

5

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 12:

- 10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 7 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
15 (C) TIPO DE CADENA:  
(D) TOPOLOGÍA: lineal  
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
20 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno  
(ix) CARACTERÍSTICA:  
(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado  
25 (B) UBICACIÓN:5  
(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota = “X en posición 5 es F o Y”  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 12:

Asp Leu Asp Lys Xaa Tyr Gly  
1 5

30

35 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 13:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 5 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(C) TIPO DE CADENA:  
45 (D) TOPOLOGÍA: lineal  
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno  
(ix) CARACTERÍSTICA:  
(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado  
50 (B) UBICACIÓN:4  
(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= “X en posición 4 es A o E”  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 13:

Gly Asp Phe Xaa Lys  
1 5

60 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 14:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 6 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(C) TIPO DE CADENA:  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 323 440 T3

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno  
5 (ix) CARACTERÍSTICA:  
(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado  
(B) UBICACIÓN:3  
(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= "X en posición 3 es N o H"

- 10 (ix) CARACTERÍSTICA:  
(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado  
(B) UBICACIÓN:4  
15 (D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= "X en posición 4 es I o L"

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 14:

20                   Gln Val Xaa Xaa Ile Gln  
                      1                           5

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID Nº: 15:

- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 26 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
30 (C) TIPO DE CADENA: único  
(D) TOPOLOGÍA: lineal  
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador sentido"  
35 (iv) ANTISENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 15:

40 CCCAAGCTTA AYTGGACNGM NGGNTT

26

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID Nº: 16:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 23 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: único  
50 (D) TOPOLOGÍA: lineal  
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador sentido"  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 16:

CCCAAGCTTG AYAARTWYGG NAC

23

60 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID Nº: 17:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 27 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
65 (C) TIPO DE CADENA: único

# ES 2 323 440 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (A) DESCRIPCIÓN: /desc = “cebador antisentido”

5 (iv) ANTISENTIDO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 17:

GCTCTAGACR TARWAiTTRT CNARRTC

27

10

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 25 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: único  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (A) DESCRIPCIÓN: /desc = “cebador antisentido”

(iv) ANTISENTIDO: SÍ

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 18:

GCTCTAGACA YTTNKCRAAR TCNCC

25

30

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 26 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: único  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (A) DESCRIPCIÓN: /desc = “cebador sentido”

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 19:

45 CCCAAGCTTC ARGTNMAYMT NATCA

26

50

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 27 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: único  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico (A) DESCRIPCIÓN: /desc = “cebador antisentido”

60 (iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 20:

GCTCTAGACR AANCCNKCNG TCCARTT

27

65

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 21:

# ES 2 323 440 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1501 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Agrocibe pediades*
- (B) CEPA: CBS 900.96

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) UBICACIÓN:17..1375

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: sig\_péptido
- (B) UBICACIÓN:17..94

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: mat\_péptido
- (B) UBICACIÓN:95..1375

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 21:

GGATCCGAAT TCACATT ATG TCC CTC TTC ATC GGC GGC TGT TTG CTC GTG Met Ser Leu Phe Ile Gly Gly Cys Leu Leu Val -26 -25 -20	49
--	----

TTT TTA CAG GCG AGC GCA TAC GGC GGC GTC GTG CAG GCC ACA TTC GTG Phe Leu Gln Ala Ser Ala Tyr Gly Gly Val Val Gln Ala Thr Phe Val -15 -10 -5 1	97
--	----

CAG CCG TTT TTC CCT CCA CAG ATT CAG GAC TCT TGG GCA GCT TAT ACA Gln Pro Phe Pro Pro Gln Ile Gln Asp Ser Trp Ala Ala Tyr Thr 5 10 15	145
---	-----

45

50

55

60

65

# ES 2 323 440 T3

	CCA TAT TAT CCT GTT CAG GCG TAC ACG CCT CCC CCG AAG GAT TGC AAG Pro Tyr Tyr Pro Val Gln Ala Tyr Thr Pro Pro Pro Lys Asp Cys Lys 20 25 30	193
5	ATC ACA CAA GTT AAC ATT ATT CAA CGA CAT GGT GCC CGC TTT CCG ACA Ile Thr Gln Val Asn Ile Ile Gln Arg His Gly Ala Arg Phe Pro Thr 35 40 45	241
10	TCG GGG GCA GGC ACA AGG ATC CAA GCA GCT GTG AAG AAG CTT CAA TCA Ser Gly Ala Gly Thr Arg Ile Gln Ala Ala Val Lys Lys Leu Gln Ser 50 55 60 65	289
	GCT AAA ACC TAT ACG GAT CCT CGT CTC GAC TTT CTG ACC AAC TAT ACC Ala Lys Thr Tyr Thr Asp Pro Arg Leu Asp Phe Leu Thr Asn Tyr Thr 70 75 80	337
15	TAT ACC CTT GGT CAC GAC GAT CTC GTA CCG TTT GGA GCG CTT CAA TCA Tyr Thr Leu Gly His Asp Asp Leu Val Pro Phe Gly Ala Leu Gln Ser 85 90 95	385
20	TCA CAA GCT GGA GAG GAA ACG TTT CAA CGA TAC TCG TTT CTG GTG TCC Ser Gln Ala Gly Glu Glu Thr Phe Gln Arg Tyr Ser Phe Leu Val Ser 100 105 110	433
	AAA GAG AAC TTA CCT TTT GTA AGA GCT TCG AGT TCC AAT CGA GTC GTC Lys Glu Asn Leu Pro Phe Val Arg Ala Ser Ser Ser Asn Arg Val Val 115 120 125	481
25	GAC TCA GCT ACC AAC TGG ACG GAA GGT TTT TCT GCG GCC AGT CAC CAC Asp Ser Ala Thr Asn Trp Thr Glu Gly Phe Ser Ala Ala Ser His His 130 135 140 145	529
30	GTC TTG AAT CCC ATT CTC TTT GTA ATC CTC TCA GAA AGT CTC AAT GAC Val Leu Asn Pro Ile Leu Phe Val Ile Leu Ser Glu Ser Leu Asn Asp 150 155 160	577
	ACG CTT GAC GAT GCC ATG TGC CCT AAC GCG GGC TCC TCC GAC CCG CAG Thr Leu Asp Asp Ala Met Cys Pro Asn Ala Gly Ser Ser Asp Pro Gln 165 170 175	625
35	ACT GGT ATC TGG ACC TCG ATA TAC GGG ACG CCT ATT GCC AAC CGA CTA Thr Gly Ile Trp Thr Ser Ile Tyr Gly Thr Pro Ile Ala Asn Arg Leu 180 185 190	673
40	AAT CAG CAG GCT CCG GGT GCA AAT ATT ACA GCT GCC GAT GTG TCG AAC Asn Gln Gln Ala Pro Gly Ala Asn Ile Thr Ala Ala Asp Val Ser Asn 195 200 205	721
	CTT ATA CCG CTT TGC GCA TTC GAG ACG ATA GTA AAG GAG ACG CCA AGT Leu Ile Pro Leu Cys Ala Phe Glu Thr Ile Val Lys Glu Thr Pro Ser 210 215 220 225	769
45	CCT TTC TGT AAT TTG TTC ACC CCC GAA GAG TTC GCA CAG TTT GAA TAT Pro Phe Cys Asn Leu Phe Thr Pro Glu Glu Phe Ala Gln Phe Glu Tyr 230 235 240	817
50	TTC GGT GAC CTG GAC AAG TTC TAT GGG ACA GGT TAT GGA CAA CCG TTA Phe Gly Asp Leu Asp Lys Phe Tyr Gly Thr Gly Tyr Gly Gln Pro Leu 245 250 255	865
	GGA CCT GTG CAA GGT GTC GGC TAC ATC AAT GAA CTT CTT GCC CGA CTC Gly Pro Val Gln Gly Val Gly Tyr Ile Asn Glu Leu Leu Ala Arg Leu 260 265 270	913
55	ACA GAA ATG CCA GTT CGA GAT AAC ACC CAG ACG AAC AGG ACA CTC GAC Thr Glu Met Pro Val Arg Asp Asn Thr Gln Thr Asn Arg Thr Leu Asp 275 280 285	961
60	TCT TCT CCG CTT ACA TTT CCC CTC GAC CGC AGT ATC TAC GCT GAC CTC Ser Ser Pro Leu Thr Phe Pro Leu Asp Arg Ser Ile Tyr Ala Asp Leu 290 295 300 305	1009
65	TCG CAC GAT AAC CAA ATG ATC GCG ATA TTT TCA GCG ATG GGT CTT TTC Ser His Asp Asn Gln Met Ile Ala Ile Phe Ser Ala Met Gly Leu Phe 310 315 320	1057

# ES 2 323 440 T3

	AAC CAG AGT TCA CCT TTG GAT CCG TCC TTC CCC AAC CCC AAG CGT ACT Asn Gln Ser Ser Pro Leu Asp Pro Ser Phe Pro Asn Pro Lys Arg Thr 325 330 335	1105
5	TGG GTC ACC AGT CGG CTT ACG CCT TTC AGC GCG AGA ATG GTC ACT GAG Trp Val Thr Ser Arg Leu Thr Pro Phe Ser Ala Arg Met Val Thr Glu 340 345 350	1153
10	CGG TTG CTG TGT CAA AGG GAT GGG ACA GGG AGC GGT GGA CCA TCC AGG Arg Leu Leu Cys Gln Arg Asp Gly Thr Gly Ser Gly Gly Pro Ser Arg 355 360 365	1201
15	ATC ATG CGG AAT GGA AAT GTG CAG ACG TTT GTG AGG ATT CTT GTC AAC Ile Met Arg Asn Gly Asn Val Gln Thr Phe Val Arg Ile Leu Val Asn 370 375 380 385	1249
20	GAT GCT TTA CAG CCT TTG AAG TTC TGC GGA GGG GAC ATG GAT AGT TTG Asp Ala Leu Gln Pro Leu Lys Phe Cys Gly Gly Asp Met Asp Ser Leu 390 395 400	1297
25	TGT ACT CTG GAA GCG TTC GTC GAG AGC CAG AAG TAT GCA CGA GAG GAT Cys Thr Leu Glu Ala Phe Val Glu Ser Gln Lys Tyr Ala Arg Glu Asp 405 410 415	1345
30	GGT CAA GGC GAT TTT GAA AAA TGT TTT GAT TAAATATTGC AGTATGCTCA Gly Gln Gly Asp Phe Glu Lys Cys Phe Asp 420 425	1395
	GTGAGTAGAC TACAGTGCAG GCCCTGTAAC TCTTGTATTG TGTTTCTGGA ATTCCCTCGGA	1455
	GCCTAGTTG TAGCAAAAAA AAAAAAAA AAATTCCTGC GGCCGC	1501

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 22:

- 35       (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
  - (A) LONGITUD: 453 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 40       (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- 45       (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 22:

50

55

60

65

ES 2 323 440 T3

Met Ser Leu Phe Ile Gly Gly Cys Leu Leu Val Phe Leu Gln Ala Ser  
-26 -25 -20 -15

5 Ala Tyr Gly Gly Val Val Gln Ala Thr Phe Val Gln Pro Phe Phe Pro  
-10 -5 1 5

10 Pro Gln Ile Gln Asp Ser Trp Ala Ala Tyr Thr Pro Tyr Tyr Pro Val  
10 15 20

15 Gln Ala Tyr Thr Pro Pro Pro Lys Asp Cys Lys Ile Thr Gln Val Asn  
25 30 35

20 Ile Ile Gln Arg His Gly Ala Arg Phe Pro Thr Ser Gly Ala Gly Thr  
40 45 50

25 Arg Ile Gln Ala Ala Val Lys Lys Leu Gln Ser Ala Lys Thr Tyr Thr  
55 60 65 70

30 Asp Pro Arg Leu Asp Phe Leu Thr Asn Tyr Thr Tyr Thr Leu Gly His  
75 80 85

35 Asp Asp Leu Val Pro Phe Gly Ala Leu Gln Ser Ser Gln Ala Gly Glu  
90 95 100

40 Glu Thr Phe Gln Arg Tyr Ser Phe Leu Val Ser Lys Glu Asn Leu Pro  
105 110 115

45 Phe Val Arg Ala Ser Ser Ser Asn Arg Val Val Asp Ser Ala Thr Asn  
120 125 130

50 Trp Thr Glu Gly Phe Ser Ala Ala Ser His His Val Leu Asn Pro Ile  
135 140 145 150

40

45

50

55

60

65

# ES 2 323 440 T3

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

# ES 2 323 440 T3

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 23:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1593 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

15 (vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Peniophora lycii*
- (B) CEPA: CBS 686.96

20 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: sig\_péptido
- (B) UBICACIÓN:123..212

25 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: mat\_péptido
- (B) UBICACIÓN:213..1439

30 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) UBICACIÓN:123..1439

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 23:

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 323 440 T3

	GGATCCGAAT TCCATTTCT GCTCTGACCT CCATCTCGCT GAGCGGCCGA CGAGAACCTA	60
	GGGGCTCTAA GTCCACGTAC TATGCCCGCG CCTGTGAAGG CCCCATAACCA GCCCTTATCG	120
5	AT ATG GTT TCT TCG GCA TTC GCA CCT TCC ATC CTA CTT AGC TTG ATG Met Val Ser Ser Ala Phe Ala Pro Ser Ile Leu Leu Ser Leu Met -30 -25 -20	167
10	TCG AGT CTT GCT TTG AGC ACG CAG TTC AGC TTT GTT GCG GCG CAG CTA Ser Ser Leu Ala Leu Ser Thr Gln Phe Ser Phe Val Ala Ala Gln Leu -15 -10 -5 1	215
15	CCT ATC CCC GCA CAA AAC ACA AGT AAT TGG GGG CCT TAC GAT CCC TTC Pro Ile Pro Ala Gln Asn Thr Ser Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Pro Phe 5 10 15	263
20	TTT CCC GTC GAA CCG TAT GCA GCT CCG CCG GAA GGG TGC ACA GTG ACA Phe Pro Val Glu Pro Tyr Ala Ala Pro Pro Glu Gly Cys Thr Val Thr 20 25 30	311
25	CAG GTC AAC CTG ATT CAG AGG CAC GGC GCG CGT TGG CCC ACA TCC GGC Gln Val Asn Leu Ile Gln Arg His Gly Ala Arg Trp Pro Thr Ser Gly 35 40 45	359
30	GCG CGG TCG CGG CAG GTC GCC GCC GTA GCG AAG ATA CAA ATG GCG CGA Ala Arg Ser Arg Gln Val Ala Ala Val Ala Lys Ile Gln Met Ala Arg 50 55 60 65	407
35	CCA TTC ACG GAT CCC AAG TAT GAG TTC CTC AAC GAC TTC GTG TAC AAG Pro Phe Thr Asp Pro Lys Tyr Glu Phe Leu Asn Asp Phe Val Tyr Lys 70 75 80	455
40	TTC GGC GTC GCC GAT CTG CTA CCG TTC GGG GCT AAC CAA TCG CAC CAA Phe Gly Val Ala Asp Leu Leu Pro Phe Gly Ala Asn Gln Ser His Gln 85 90 95	503
45	ACC GGC ACC GAT ATG TAT ACG CGC TAC AGT ACA CTA TTT GAG GGC GGG Thr Gly Thr Asp Met Tyr Thr Arg Tyr Ser Thr Leu Phe Glu Gly Gly 100 105 110	551
50	GAT GTA CCC TTT GTG CGC GCG GCT GGT GAC CAA CGC GTC GTT GAC TCC Asp Val Pro Phe Val Arg Ala Ala Gly Asp Gln Arg Val Val Asp Ser 115 120 125	599
55	TCG ACG AAC TGG ACG GCA GGC TTT GGC GAT GCT TCT GGC GAG ACT GTT Ser Thr Asn Trp Thr Ala Gly Phe Gly Asp Ala Ser Gly Glu Thr Val 130 135 140 145	647
60	CTC CCG ACG CTC CAG GTT GTG CTT CAA GAA GAG GGG AAC TGC ACG CTC Leu Pro Thr Leu Gln Val Val Leu Gln Glu Glu Gly Asn Cys Thr Leu 150 155 160	695
65	TGC AAT AAT ATG TGC CCG AAT GAA GTG GAT GGT GAC GAA TCC ACA ACG Cys Asn Asn Met Cys Pro Asn Glu Val Asp Gly Asp Glu Ser Thr Thr 165 170 175	743
70	TGG CTG GGG GTC TTT GCG CCG AAC ATC ACC GCG CGA TTG AAC GCT GCT Trp Leu Gly Val Phe Ala Pro Asn Ile Thr Ala Arg Leu Asn Ala Ala 180 185 190	791
75	GCG CCG AGT GCC AAC CTC TCA GAC AGC GAC GCG CTC ACT CTC ATG GAT Ala Pro Ser Ala Asn Leu Ser Asp Ser Asp Ala Leu Thr Leu Met Asp 195 200 205	839
80	ATG TGC CCG TTC GAC ACT CTC AGC TCC GGG AAC GCC AGC CCC TTC TGT Met Cys Pro Phe Asp Thr Leu Ser Ser Gly Asn Ala Ser Pro Phe Cys 210 215 220 225	887

# ES 2 323 440 T3

	GAC CTA TTT ACC GCG GAG GAG TAT GTG TCG TAC GAG TAC TAC TAT GAC Asp Leu Phe Thr Ala Glu Glu Tyr Val Ser Tyr Glu Tyr Tyr Tyr Asp 230 235 240	935
5	CTC GAC AAG TAC TAT GGC ACG GGC CCC GGG AAC GCT CTC GGT CCT GTC Leu Asp Lys Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Gly Asn Ala Leu Gly Pro Val 245 250 255	983
	CAG GGC GTC GGA TAC GTC AAT GAG CTG CTT GCA CGC TTG ACC GGC CAA Gln Gly Val Gly Tyr Val Asn Glu Leu Leu Ala Arg Leu Thr Gly Gln 260 265 270	1031
10	GCC GTT CGA GAC GAG ACG CAG ACG AAC CGC ACG CTC GAC AGC GAC CCT Ala Val Arg Asp Glu Thr Gln Thr Asn Arg Thr Leu Asp Ser Asp Pro 275 280 285	1079
15	GCA ACA TTC CCG CTG AAC CGT ACG TTC TAC GCC GAC TTC TCG CAT GAT Ala Thr Phe Pro Leu Asn Arg Thr Phe Tyr Ala Asp Phe Ser His Asp 290 295 300 305	1127
	AAC ACC ATG GTG CCC ATC TTT GCG GCG CTC GGG CTC TTC AAC GCC ACC Asn Thr Met Val Pro Ile Phe Ala Ala Leu Gly Leu Phe Asn Ala Thr 310 315 320	1175
20	GCC CTC GAC CCG CTG AAG CCC GAC GAG AAC AGG TTG TGG GTG GAC TCT Ala Leu Asp Pro Leu Lys Pro Asp Glu Asn Arg Leu Trp Val Asp Ser 325 330 335	1223
25	AAG CTG GTA CCG TTC TCT GGA CAT ATG ACG GTC GAG AAG CTG GCA TGT Lys Leu Val Pro Phe Ser Gly His Met Thr Val Glu Lys Leu Ala Cys 340 345 350	1271
	TCT GGG AAG GAG GCG GTC AGG GTG CTC GTG AAC GAC GCG GTG CAG CCG Ser Gly Lys Glu Ala Val Arg Val Leu Val Asn Asp Ala Val Gln Pro 355 360 365	1319
30	CTG GAG TTC TGC GGA GGT GTT GAT GGG GTG TGC GAG CTT TCG GCT TTC Leu Glu Phe Cys Gly Val Asp Gly Val Cys Glu Leu Ser Ala Phe 370 375 380 385	1367
35	GTA GAG AGC CAG ACG TAT GCG CGG GAG AAT GGG CAA GGC GAC TTC GCC Val Glu Ser Gln Thr Tyr Ala Arg Glu Asn Gly Gln Gly Asp Phe Ala 390 395 400	1415
	AAG TGC GGC TTT GTT CCG TCG GAA TAGCGGGAGA CCGTCTATGC TACACAGTAA Lys Cys Gly Phe Val Pro Ser Glu 405	1469
40	TTGTGTACTC TATAGCACTG TAGCTGTACT TACAAGTCGT AGGGTACGAT CGTACTTACG CTCGTTATT GATCCTTCCT TTAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA ATTCCCTGCAG CCGC	1529 1589 1593

45 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 439 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 24:

Met Val Ser Ser Ala Phe Ala Pro Ser Ile Leu Leu Ser Leu Met Ser -30 -25 -20 -15
60 Ser Leu Ala Leu Ser Thr Gln Phe Ser Phe Val Ala Ala Gln Leu Pro -10 -5 1
Ile Pro Ala Gln Asn Thr Ser Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Pro Phe Phe 5 10 15
65 Pro Val Glu Pro Tyr Ala Ala Pro Pro Glu Gly Cys Thr Val Thr Gln 20 25 30

# ES 2 323 440 T3

	Val Asn Leu Ile Gln Arg His Gly Ala Arg Trp Pro Thr Ser Gly Ala			
35	35	40	45	50
5	Arg Ser Arg Gln Val Ala Ala Val Ala Lys Ile Gln Met Ala Arg Pro			
	55	60	65	
	Phe Thr Asp Pro Lys Tyr Glu Phe Leu Asn Asp Phe Val Tyr Lys Phe			
	70	75	80	
10	Gly Val Ala Asp Leu Leu Pro Phe Gly Ala Asn Gln Ser His Gln Thr			
	85	90	95	
15	Gly Thr Asp Met Tyr Thr Arg Tyr Ser Thr Leu Phe Glu Gly Gly Asp			
	100	105	110	
	Val Pro Phe Val Arg Ala Ala Gly Asp Gln Arg Val Val Asp Ser Ser			
	115	120	125	130
20	Thr Asn Trp Thr Ala Gly Phe Gly Asp Ala Ser Gly Glu Thr Val Leu			
	135	140	145	
	Pro Thr Leu Gln Val Val Leu Gln Glu Glu Gly Asn Cys Thr Leu Cys			
	150	155	160	
25	Asn Asn Met Cys Pro Asn Glu Val Asp Gly Asp Glu Ser Thr Thr Trp			
	165	170	175	
	Leu Gly Val Phe Ala Pro Asn Ile Thr Ala Arg Leu Asn Ala Ala Ala			
	180	185	190	
30	Pro Ser Ala Asn Leu Ser Asp Ser Asp Ala Leu Thr Leu Met Asp Met			
	195	200	205	210
	Cys Pro Phe Asp Thr Leu Ser Ser Gly Asn Ala Ser Pro Phe Cys Asp			
	215	220	225	
35	Leu Phe Thr Ala Glu Glu Tyr Val Ser Tyr Glu Tyr Tyr Asp Leu			
	230	235	240	
	Asp Lys Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Gly Asn Ala Leu Gly Pro Val Gln			
	245	250	255	
40	Gly Val Gly Tyr Val Asn Glu Leu Leu Ala Arg Leu Thr Gly Gln Ala			
	260	265	270	
	Val Arg Asp Glu Thr Gln Thr Asn Arg Thr Leu Asp Ser Asp Pro Ala			
	275	280	285	290
45	Thr Phe Pro Leu Asn Arg Thr Phe Tyr Ala Asp Phe Ser His Asp Asn			
	295	300	305	
50	Thr Met Val Pro Ile Phe Ala Ala Leu Gly Leu Phe Asn Ala Thr Ala			
	310	315	320	
	Leu Asp Pro Leu Lys Pro Asp Glu Asn Arg Leu Trp Val Asp Ser Lys			
	325	330	335	
55	Leu Val Pro Phe Ser Gly His Met Thr Val Glu Lys Leu Ala Cys Ser			
	340	345	350	
	Gly Lys Glu Ala Val Arg Val Leu Val Asn Asp Ala Val Gln Pro Leu			
	355	360	365	370
60	Glu Phe Cys Gly Gly Val Asp Gly Val Cys Glu Leu Ser Ala Phe Val			
	375	380	385	
	Glu Ser Gln Thr Tyr Ala Arg Glu Asn Gly Gln Gly Asp Phe Ala Lys			
	390	395	400	
65	Cys Gly Phe Val Pro Ser Glu			
	405			

# ES 2 323 440 T3

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 25:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1522 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

15 (vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Paxillus involutus*
- (B) CEPa: CBS 100231

20 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) UBICACIÓN: 58..1383

25 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: mat\_péptido
- (B) UBICACIÓN: 115..1383

30 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: sig\_péptido
- (B) UBICACIÓN: 58..114

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 25:

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 323 440 T3

	GGATCCGAAT TCGGCACTCG TACGGTCCCC CGGTCTACCC TCTGCTGCC TTGGAAG	57
5	ATG CTC TTC GGT TTC GTC GCC CTC GCC TGT CTC TTG TCC CTC TCC GAG Met Leu Phe Gly Phe Val Ala Leu Ala Cys Leu Leu Ser Leu Ser Glu -19 -15 -10 -5	105
	GTC CTT GCG ACC TCC GTG CCC AAG AAC ACA GCG CCG ACC TTC CCC ATT Val Leu Ala Thr Ser Val Pro Lys Asn Thr Ala Pro Thr Phe Pro Ile 1 5 10	153
10	CCG GAG AGT GAG CAG CGG AAC TGG TCC CCG TAC TCG CCC TAC TTC CCT Pro Glu Ser Glu Gln Arg Asn Trp Ser Pro Tyr Ser Pro Tyr Phe Pro 15 20 25	201
15	CTT GCC GAG TAC AAG GCT CCT CCG GCG GGC TGC CAG ATC AAC CAG GTC Leu Ala Glu Tyr Lys Ala Pro Pro Ala Gly Cys Gln Ile Asn Gln Val 30 35 40 45	249
	AAC ATC ATC CAA AGA CAT GGT GCC CGG TTC CCG ACC TCT GGC GCG ACC Asn Ile Ile Gln Arg His Gly Ala Arg Phe Pro Thr Ser Gly Ala Thr 50 55 60	297
20	ACC CGT ATC AAG GCG GGT TTG ACC AAG TTG CAA GGC GTC CAG AAC TTT Thr Arg Ile Lys Ala Gly Leu Thr Lys Leu Gln Gly Val Gln Asn Phe 65 70 75	345
25	ACC GAC GCC AAA TTC AAC TTC ATC AAG TCG TTC AAG TAC GAT CTC GGT Thr Asp Ala Lys Phe Asn Phe Ile Lys Ser Phe Lys Tyr Asp Leu Gly 80 85 90	393
30	AAC TCG GAC CTC GTT CCG TTC GGT GCA GCA CAG TCC TTC GAC GCT GGT Asn Ser Asp Leu Val Pro Phe Gly Ala Ala Gln Ser Phe Asp Ala Gly 95 100 105	441
	CAG GAG GCC TTC GCC CGC TAC TCG AAG CTT GTC AGC AAG AAC AAC CTG Gln Glu Ala Phe Ala Arg Tyr Ser Lys Leu Val Ser Lys Asn Asn Leu 110 115 120 125	489
35	CCG TTC ATT CGT GCC GAT GGA AGT GAT CGT GTT GTG GAT TCT GCT ACA Pro Phe Ile Arg Ala Asp Gly Ser Asp Arg Val Val Asp Ser Ala Thr 130 135 140	537
40	AAC TGG ACT GCG GGT TTC GCT TCG GCA AGT CAC AAC ACG GTC CAG CCC Asn Trp Thr Ala Gly Phe Ala Ser Ala Ser His Asn Thr Val Gln Pro 145 150 155	585
	AAG CTG AAC CTG ATT CTC CCG CAA ACT GGC AAT GAT ACC CTG GAA GAT Lys Leu Asn Leu Ile Leu Pro Gln Thr Gly Asn Asp Thr Leu Glu Asp 160 165 170	633
45		

50

55

60

65

# ES 2 323 440 T3

	AAT ATG TGC CCT GCT GCT GGC GAT TCT GAC CCC CAG GTC AAC GCG TGG Asn Met Cys Pro Ala Ala Gly Asp Ser Asp Pro Gln Val Asn Ala Trp 175 180 185	681
5	TTG GCT GTT GCT TTC CCT TCC ATC ACT GCA CGG CTC AAC GCC GCC GCG Leu Ala Val Ala Phe Pro Ser Ile Thr Ala Arg Leu Asn Ala Ala Ala 190 195 200 205	729
10	CCC TCT GTC AAC CTC ACC GAC ACG GAC GCG TTC AAC CTC GTC AGT CTC Pro Ser Val Asn Leu Thr Asp Thr Asp Ala Phe Asn Leu Val Ser Leu 210 215 220	777
15	TGC GCT TTC TTG ACA GTC TCG AAG GAG AAG AAG AGT GAC TTC TGC ACC Cys Ala Phe Leu Thr Val Ser Lys Glu Lys Lys Ser Asp Phe Cys Thr 225 230 235	825
20	CTG TTC GAG GGC ATC CCT GGC TCT TTC GAG GCG TTC GCC TAT GGT GGC Leu Phe Glu Gly Ile Pro Gly Ser Phe Glu Ala Phe Ala Tyr Gly Gly 240 245 250	873
25	GAC CTT GAC AAG TTC TAC GGT ACC GGT TAC GGT CAG GAA CTC GGA CCC Asp Leu Asp Lys Phe Tyr Gly Thr Gly Tyr Gly Gln Glu Leu Gly Pro 255 260 265	921
30	GTT CAA GGC GTC GGC TAC GTC AAC GAG CTC ATC GCC CGC CTC ACC AAC Val Gln Gly Val Gly Tyr Val Asn Glu Leu Ile Ala Arg Leu Thr Asn 270 275 280 285	969
35	TCC GCC GTC CGC GAC AAC ACC CAG ACG AAC CGC ACA CTC GAC GCC TCG Ser Ala Val Arg Asp Asn Thr Gln Thr Asn Arg Thr Leu Asp Ala Ser 290 295 300	1017
40	CCC GTA ACC TTC CCG TTG AAC AAG ACG TTC TAC GCC GAT TTC TCC CAC Pro Val Thr Phe Pro Leu Asn Lys Thr Phe Tyr Ala Asp Phe Ser His 305 310 315	1065
45	GAC AAC CTC ATG GTC GCC GTC TTC TCC GCC ATG GGC CTC TTC CGC CAG Asp Asn Leu Met Val Ala Val Phe Ser Ala Met Gly Leu Phe Arg Gln 320 325 330	1113
50	CCC GCG CCG CTC AGC ACG TCC GTG CCG AAC CCA TGG CGC ACG TGG CGC Pro Ala Pro Leu Ser Thr Ser Val Pro Asn Pro Trp Arg Thr Trp Arg 335 340 345	1161
55	ACG AGC TCC CTC GTC CCC TTC TCC GGA CGC ATG GTC GTG GAA CGC CTC Thr Ser Ser Leu Val Pro Phe Ser Gly Arg Met Val Val Glu Arg Leu 350 355 360 365	1209
60	AGC TGT TTC GGC ACG ACC AAG GTT CGC GTC CTC GTG CAG GAC CAG GTG Ser Cys Phe Gly Thr Thr Lys Val Arg Val Leu Val Gln Asp Gln Val 370 375 380	1257
(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 26:	CAG CCG CTC GAG TTC TGC GGG GGT GAT AGG AAC GGG CTG TGC ACG CTT Gln Pro Leu Glu Phe Cys Gly Gly Asp Arg Asn Gly Leu Cys Thr Leu 385 390 395	1305
	GCT AAG TTT GTG GAG AGC CAG ACG TTT GCG AGG AGT GAT GGT GCG GGG Ala Lys Phe Val Glu Ser Gln Thr Phe Ala Arg Ser Asp Gly Ala Gly 400 405 410	1353
	GAC TTT GAG AAG TGC TTC GCG ACC TCG GCG TGAGGATGGA CGAACAAAAT Asp Phe Glu Lys Cys Phe Ala Thr Ser Ala 415 420	1403
	TAAATTGGGG TATTTTATCG TATAATTATG GTGTGTGTAG AACATGGGCT CGGGGTGAT	1463
	GGTGAAAAGC AAAGGTTTAT CGTCTAAAAA AAAAAAAAAA AAAAATTCC TGC GGCCGC	1522

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 442 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

# ES 2 323 440 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 26:

5	Met Leu Phe Gly Phe Val Ala Leu Ala Cys Leu Leu Ser Leu Ser Glu -19 -15 -10 -5
10	Val Leu Ala Thr Ser Val Pro Lys Asn Thr Ala Pro Thr Phe Pro Ile 1 5 10
15	Pro Glu Ser Glu Gln Arg Asn Trp Ser Pro Tyr Ser Pro Tyr Phe Pro 15 20 25
20	Leu Ala Glu Tyr Lys Ala Pro Pro Ala Gly Cys Gln Ile Asn Gln Val 30 35 40 45
25	Asn Ile Ile Gln Arg His Gly Ala Arg Phe Pro Thr Ser Gly Ala Thr 50 55 60
30	Thr Arg Ile Lys Ala Gly Leu Thr Lys Leu Gln Gly Val Gln Asn Phe 65 70 75
35	Thr Asp Ala Lys Phe Asn Phe Ile Lys Ser Phe Lys Tyr Asp Leu Gly 80 85 90
40	Asn Ser Asp Leu Val Pro Phe Gly Ala Ala Gln Ser Phe Asp Ala Gly 95 100 105
45	Gln Glu Ala Phe Ala Arg Tyr Ser Lys Leu Val Ser Lys Asn Asn Leu 110 115 120 125
50	Pro Phe Ile Arg Ala Asp Gly Ser Asp Arg Val Val Asp Ser Ala Thr 130 135 140
55	Asn Trp Thr Ala Gly Phe Ala Ser Ala Ser His Asn Thr Val Gln Pro 145 150 155
60	Lys Leu Asn Leu Ile Leu Pro Gln Thr Gly Asn Asp Thr Leu Glu Asp 160 165 170
65	Asn Met Cys Pro Ala Ala Gly Asp Ser Asp Pro Gln Val Asn Ala Trp 175 180 185
70	Leu Ala Val Ala Phe Pro Ser Ile Thr Ala Arg Leu Asn Ala Ala 190 195 200 205
75	Pro Ser Val Asn Leu Thr Asp Thr Asp Ala Phe Asn Leu Val Ser Leu 210 215 220
80	Cys Ala Phe Leu Thr Val Ser Lys Glu Lys Lys Ser Asp Phe Cys Thr 225 230 235
85	Leu Phe Glu Gly Ile Pro Gly Ser Phe Glu Ala Phe Ala Tyr Gly Gly 240 245 250
90	Asp Leu Asp Lys Phe Tyr Gly Thr Gly Tyr Gly Gln Glu Leu Gly Pro 255 260 265
95	Val Gln Gly Val Gly Tyr Val Asn Glu Leu Ile Ala Arg Leu Thr Asn 270 275 280 285
100	Ser Ala Val Arg Asp Asn Thr Gln Thr Asn Arg Thr Leu Asp Ala Ser 290 295 300
105	Pro Val Thr Phe Pro Leu Asn Lys Thr Phe Tyr Ala Asp Phe Ser His 305 310 315
110	Asp Asn Leu Met Val Ala Val Phe Ser Ala Met Gly Leu Phe Arg Gln 320 325 330
115	Pro Ala Pro Leu Ser Thr Ser Val Pro Asn Pro Trp Arg Thr Trp Arg 335 340 345
120	Thr Ser Ser Leu Val Pro Phe Ser Gly Arg Met Val Val Glu Arg Leu 350 355 360 365
125	Ser Cys Phe Gly Thr Thr Lys Val Arg Val Leu Val Gln Asp Gln Val

ES 2 323 440 T3

370                    375                    380  
Gln Pro Leu Glu Phe Cys Gly Gly Asp Arg Asn Gly Leu Cys Thr Leu  
385                    390                    395  
Ala Lys Phe Val Glu Ser Gln Thr Phe Ala Arg Ser Asp Gly Ala Gly  
400                    405                    410  
Asp Phe Glu Lys Cys Phe Ala Thr Ser Ala  
415                    420

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 27:

- 15                    (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
                      (A) LONGITUD: 1642 pares de bases  
                      (B) TIPO: ácido nucleico  
20                    (C) TIPO DE CADENA: único  
                      (D) TOPOLOGÍA: lineal  
  
25                    (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc  
  
26                    (vi) FUENTE ORIGINAL:  
                      (A) ORGANISMO: *Paxillus involutus*  
                      (B) CEPA: CBS 100231  
  
30                    (ix) CARACTERÍSTICA:  
                      (A) NOMBRE/CLAVE: CDS  
                      (B) UBICACIÓN: 48..1373  
  
35                    (ix) CARACTERÍSTICA:  
                      (A) NOMBRE/CLAVE: mat\_péptido  
                      (B) UBICACIÓN: 105..1373  
  
40                    (ix) CARACTERÍSTICA:  
                      (A) NOMBRE/CLAVE: sig\_péptido  
                      (B) UBICACIÓN: 48..104  
  
45                    (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 27:

50

55

60

65

# ES 2 323 440 T3

	GGATCCGAAT TCCAGTCCCC AAGCTAATCC TCTGCTCGCC TTGGAAG ATG CAC CTC Met His Leu -19	56
5	GGC TTC GTC ACC CTC GCT TGT CTC ATA CAC CTC TCC GAG GTC TTC GCG Gly Phe Val Thr Leu Ala Cys Leu Ile His Leu Ser Glu Val Phe Ala -15 -10 -5	104
10	GCA TCC GTG CCC CGG AAT ATT GCT CCG AAG TTC TCA ATT CCG GAA AGC Ala Ser Val Pro Arg Asn Ile Ala Pro Lys Phe Ser Ile Pro Glu Ser 1 5 10 15	152
	GAG CAG CGA AAC TGG TCG CCT TAC TCT CCT TAC TTT CCC CTA GCC GAA Glu Gln Arg Asn Trp Ser Pro Tyr Ser Pro Tyr Phe Pro Leu Ala Glu 20 25 30	200
15	TAC AAG GCT CCT CCA GCA GGC TGC GAG ATT AAC CAA GTC AAT ATT ATC Tyr Lys Ala Pro Pro Ala Gly Cys Glu Ile Asn Gln Val Asn Ile Ile 35 40 45	248
20	CAA CGG CAT GGC GCA CGG TTC CCA ACC TCG GGT GCG GCC ACT CGC ATC Gln Arg His Gly Ala Arg Phe Pro Thr Ser Gly Ala Ala Thr Arg Ile 50 55 60	296
25	AAG GCT GGT TTA AGC AAG CTG CAA TCC GTC CAG AAT TTC ACC GAC CCC Lys Ala Gly Leu Ser Lys Leu Gln Ser Val Gln Asn Phe Thr Asp Pro 65 70 75 80	344
30	AAA TTC GAC TTC ATC AAG TCG TTC ACA TAC GAT CTT GGT ACT TCC GAC Lys Phe Asp Phe Ile Lys Ser Phe Thr Tyr Asp Leu Gly Thr Ser Asp 85 90 95	392
	CTC GTG CCA TTC GGC GCA GCA CAA TCA TTC GAT GCC GGC CTG GAG GTC Leu Val Pro Phe Gly Ala Ala Gln Ser Phe Asp Ala Gly Leu Glu Val 100 105 110	440

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 323 440 T3

	TTC GCT CGC TAT TCG AAG CTC GTC AGC TCG GAC AAC CTG CCT TTC ATT Phe Ala Arg Tyr Ser Lys Leu Val Ser Ser Asp Asn Leu Pro Phe Ile 115 120 125	488
5	CGC TCA GAT GGT AGC GAT CGT GTA GTC GAC ACT GCT ACG AAC TGG ACT Arg Ser Asp Gly Ser Asp Arg Val Val Asp Thr Ala Thr Asn Trp Thr 130 135 140	536
10	GCA GGT TTT GCT TCC GCG AGC CGC AAC GCG ATC CAA CCC AAG CTC GAC Ala Gly Phe Ala Ser Ala Ser Arg Asn Ala Ile Gln Pro Lys Leu Asp 145 150 155 160	584
	TTG ATA CTT CCA CAA ACT GGC AAT GAC ACC CTC GAG GAC AAC ATG TGT Leu Ile Leu Pro Gln Thr Gly Asn Asp Thr Leu Glu Asp Asn Met Cys 165 170 175	632
15	CCA GCT GCT GGC GAA TCC GAC CCT CAG GTC GAT GCG TGG TTG GCG TCC Pro Ala Ala Gly Glu Ser Asp Pro Gln Val Asp Ala Trp Leu Ala Ser 180 185 190	680
20	GCC TTC CCA TCT GTC ACC GCG CAG CTC AAC GCT GCA GCG CCT GGT GCC Ala Phe Pro Ser Val Thr Ala Gln Leu Asn Ala Ala Ala Pro Gly Ala 195 200 205	728
	AAT CTC ACA GAC GCC GAC GCC TTC AAC CTC GTC AGC CTG TGT CCC TTC Asn Leu Thr Asp Ala Asp Ala Phe Asn Leu Val Ser Leu Cys Pro Phe 210 215 220	776
25	ATG ACA GTT TCG AAG GAG CAG AAG AGC GAC TTC TGC ACG TTG TTC GAG Met Thr Val Ser Lys Glu Gln Lys Ser Asp Phe Cys Thr Leu Phe Glu 225 230 235 240	824
30	GGA ATC CCT GGA TCG TTC GAG GCG TTT GCC TAT GCC GGC GAC CTT GAC Gly Ile Pro Gly Ser Phe Glu Ala Phe Ala Tyr Ala Gly Asp Leu Asp 245 250 255	872
	AAG TTC TAT GGG ACC GGC TAT GGC CAA GCC CTC GGA CCG GTC CAA GGC Lys Phe Tyr Gly Thr Gly Gln Ala Leu Gly Pro Val Gln Gly 260 265 270	920
35	GTC GGC TAC ATC AAC GAG CTC CTT GCA CGC CTG ACC AAC TCC GCA GTG Val Gly Tyr Ile Asn Glu Leu Ala Arg Leu Thr Asn Ser Ala Val 275 280 285	968
40	AAC GAC AAC ACA CAG ACG AAC CGC ACA CTC GAC GCC GCA CCA GAC ACG Asn Asp Asn Thr Gln Thr Asn Arg Thr Leu Asp Ala Ala Pro Asp Thr 290 295 300	1016
	TTC CCG CTC AAC AAG ACC ATG TAC GCC GAT TTC TCA CAC GAC AAC CTC Phe Pro Leu Asn Lys Thr Met Tyr Ala Asp Phe Ser His Asp Asn Leu 305 310 315 320	1064
45	ATG GTC GCC GTG TTC TCC GCC ATG GGC CTC TTC CGC CAA TCC GCA CCG Met Val Ala Val Phe Ser Ala Met Gly Leu Phe Arg Gln Ser Ala Pro 325 330 335	1112
50	CTC AGC ACG TCC ACA CCG GAT CCG AAC CGC ACG TGG CTC ACG AGC TCT Leu Ser Thr Ser Thr Pro Asp Pro Asn Arg Thr Trp Leu Thr Ser Ser 340 345 350	1160
	GTC GTT CCG TTC TCC GCG CGC ATG GCC GTC GAA CGC CTC AGC TGT GCT Val Val Pro Phe Ser Ala Arg Met Ala Val Glu Arg Leu Ser Cys Ala 355 360 365	1208
55	GGT ACC ACG AAG GTG CGC GTC CTG GTG CAG GAC CAG GTC CAG CCA CTC Gly Thr Thr Lys Val Arg Val Leu Val Gln Asp Gln Val Gln Pro Leu 370 375 380	1256
60	GAG TTC TGC GGC GGC GAC CAG GAT GGG TTG TGC GCG CTA GAC AAG TTC Glu Phe Cys Gly Gly Asp Gln Asp Gly Leu Cys Ala Leu Asp Lys Phe 385 390 395 400	1304
	GTC GAG AGC CAG GCG TAT GCA CGG AGT GGT GGC GCA GGT GAC TTT GAG Val Glu Ser Gln Ala Tyr Ala Arg Ser Gly Gly Ala Gly Asp Phe Glu 405 410 415	1352
65	AAG TGT CTT GCG ACG ACG GTG TGAGATGGGG TAATCTACGG TGAAGCAGCG Lys Cys Leu Ala Thr Thr Val 420	1403

# ES 2 323 440 T3

GAGAGCCTCT CAACGAATGC AAAGGGATAGG TTTCGAGGCTT ACTTCATCAA CCTATATCAT CATAGGACAA GCCCCCAAT AGCCAGACTC GTCGTTGAC ATCGTGTATG AAAATAACCC ACCCACGCAC TCCGCTGCCA CTATTGCGT GTATCGCATA CTAGGCAGTT TCGCCCAGTT 5 GAACATGAGC CCATTCTGTC CCCAGTGAAA AAAAAAAA AAAAAATTCC TGCGGCCGC	1463 1523 1583 1642
--	------------------------------

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 442 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO: 28:

Met His Leu Gly Phe Val Thr Leu Ala Cys Leu Ile His Leu Ser Glu -19 -15 -10 -5	1463 1523 1583 1642
Val Phe Ala Ala Ser Val Pro Arg Asn Ile Ala Pro Lys Phe Ser Ile 1 5 10	
Pro Glu Ser Glu Gln Arg Asn Trp Ser Pro Tyr Ser Pro Tyr Phe Pro 15 20 25	
Leu Ala Glu Tyr Lys Ala Pro Pro Ala Gly Cys Glu Ile Asn Gln Val 30 35 40 45	
Asn Ile Ile Gln Arg His Gly Ala Arg Phe Pro Thr Ser Gly Ala Ala 50 55 60	
Thr Arg Ile Lys Ala Gly Leu Ser Lys Leu Gln Ser Val Gln Asn Phe 65 70 75	
Thr Asp Pro Lys Phe Asp Phe Ile Lys Ser Phe Thr Tyr Asp Leu Gly 80 85 90	
Thr Ser Asp Leu Val Pro Phe Gly Ala Ala Gln Ser Phe Asp Ala Gly 95 100 105	
Leu Glu Val Phe Ala Arg Tyr Ser Lys Leu Val Ser Ser Asp Asn Leu 110 115 120 125	
Pro Phe Ile Arg Ser Asp Gly Ser Asp Arg Val Val Asp Thr Ala Thr 130 135 140	
Asn Trp Thr Ala Gly Phe Ala Ser Ala Ser Arg Asn Ala Ile Gln Pro 145 150 155	
Lys Leu Asp Leu Ile Leu Pro Gln Thr Gly Asn Asp Thr Leu Glu Asp 160 165 170	
Asn Met Cys Pro Ala Ala Gly Glu Ser Asp Pro Gln Val Asp Ala Trp 175 180 185	
Leu Ala Ser Ala Phe Pro Ser Val Thr Ala Gln Leu Asn Ala Ala Ala 190 195 200 205	
Pro Gly Ala Asn Leu Thr Asp Ala Asp Ala Phe Asn Leu Val Ser Leu 210 215 220	
Cys Pro Phe Met Thr Val Ser Lys Glu Gln Lys Ser Asp Phe Cys Thr 225 230 235	
Leu Phe Glu Gly Ile Pro Gly Ser Phe Glu Ala Phe Ala Tyr Ala Gly 240 245 250	
Asp Leu Asp Lys Phe Tyr Gly Thr Gly Tyr Gly Gln Ala Leu Gly Pro 255 260 265	

# ES 2 323 440 T3

Val Gln Gly Val Gly Tyr Ile Asn Glu Leu Leu Ala Arg Leu Thr Asn  
 270 275 280 285  
 Ser Ala Val Asn Asp Asn Thr Gln Thr Asn Arg Thr Leu Asp Ala Ala  
 290 295 300  
 5 Pro Asp Thr Phe Pro Leu Asn Lys Thr Met Tyr Ala Asp Phe Ser His  
 305 310 315  
 Asp Asn Leu Met Val Ala Val Phe Ser Ala Met Gly Leu Phe Arg Gln  
 320 325 330  
 10 Ser Ala Pro Leu Ser Thr Ser Thr Pro Asp Pro Asn Arg Thr Trp Leu  
 335 340 345  
 Thr Ser Ser Val Val Pro Phe Ser Ala Arg Met Ala Val Glu Arg Leu  
 350 355 360 365  
 15 Ser Cys Ala Gly Thr Thr Lys Val Arg Val Leu Val Gln Asp Gln Val  
 370 375 380  
 Gln Pro Leu Glu Phe Cys Gly Gly Asp Gln Asp Gly Leu Cys Ala Leu  
 385 390 395  
 20 Asp Lys Phe Val Glu Ser Gln Ala Tyr Ala Arg Ser Gly Gly Ala Gly  
 400 405 410  
 Asp Phe Glu Lys Cys Leu Ala Thr Thr Val  
 415 420

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 29:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1536 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

35 (vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Trametes pubescens*
- (B) CEPA: CBS 100232

40 (xi) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) UBICACIÓN: 79..1407

45 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: mat\_péptido
- (B) UBICACIÓN: 130..1407

50 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: sig\_péptido
- (B) UBICACIÓN: 79..129

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 29:

GGATCCGAAT TCGCCCCCAC ATTCTGTTCCA TCTTAGCAGC CGTCCGCGCC CAGGTCTTCG	60
ATAACCCCCC GCGTGACT ATG GCC TTC TCA ATC TTG GCC TCG CTG CTC TTC	111
Met Ala Phe Ser Ile Leu Ala Ser Leu Leu Phe	
-17 -15 -10	
G TG TGT TAT GCA TAC GCC AGG GCT GTG CCC CGT GCA CAT ATC CCG CTC	159
Val Cys Tyr Ala Tyr Ala Arg Ala Val Pro Arg Ala His Ile Pro Leu	
-5 1 5 10	
CGC GAC ACC TCC GCG TGT CTA GAT GTA ACA CGC GAT GTG CAG CAG AGC	207
Arg Asp Thr Ser Ala Cys Leu Asp Val Thr Arg Asp Val Gln Gln Ser	
15 20 25	
TGG TCC ATG TAC TCT CCC TAT TTC CCG GCA GCA ACT TAT GTG GCT CCG	255

# ES 2 323 440 T3

	Trp Ser Met Tyr Ser Pro Tyr Phe Pro Ala Ala Thr Tyr Val Ala Pro		
	30 35 40		
5	CCC GCG AGT TGC CAG ATC AAT CAG GTC CAC ATC ATC CAA CGT CAT GGT Pro Ala Ser Cys Gln Ile Asn Gln Val His Ile Ile Gln Arg His Gly	50 55	303
	GCA CGC TTT CCC ACG TCT GGC GCA GCA AAG CGC ATC CAG ACA GCA GTA Ala Arg Phe Pro Thr Ser Gly Ala Ala Lys Arg Ile Gln Thr Ala Val	60 65 70	351
10	GCG AAG CTG AAG GCC GCG TCC AAC TAC ACC GAT CCC CTG CTC GCG TTC Ala Lys Leu Lys Ala Ala Ser Asn Tyr Thr Asp Pro Leu Leu Ala Phe	75 80 85 90	399
15	GTT ACG AAC TAC ACC TAC AGC TTA GGT CAG GAC AGC CTC GTT GAA CTC Val Thr Asn Tyr Thr Ser Leu Gly Gln Asp Ser Leu Val Glu Leu	95 100 105	447
	GGT GCG ACT CAG TCC TCC GAA GCG GGC CAG GAG GCA TTC ACG CGG TAC Gly Ala Thr Gln Ser Ser Glu Ala Gly Gln Glu Ala Phe Thr Arg Tyr	110 115 120	495
20	TCA TCC CTC GTG AGC GCG GAC GAG CTT CCC TTC GTT CGG GCG TCG GGC Ser Ser Leu Val Ser Ala Asp Glu Leu Pro Phe Val Arg Ala Ser Gly	125 130 135	543
25	TCA GAT CGC GTC GTT GCG ACT GCC AAC AAC TGG ACT GCA GGT TTC GCG Ser Asp Arg Val Val Ala Thr Ala Asn Asn Trp Thr Ala Gly Phe Ala	140 145 150	591
	CTT GCG AGC TCA AAC AGC ATC ACG CCC GTG CTC TCA GTC ATC ATT TCC Leu Ala Ser Ser Asn Ser Ile Thr Pro Val Leu Ser Val Ile Ile Ser	155 160 165 170	639
30	GAA GCG GGC AAT GAC ACC CTC GAC GAC AAC ATG TGC CCC GCT GCA GGC Glu Ala Gly Asn Asp Thr Leu Asp Asp Asn Met Cys Pro Ala Ala Gly	175 180 185	687
	GAT TCG GAT CCC CAG GTC AAT CAA TGG CTC GCG CAG TTC GCA CCG CCG Asp Ser Asp Pro Gln Val Asn Gln Trp Leu Ala Gln Phe Ala Pro Pro	190 195 200	735
35	ATG ACT GCT CGC CTC AAC GCA GGC GCG CCC GGC GCG AAC CTC ACG GAC Met Thr Ala Arg Leu Asn Ala Gly Ala Pro Gly Ala Asn Leu Thr Asp	205 210 215	783
	ACG GAC ACC TAC AAC CTG CTC ACG CTA TGC CCG TTC GAG ACT GTA GCC Thr Asp Thr Tyr Asn Leu Leu Thr Leu Cys Pro Phe Glu Thr Val Ala	220 225 230	831
40	ACC GAG CGG CGT AGT GAA TTC TGC GAC ATC TAC GAG GAG CTG CAG GCG Thr Glu Arg Arg Ser Glu Phe Cys Asp Ile Tyr Glu Glu Leu Gln Ala	235 240 245 250	879
	GAA GAC GCC TTC GCG TAC AAT GCC GAT CTC GAC AAG TTC TAC GGC ACT Glu Asp Ala Phe Ala Tyr Asn Ala Asp Leu Asp Lys Phe Tyr Gly Thr	255 260 265	927
45	GGA TAC GGC CAG CCC CTC GGA CCC GTG CAA GGC GTC GGG TAC ATC AAC Gly Tyr Gly Gln Pro Leu Gly Pro Val Gln Gly Val Gly Tyr Ile Asn	270 275 280	975
	GAG CTC ATC GCG CGC CTC ACC GCG CAG AAC GTG TCC GAC CAC ACG CAG Glu Leu Ile Ala Arg Leu Thr Ala Gln Asn Val Ser Asp His Thr Gln	285 290 295	1023
50	ACG AAC AGC ACA CTC GAC TCC TCG CCC GAG ACG TTC CCG CTC AAC CGC Thr Asn Ser Thr Leu Asp Ser Ser Pro Glu Thr Phe Pro Leu Asn Arg	300 305 310	1071
	ACG CTC TAC GCG GAC TTC TCG CAC GAC AAC CAG ATG GTC GCG ATC TTC Thr Leu Tyr Ala Asp Phe Ser His Asp Asn Gln Met Val Ala Ile Phe	315 320 325 330	1119
55	TCG GCC ATG GGT CTC TTC AAC CAG TCC GCG CCG CTC GAC CCG ACG ACG		1167

# ES 2 323 440 T3

	Ser Ala Met Gly Leu Phe Asn Gln Ser Ala Pro Leu Asp Pro Thr Thr		
	335 340 345		
5	CCC GAC CCC GCG CGC ACG TTC CTC GTC AAG AAG ATC GTG CCG TTC TCC Pro Asp Pro Ala Arg Thr Phe Leu Val Lys Lys Ile Val Pro Phe Ser		1215
	350 355 360		
	GCG CGC ATG GTC GTC GAG CGC CTC GAC TGC GGC GGT GCG CAG AGC GTG Ala Arg Met Val Val Glu Arg Leu Asp Cys Gly Gly Ala Gln Ser Val		1263
10	365 370 375		
	CGC CTG CTC GTG AAC GAC GCA GTG CAG CCG CTG GCG TTC TGC GGG GCG Arg Leu Leu Val Asn Asp Ala Val Gln Pro Leu Ala Phe Cys Gly Ala		1311
	380 385 390		
	GAC ACG AGC GGG GTG TGC ACG CTG GAC GCG TTT GTC GAG AGC CAG GCG Asp Thr Ser Gly Val Cys Thr Leu Asp Ala Phe Val Glu Ser Gln Ala		1359
15	395 400 405 410		
	TAC GCG CGG AAC GAT GGC GAG GGC GAC TTC GAG AAG TGC TTC GCG ACA Tyr Ala Arg Asn Asp Gly Glu Gly Asp Phe Glu Lys Cys Phe Ala Thr		1407
	415 420 425		
20	TAGTTCCAGG TGTAGATACC CGGGGAAGAT GTACTCTCTA GACACCTCGC ATGTACTTAT CGATTAGAAA GAGACCCCTGG CTGCTCTGCC CTCAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAATTCC		1467
	TGCGGCCGC		1527
			1536

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 30:

25	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:		
	(A) LONGITUD: 443 aminoácidos		
	(B) TIPO: aminoácido		
30	(C) TOPOLOGÍA: lineal		
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína		
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 30:		
35	Met Ala Phe Ser Ile Leu Ala Ser Leu Leu Phe Val Cys Tyr Ala Tyr -17 -15 -10 -5		
	Ala Arg Ala Val Pro Arg Ala His Ile Pro Leu Arg Asp Thr Ser Ala 1 5 10 15		
40	Cys Leu Asp Val Thr Arg Asp Val Gln Gln Ser Trp Ser Met Tyr Ser 20 25 30		
	Pro Tyr Phe Pro Ala Ala Thr Tyr Val Ala Pro Pro Ala Ser Cys Gln 35 40 45		
45	Ile Asn Gln Val His Ile Ile Gln Arg His Gly Ala Arg Phe Pro Thr 50 55 60		
	Ser Gly Ala Ala Lys Arg Ile Gln Thr Ala Val Ala Lys Leu Lys Ala 65 70 75		
50	Ala Ser Asn Tyr Thr Asp Pro Leu Leu Ala Phe Val Thr Asn Tyr Thr 80 85 90 95		
	Tyr Ser Leu Gly Gln Asp Ser Leu Val Glu Leu Gly Ala Thr Gln Ser 100 105 110		
55	Ser Glu Ala Gly Gln Glu Ala Phe Thr Arg Tyr Ser Ser Leu Val Ser 115 120 125		
60	Ala Asp Glu Leu Pro Phe Val Arg Ala Ser Gly Ser Asp Arg Val Val 130 135 140		
	Ala Thr Ala Asn Asn Trp Thr Ala Gly Phe Ala Leu Ala Ser Ser Asn 145 150 155		
65	Ser Ile Thr Pro Val Leu Ser Val Ile Ile Ser Glu Ala Gly Asn Asp 160 165 170 175		

# ES 2 323 440 T3

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

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 276 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- 65 (A) ORGANISMO: *Schizophyllum sp.*
- (B) CEPA: CBS 443.97

(ix) CARACTERÍSTICA:

# ES 2 323 440 T3

- (A) NOMBRE/CLAVE: misc feature  
(B) UBICACIÓN:1..276  
(D) OTRA INFORMACIÓN:/producto= “fragmento de PCR generado con SEC ID NOs 15 y 17”

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 31:

TCTGCCGCAT CTGACGGTGT CTATAACCCC GTCCTCAACC TGATTATATC AGAAGAGCTT	60
AACGACACCC TCGATGATGC GATGTGCCG AACGTCGGCG AATCGGACGC CCAAACGGAC	120
GAATGGACGT CTATTTACGC AGCGCCCATC GCTGAGCGTC TGAACAACAA CGCCGTGGGC	180

GCTAACCTGA CCACCACGAA CGTTTACAAC CTCATGTCTT TATGCCCTT CGACACGCTT	240
GCAGAAGGAGA CGCCGAGCCC CTTCTGCGAT CTCTTT	276

15 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID Nº: 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 92 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(C) TIPO DE CADENA: único  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Schizophyllum sp.*  
(B) CEPA: CBS 443.97

25 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: región  
(B) UBICACIÓN:1..92  
(D) OTRA INFORMACIÓN:/nota= “la secuencia de aminoácidos deducida de la SEC ID NO: 31”

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 32:

Ser Ala Ala Ser Asp Gly Val Tyr Asn Pro Val Leu Asn Leu Ile Ile	
1 5 10 15	

Ser Glu Glu Leu Asn Asp Thr Leu Asp Asp Ala Met Cys Pro Asn Val	
20 25 30	

Gly Glu Ser Asp Ala Gln Thr Asp Glu Trp Thr Ser Ile Tyr Ala Ala	
35 40 45	

Pro Ile Ala Glu Arg Leu Asn Asn Ala Val Gly Ala Asn Leu Thr	
50 55 60	

Thr Thr Asn Val Tyr Asn Leu Met Ser Leu Cys Pro Phe Asp Thr Leu	
65 70 75 80	

Ala Lys Glu Thr Pro Ser Pro Phe Cys Asp Leu Phe	
85 90	