(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 350 320**

(51) Int. Cl.:
C12N 9/16 (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)
C12P 3/00 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
A23K 1/165 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06778826 .5**
(96) Fecha de presentación : **07.07.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1915442**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **30.04.2008**

(54) Título: **Fitasa de *Debaryomyces castellii*.**

(30) Prioridad: **08.07.2005 FR 05 07336**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.01.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.01.2011

(73) Titular/es: **ADISSEO FRANCE S.A.S.**
42 avenue Aristide Briand
92160 Antony, FR

(72) Inventor/es: **Boze, Helene;**
Moulin, Guy y
Aumelas, Andre

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Fitasa de *Debaryomyces castellii*.

La presente invención se refiere a una fitasa de *Debaryomyces castellii*, al gen que codifica esta fitasa, a unos organismos hospedantes recombinantes que expresan esta fitasa, así como a sus aplicaciones en el campo de la nutrición animal en particular.

Las sales del ácido fítico (myo-inositol hexakis fosfato) o fitatos (myo-inositol hexakis(dihidrógeno fosfato) son la forma principal de almacenamiento del fósforo en los cereales, las plantas leguminosas y oleaginosas. Constituyen así la fuente principal de fósforo en los alimentos para animales a base de plantas, componentes principales de los regímenes de los animales monogástricos (aves de corral y cerdos). Sin embargo, la biodisponibilidad de este fósforo en los alimentos está limitada para estos animales. En efecto, éstos no poseen las enzimas intestinales que degradan los fitatos en cantidad suficiente para permitir la hidrólisis de los fitatos y suministrar así las cantidades de fosfato inorgánico que les son necesarias. En el contexto de la nutrición animal, dos características del ácido fítico desempeñan una función importante: (1) los animales monogástricos son poco capaces de degradar el ácido fítico en el aparato digestivo; (2) el ácido fítico es un factor anti-nutricional, que forma unos complejos con las proteínas y los iones (Fe^{3+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}) y disminuye por lo tanto la disponibilidad de estos elementos.

Las raciones alimenticias de las aves de corral y de los cerdos deben por lo tanto ser suplementadas con fosfato inorgánico mientras que el fósforo de los fitatos es excretado y contribuye a la eutrofización de las aguas de superficie en las zonas de cría intensiva de animales monogástricos.

La complementación de las raciones de los animales monogástricos mediante unas enzimas es una solución utilizada actualmente para mejorar la biodisponibilidad del fósforo unido al fitato y para disminuir la suplementación de los alimentos con fósforo inorgánico y reducir así la excreción de fósforo en las zonas de cría intensiva.

Las fitasas (myo-inositol hexakis fosfato 3- y 6-fosfohidrolasas EC 3.1.3.8 y 3.1.3.26) forman parte de la familia de las histidinas fosfatasas ácidas. Éstas catalizan la hidrólisis del *myo*-inositol hexakisfosfato (ácido fítico, $InsP_6$) en monofosfato inorgánico y en *myo*-inositol fosfato de grado de fosforilación inferior ($InsP_5$ a $InsP_1$) y en *myo*-inositol libre en algunos casos.

Estas enzimas utilizadas como aditivo en la alimentación animal, permiten por un lado aumentar la disponibilidad del fósforo fítico y, por otro lado, mejorar la digestibilidad de los alimentos. Además, la liberación de fosfato fítico disminuye considerablemente los costes debidos a la suplementación con fosfato, así como la contaminación provocada por un exceso de fosfatos excretados.

Las fitasas son producidas por una gran variedad de organismos: plantas, animales y sobre todo microorganismos. Entre los microorganismos productores de fitasas se citarán en particular: Los hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucoret Rhizopus*, las bacterias: *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Bacillus subtilis*, y levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Torulopsis candida*, *Debaryomyces castellii*, *Debaryomyces occidentalis*, *Kluyveromyces fragilis* y *Schwanniomyces castellii*.

En lo que se refiere a las levaduras, Lambrechts *et al*. (Biotechnology Letters, Vol. 14, nº 1, 61-66, 1992) han identificado diferentes cepas que tienen una actividad fitasa pero no han caracterizado las fitasas correspondientes. La actividad más elevada ha sido medida para la cepa CBS2863 de *Schwanniomyces castellii*. Unas actividades fitasas han sido observadas asimismo para *Candida brumptii* CBS 6145, *C. tropicalis* CBS5696, *Debaryomyces castellii* CBS 2923, *Kluyveromyces fragilis* nº 111, *K. fragilis* CBS 1555, *K. fragilis* CBS5795, *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1253, *Schwanniomyces castellii* CBS 2863, *Torulopsis candida* CBS 940, *C. melibiosica* CBS 584, *K. lactis* CBS 2359, *T. bovina* CBS 2760 y *Zygosaccharomyces fennentati* CBS6772.

Asimismo, Nakamura Yoshihiro *et al*. (Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 64, nº 4, 841-844, 2000) han identificado diferentes fitasas, pero no las han caracterizado.

Se debe observar además que la clasificación de las levaduras ha sido revisada. Según la nueva clasificación (Nakase T., Suzuki M., Phaff H. J. y Kurtzman C.P., 1998 p157-167 en C. P. Kurtzman y J.W. Fell (ed.), The Yeasts, A taxonomic study, 4ª Ed. Elsevier Sci. Publication Amsterdam), la cepa CBS 2923 corresponde a *Debaryomyces castellii Capriotti* y la cepa CBS 2863 corresponde a *Debaryomyces occidentalis Klocker var. occidentalis*, sinónimos *Schwanniomyces castellii Capriotti* y *Schwanniomyces occidentalis Kloker*. Los inventores han demostrado que la alineación del polipéptido de la SEC ID nº 2, es decir, la secuencia de la fitasa de *Debaryomyces castellii* CBS 2923, conduce a un porcentaje de identidad de 69,2% con la secuencia de la fitasa de *Schwanniomyces occidentalis* CBS 2863.

Numerosas fitasas de microorganismos han sido ya estudiadas y utilizadas en diversas aplicaciones agro-industriales. Sin embargo, la utilización creciente de fitasas como aditivo en numerosas aplicaciones bio-tecnológicas, tal como la alimentación animal aumenta el interés: (1) de aislar nuevos microorganismos productores eficaces de fitasas, (2) de obtener unas fitasas competentes, es decir, que presentan una eficacia para liberar unos fosfatos del alimento en el

tracto digestivo, una estabilidad al calor durante el proceso de fabricación del alimento y durante el almacenamiento, y un bajo coste de producción.

Además, la mayoría de las fitasas descritas en la actualidad hidrolizan sólo parcialmente el ácido fítico y algunas con unas cinéticas muy lentas. Además, su actividad de hidrólisis depende en gran medida de sus condiciones de utilización.

En la actualidad, entre las levaduras, sólo la fitasa de la levadura *Schwanniomyces occidentalis* ha sido descrita como hidrolizante de todos los grupos fosfato del fitato (EP 0 699 762 y Segueilha L., Lambrechts C., Boze H., Moulin G., Galzy P., (1992) Purification and properties of a phytase from *Schwanniomyces Castelli*, J. Ferm. Bioeng., 74, 7-11). Sin embargo, la fitasa de *Schwanniomyces occidentalis* es sensible a los cationes ($ZnCl_2$ y $CuCl_2$ en particular) lo cual no es favorable para una utilización en la alimentación animal puesto que estos cationes están presentes en el bolo alimenticio (Segueilha *et al*., 1992). Además, esta enzima es activa en una gama de pH de 2,7 a 5 (EP 0 699 762) y el pCMB inhibe en gran medida la actividad de la fitasa de *Schwanniomyces occidentalis*, lo cual sugiere que unos grupos SH (puentes disulfuros) están implicados en el sitio activo de la enzima (Segueilha *et al*., 1992). Además, la biosíntesis de esta fitasa necesita la presencia de fitatos y de sales de calcio (EP 0 699 762). La actividad de esta enzima depende por lo tanto en gran medida del entorno en el que se encuentra. El problema que se propone resolver la presente invención consiste en proponer una fitasa que hidroliza todos los grupos fosfato del fitato y cuya actividad depende poco de las condiciones de utilización de la enzima.

Este inconveniente se resuelve mediante la fitasa de la SEC ID nº 2. De manera ventajosa, esta fitasa es capaz de hidrolizar la totalidad de los grupos fosfato del fitato hasta la liberación del myo-inositol. Posee asimismo un amplio espectro de actividad e hidroliza así numerosos sustratos. De manera ventajosa, la biosíntesis de esta fitasa está inducida por los fitatos, incluso en ausencia de sales de calcio. Ventajosamente, esta fitasa es activa en un intervalo de pH amplio (pH 3 a 6,5) y no es sensible a los cationes o al pCMB. La enzima es asimismo termoestable hasta 66ºC. La enzima de la presente invención es por lo tanto extremadamente robusta, lo cual es favorable para una utilización en alimentación animal pero también en otras aplicaciones industriales.

La invención se refiere asimismo a unas fitasas similares u homólogas, a unas variantes y a unos fragmentos de la fitasa de la SEC ID nº 2 que conservan las mismas propiedades.

Descripción de las secuencias

SEC ID nº 1: Secuencia genómica del gen de la fitasa de *Debaryomyces castellii* CBS 2923.

SEC ID nº 2: Secuencia de la fitasa de *Debaryomyces castellii* CBS 2923.

SEC ID nº 3: Secuencia de consenso de las fosfatasas ácidas.

SEC ID nº 4: Motivo de la fitasa de *Debaryomyces castellii* que corresponde a la secuencia de consenso de las fosfatasas ácidas de la SEC ID nº 3.

SEC ID nºs 5-16: Cebadores para clonación.

SEC ID nºs 17-18: Péptidos de la fitasa de *Debaryomyces castellii* utilizados para la clonación del gen.

Descripción de la invención

La invención tiene por objeto unos polipéptidos que comprenden un polipéptido seleccionado de entre los polipéptidos siguientes:

- el polipéptido de la SEC ID nº 2
- un fragmento del polipéptido de la SEC ID nº 2 que tiene una actividad fitasa,
- un polipéptido que tiene una actividad fitasa y que presenta por lo menos 90% de identidad con el polipéptido de la SEC ID nº 2.

La invención tiene asimismo por objeto unos polinucleótidos que codifican para una actividad fitasa seleccionados de entre los polinucleótidos siguientes:

- el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 1538 y la posición 2923 de la SEC ID nº 1,
- un polinucleótido que codifica para un polipéptido según la reivindicación 1.

La invención se refiere asimismo a los polinucleótidos que tienen la secuencia de la SEC ID nº 1 o la secuencia complementaria a la SEC ID nº 1.

La invención se refiere asimismo a unos casetes de expresión que comprenden en el sentido de la transcripción:

- un promotor funcional en un organismo hospedante;
- un polinucleótido según la invención; y
- una secuencia terminadora en el mismo organismo hospedante.

La invención se refiere asimismo a unos vectores que comprenden un polinucleótido según la invención y/o un casete de expresión según la invención.

Otro objetivo de la presente invención consiste en un organismo hospedante transformado con un polinucleótido según la invención, un casete de expresión según la invención y/o un vector según la invención.

El organismo hospedante es *Pichia pastoris*.

La invención tiene por objeto unos aditivos nutricionales para animales que comprenden un polipéptido según la invención.

La invención tiene asimismo por objeto unos aditivos nutricionales para animales que comprenden un organismo hospedante según la invención y/o un mosto de fermentación de un organismo hospedante según la invención.

En un modo de realización de la invención, el aditivo nutricional para animales se presenta en forma líquida o en forma de polvo.

La invención se refiere a los alimentos para animales que comprenden una base nutricional para animales y un aditivo nutricional para animales según la invención.

La invención se refiere asimismo a unos alimentos para animales que comprenden un polipéptido según la invención, un organismo hospedante según la invención y/o un mosto de fermentación de un organismo hospedante según la invención.

La invención se refiere asimismo a la utilización de un polipéptido según la invención o de un organismo hospedante según la invención para la fabricación de un aditivo nutricional para animales o de un alimento para animales.

Otro objeto de la presente invención es la utilización de un polipéptido según la invención o de un organismo hospedante según la invención para la hidrólisis del myo-inositol hexakisfosfato en monofosfato inorgánico, en myo-inositol de grado de fosforilación inferior y en myo-inositol libre.

Polipéptidos

La presente invención se refiere por lo tanto a unos polipéptidos que tienen una actividad fitasa. Preferentemente, estos polipéptidos son aislados de *Debaryomyces castellii*.

La fitasa de *Debaryomyces castellii* CBS 2923 se representa en la SEC ID nº 2.

Por el término “fitasa” se entienden las myo-inositol hexakis fosfato 3- y 6-fosfohidrolasas (EC 3.1.3.8 y 3.1.3.26). Estas enzimas catalizan la hidrólisis del myo-inositolhexakisfosfato (ácido fítico, $InsP_6$) en monofosfato inorgánico y en myo-inositolfosfato de grado inferior ($InsP_5$ a $InsP_1$) y en myo-inositol libre para algunas fitasas.

La fitasa de *Debaryomyces castellii* de la SEC ID nº 2 es una 3-fitasa. Además, posee la capacidad destacable de hidrolizar la totalidad de los enlaces fosfato del ácido fítico.

La fitasa de la SEC ID nº 2 comprende el motivo RHGERYP (SEC ID nº 4) que corresponde a la secuencia de consenso RHGXRXP (SEC ID nº 3) presente en el sitio activo de numerosas fosfatasas ácidas. Este motivo se vuelve a encontrar en los aminoácidos 72-78 de la SEC ID nº 2. La fitasa de la SEC ID nº 2 posee asimismo el motivo HD presente en numerosas fitasas. Este motivo se vuelve a encontrar en la parte C-terminal en los aminoácidos 335-336 de la SEC ID nº 2.

En un modo de realización preferido de la invención, los polipéptidos según la invención poseen el motivo RHGERYP u otro motivo que corresponde a la secuencia de consenso RHGXRXP. Preferentemente, los polipéptidos según la invención poseen asimismo un motivo HD.

En un modo de realización preferido, los polipéptidos según la invención están glicosilados. El polipéptido de la SEC ID nº 2 posee en particular unos sitios putativos de N-glicosilación a los aminoácidos Asn 97, Asn 158, Asn 189, Asn 249, Asn 303, Asn 314, Asn 387, Asn 439 y Asn 453; y unos sitios putativos de O-glicosilación a los aminoácidos Thr 165, Ser 168, Thr 360 y Ser 364. En un modo de realización preferido, el polipéptido de la SEC ID nº 2 está glicosilado a uno o varios de estos sitios putativos de N-glicosilación y de O-glicosilación. En un modo de realización, los polipéptidos según la invención están glicosilados.

La fitasa de la SEC ID nº 2 presenta asimismo 8 cisteínas susceptibles de formar 4 puentes disulfuros: Cys 62, Cys 214, Cys 262, Cys 275, Cys 385, Cys 405, Cys 413 y Cys 435. En un modo de realización, los polipéptidos según la invención contienen por lo menos un puente disulfuro.

La fitasa de *Debaryomyces castellii* es una enzima segregada por esta levadura en su entorno extracelular.

Para la expresión y la secreción mediante un organismo hospedante recombinante, la fitasa de la SEC ID nº 2 puede ser fusionada en su extremo N-terminal con un péptido señal reconocido por este organismo hospedante.

La invención se refiere asimismo a unos fragmentos del polipéptido de la SEC ID nº 2 que conservan una actividad fitasa.

El término "fragmento" de un polipéptido designa un polipéptido que comprende una parte pero no la totalidad del polipéptido del que se deriva. La invención se refiere asimismo a un polipéptido que comprende un fragmento de por lo menos 100, 200, 300 ó 400 aminoácidos del polipéptido de la SEC ID nº 2.

Este fragmento del polipéptido de la SEC ID nº 2 conserva su actividad fitasa. La invención se refiere por lo tanto a los fragmentos biológicamente activos del polipéptido de la SEC ID nº 2.

La expresión "fragmento biológicamente activo" designa un fragmento de un polipéptido que conserva la función del polipéptido del que se deriva. Los fragmentos biológicamente activos del polipéptido de la SEC ID nº 2 conservan así las propiedades catalíticas de la fitasa de *Debaryomyces castellii* de la SEC ID nº 2. Los métodos de preparación de fragmentos de un polipéptido así como las técnicas de medición de la actividad fitasa son bien conocidos por el experto en la materia.

La invención tiene por objeto unos polipéptidos que tienen una actividad fitasa y que presentan por lo menos 90% de identidad con el polipéptido de la SEC ID nº 2. La invención tiene asimismo por objeto unos polipéptidos que presentan por lo menos 80%, 90%, 95%, 98% y preferentemente por lo menos 99% de aminoácidos idénticos con el polipéptido de la SEC ID nº 2.

Preferentemente, estos polipéptidos tienen las mismas propiedades y en particular las mismas propiedades catalíticas que los polipéptidos de la SEC ID nº 2. Preferentemente, estos polipéptidos están aislados de otras cepas de *Debaryomyces castellii* o de otras levaduras. Alternativamente, estos polipéptidos se pueden obtener mediante unas técnicas de mutagénesis dirigida por ejemplo.

Mediante la expresión "aminoácidos idénticos" se entienden unos aminoácidos invariables entre dos secuencias. Estos polipéptidos pueden presentar una deleción, una adición o una sustitución de por lo menos un aminoácido con respecto al polipéptido de la SEC ID nº 2.

La invención tiene asimismo por objeto unos polipéptidos que presentan por lo menos 90%, 95%, 98% y preferentemente por lo menos 99% de similitud con el polipéptido de la SEC ID nº 2. Preferentemente, estos polipéptidos tienen las mismas propiedades y en particular las mismas propiedades catalíticas que los polipéptidos de la SEC ID nº 2. Preferentemente, estos polipéptidos están aislados de otras cepas de *Debaryomyces castellii* o de otras levaduras. Alternativamente, estos polipéptidos se pueden obtener mediante unas técnicas de mutagénesis dirigida por ejemplo.

Por el término "similitud" se entiende la medición del parecido entre secuencias proteicas o nucleicas. Estos polipéptidos pueden presentar una deleción, una adición o una sustitución de por lo menos un aminoácido con respecto al polipéptido de la SEC ID nº 2. El grado de similitud entre dos secuencias, cuantificado por una puntuación, se basa en el porcentaje de identidades y/o de sustitución conservadoras de las secuencias.

Los métodos de medición y de identificación del grado de identidad y del grado de similitud entre polipéptidos son conocidos por el experto en la materia. Se puede utilizar, por ejemplo, Vector NTi 9.1.0, el programa de alineación AlignX (Clustal W algorithm) (Invitrogen INFORMAX, http://www.invitrogen.com). Preferentemente, se utilizan los parámetros por defecto.

Los polipéptidos según la invención están aislados o purificados de su entorno natural. Los polipéptidos se pueden preparar por medio de diferentes procedimientos. Estos procedimientos son en particular la purificación a partir de fuentes naturales tales como unas células que expresan naturalmente estos polipéptidos, la producción de polipéptidos recombinantes por unas células hospedantes apropiadas y su purificación ulterior, la producción mediante síntesis química o, por último, una combinación de estos diferentes enfoques. Estos diferentes procedimientos de producción son bien conocidos por el experto en la materia. Así, las fitasas de la presente invención se pueden aislar a partir

de *Debaryomyces Castelli*. En otro modo de realización, las fitasas de la presente invención son aisladas a partir de organismos hospedantes recombinantes que expresan una fitasa según la invención.

La invención tiene asimismo por objeto unas proteínas de fusión, unas proteínas recombinantes o unas proteínas quiméricas que comprenden los polipéptidos según la invención. El término "polipéptido" designa asimismo unas proteínas así como unos polipéptidos modificados.

Los polipéptidos según la presente invención tienen una actividad fitasa. Preferentemente, los polipéptidos presentan una actividad 3-fitasa y poseen la capacidad de hidrolizar la totalidad de los enlaces fosfato del ácido fítico.

Polinucleótidos

La invención se refiere asimismo a unos polinucleótidos que codifican para una fitasa según la invención. Preferentemente, estos polinucleótidos codifican la fitasa de la SEC ID nº 2 de *Debaryomyces Castelli*.

Según la presente invención, por el término "polinucleótido" se entiende una cadena nucleotídica monocatenaria o su complementaria o una cadena nucleotídica bicatenaria que puede ser de tipo ADN o ARN. Preferentemente, los polinucleótidos de la invención son de tipo ADN, en particular de ADN bicatenario. El término "polinucleótido" designa asimismo los polinucleótidos modificados.

Los polinucleótidos de la presente invención están aislados o purificados de su entorno natural. Preferentemente, los polinucleótidos de la presente invención se pueden preparar mediante las técnicas habituales de biología molecular tales como las descritas por Sambrook *et al*. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989) o mediante síntesis química.

En un primer modo de realización, la invención se refiere al polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 1538 y la posición 2923 de la SEC ID nº 1. Este polinucleótido codifica la fitasa de la SEC ID nº 2 de *Debaryomyces Castelli*.

Mediante la expresión "nucleótidos idénticos" se entienden unos nucleótidos invariables entre dos secuencias. Estos polinucleótidos pueden presentar una deleción, una adición o una sustitución de por lo menos un nucleótido con respecto al polinucleótido de referencia.

Por el término "similitud" se entiende la medición del parecido entre secuencias proteicas o nucleicas. Estos polinucleótidos pueden presentar una deleción, una adición o una sustitución de por lo menos un nucleótido con respecto al polinucleótido de referencia. El grado de similitud entre dos secuencias, cuantificado mediante una puntuación, se basa en el porcentaje de identidades y/o de sustitución conservadoras de las secuencias.

Los métodos de medición y de identificación del grado de identidad y del grado de similitud entre las secuencias de ácidos nucleicos son bien conocidos por el experto en la materia. Se puede utilizar, por ejemplo, Vector NTi Vector NTi 9.1.0, el programa de alineación AlignX (Clustal W algorithm) (Invitrogen INFORMAX, http://www.invitrogen.com). Preferentemente, se utilizan los parámetros por defecto.

Preferentemente, los polinucleótidos que presentan un grado de identidad o un grado de similitud con un polinucleótido de referencia conservan la función de la secuencia de referencia. En el presente caso, los polinucleótidos codifican para una actividad fitasa.

Mediante la expresión "secuencia capaz de hibridarse de manera selectiva" se entiende, según la invención, las secuencias que se hibridan con la secuencia de referencia a un nivel superior al ruido de fondo de manera significativa. El nivel de la señal generada por la interacción entre la secuencia capaz de hibridarse de manera selectiva y las secuencias de referencia es generalmente 10 veces, preferentemente 100 veces más intenso que el de la interacción de otras secuencias de ADN que generan el ruido de fondo. Las condiciones de hibridación astringentes que permiten una hibridación selectiva son bien conocidas por el experto en la materia. Generalmente, la temperatura de hibridación y de lavado es inferior por lo menos 5ºC al Tm de la secuencia de referencia a un pH dado y para una fuerza iónica dada. Típicamente, la temperatura de hibridación es de por lo menos 30ºC para un polinucleótido de 15 a 50 nucleótidos y de por lo menos 60ºC para un polinucleótido de más de 50 nucleótidos. A título de ejemplo, la hibridación se realiza en el tampón siguiente: 6X SSC, 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM de EDTA, 0,02% de PVP, 0,02% de Ficoll, 0,02% de BSA, 500 μg/ml de esperma de salmón desnaturalizado DNA. Los lavados se realizan, por ejemplo, sucesivamente a baja astringencia en un tampón 2X de SSC, 0,1% de SDS, a media astringencia en un tampón 0,5X de SSC, 0,1% de SDS, y a fuerte astringencia en un tampón 0,1X de SSC, 0,1% de SDS. La hibridación se puede llevar a cabo evidentemente según otros métodos habituales bien conocidos por el experto en la materia (véase en particular Sambrook *et al*., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989).

La invención se refiere de manera general a los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos según la invención. Debido a la degenerescencia del código genético, diferentes polinucleótidos pueden codificar para un mismo polipéptido.

Otro objeto de la presente invención es un polinucleótido cuya secuencia se representa en la SEC ID nº 1. El polinucleótido de la SEC ID nº 1 comprende unas secuencias que flanquean el marco abierto de lectura (ORF) del gen de la fitasa de *Debaryomyces Castelli*. Se trata en particular de las secuencias promotoras y terminadoras de este gen. Este gen puede ser expresado a partir de sus secuencias reguladoras homólogas en particular para una sobreexpresión en *Debaryomyces Castellii* o en otras levaduras.

En otro modo de realización, este gen puede ser expresado en diferentes organismos hospedantes tales como las bacterias, las levaduras y los hongos por ejemplo. El gen que codifica la fitasa de la SEC ID nº 2 puede ser expresado en un organismo hospedante bajo el control del promotor de la SEC ID nº 1 de la presente invención o bajo el control de un promotor heterólogo.

Casetes de expresión

Según un modo de realización de la invención, un polinucleótido que codifica para un polipéptido según la invención se inserta en un casete de expresión utilizando unas técnicas de clonación bien conocidas por el experto en la materia. Este casete de expresión comprende los elementos necesarios para la transcripción y para la traducción de las secuencias que codifican para los polipéptidos según la invención.

Ventajosamente, este casete de expresión comprende al mismo tiempo unos elementos que permiten hacer producir un polipéptido por una célula hospedante y unos elementos necesarios para la regulación de esta expresión.

Estos casetes de expresión comprenden en el sentido de la transcripción:

- un promotor funcional en un organismo hospedante;
- un polinucleótido según la invención; y
- una secuencia terminadora en el mismo organismo hospedante.

Se puede utilizar cualquier tipo de secuencia promotora en los casetes de expresión según la invención. La elección del promotor dependerá en particular del organismo hospedante seleccionado para la expresión del gen de interés. Algunos promotores permiten una expresión constitutiva mientras que otros promotores son, por el contrario inducibles. Entre los promotores funcionales en los hongos, se citará en particular el de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans* (Roberts *et al*., Current Genet. 15:177-180, 1989). Entre los promotores funcionales en las bacterias, se citará en particular el de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (Studier *et al*., Methods in enzymology 185:60-89, 1990). Entre los promotores funcionales en las levaduras, se citará en particular el del gen Gal1 (Elledge *et al*., Proc Natl Acad Sciences, USA. 88:1731-1735, 1991) o los promotores GAL4 y ADH de *S. cerevisiae*. Todos estos promotores están descritos en la bibliografía y son bien conocidos por el experto en la materia.

Para la expresión en *Penicillium funiculosum*, se seleccionarán por ejemplo unos casetes de expresión que comprenden un promotor histona Ha.B, un promotor ácido aspartilo proteasa o un promotor csl13 (WO 00/68401).

Para la expresión en la levadura *Pichia pastoris*, se seleccionarán por ejemplo unos casetes de expresión que comprenden el promotor AOX1 inducible por el metanol (Tschopp, J. F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W. y Grinna, L. (1987) High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. Biotechnology 5, 1305-1308) o el promotor constitutivo fuerte GAP (Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V. y Cregg, J. M. (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. Gene 186, 37-44).

Para la expresión en *Schizosaccharomyces pombe*, se seleccionarán por ejemplo unos casetes de expresión que comprenden el promotor de regulación *Nmt1* reprimido por la tiamina y activado en ausencia de tiamina (Maundrell, K., (1989) Nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. J. Biol. Chem. 265, 10857-10864.)

Los casetes de expresión, según la presente invención, pueden incluir además cualquier otra secuencia necesaria para la expresión de los polipéptidos o de los polinucleótidos tales como por ejemplo unos elementos de regulación o unas secuencias señal que permiten la secreción de los polipéptidos producidos por el organismo hospedante. Se puede utilizar en particular cualquier secuencia de regulación que permite aumentar el nivel de expresión de la secuencia codificante insertada en el casete de expresión. Según la invención, se pueden utilizar en particular, en asociación con la secuencia de regulación promotora, otras secuencias de regulación, que están situadas entre el promotor y la secuencia codificante, tales como unos activadores de transcripción ("enhancer").

Además, los casetes de expresión, según la presente invención, pueden incluir cualquier otra secuencia necesaria para la secreción de los polipéptidos producidos por el organismo hospedante tales como unas secuencias señal. Para la secreción por *Pichia pastoris*, se puede utilizar por ejemplo la secuencia del factor α como señal de secreción.

Se puede utilizar una gran variedad de secuencias terminadoras en los casetes de expresión según la invención, permitiendo estas secuencias la terminación de la transcripción y la poliadenilación del ARNm. Se puede utilizar cualquier secuencia terminadora funcional en el organismo hospedante seleccionado.

Para la expresión en *Penicillium funiculosum*, se seleccionarán por ejemplo unos casetes de expresión que comprenden un terminador histona H4.B, un terminador ácido aspartilo proteasa o un terminador csl13 (WO 00/68401).

La presente invención tiene asimismo por objeto un polinucleótido que comprende un casete de expresión según la invención, estando ventajosamente los casetes de expresión según la invención insertados en un vector.

Vectores

La presente invención se refiere por lo tanto asimismo a unos vectores de replicación o de expresión para la transformación de un organismo hospedante que comprende por lo menos un polinucleótido o un casete de expresión según la presente invención. Este vector puede estar constituido en particular por un plásmido, un cósmido, un bacteriófago o un virus en el que se inserta un polinucleótido o un casete de expresión según la invención. Las técnicas de construcción de estos vectores y de inserción de un polinucleótido de la invención en estos vectores son bien conocidas por el experto en la materia. De manera general, se puede utilizar cualquier vector capaz de mantenerse, de autoreplicarse o de propagarse en una célula hospedante y en particular con el fin de inducir la expresión de un polinucleótido o de un polipéptido. El experto en la materia seleccionará los vectores apropiados en particular en función del organismo hospedante a transformar y en función de la técnica de transformación utilizada.

Los vectores de la presente invención se utilizan en particular para transformar un organismo hospedante con vistas a la replicación del vector y/o a la expresión de un polipéptido según la invención en el organismo hospedante.

La invención se refiere asimismo a un método para preparar un polipéptido según la invención que comprende las etapas siguientes:

- transformar un organismo hospedante con un vector de expresión que comprende un casete de expresión según la invención y/o con un polinucleótido según la invención,

- aislar los polipéptidos producidos por el organismo hospedante.

Organismos hospedantes

La presente invención tiene asimismo por objeto un procedimiento de transformación de un organismo hospedante mediante la integración en dicho organismo hospedante de por lo menos un polinucleótido o de un casete de expresión o de un vector según la invención. El polinucleótido puede ser integrado en el genoma del organismo hospedante o replicarse de manera estable en el organismo hospedante. Los métodos de transformación de los organismos hospedantes son bien conocidos por el experto en la materia y están ampliamente descritos en la bibliografía.

La presente invención se refiere asimismo a un organismo hospedante transformado con un polinucleótido, un casete de expresión o un vector según la invención.

Mediante la expresión “organismo hospedante” se entiende *Pichia pastoris*.

En un modo de realización preferido de la invención, el organismo hospedante es una cepa de *Pichia pastoris* en la que se expresa una fitasa según la invención.

Según la presente invención, el organismo hospedante se transforma con el polinucleótido seleccionado de entre los polinucleótidos siguientes:

a) el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 1538 y la posición 2923 de la SEC ID nº 1,

b) un polinucleótido que codifica para un polipéptido seleccionado de entre los polipéptidos siguientes:

   - el polipéptido de la SEC ID nº 2,

   - un fragmento del polipéptido de la SEC ID nº 2 que tiene una actividad fitasa,

   - un polipéptido que tiene una actividad fitasa y que presenta por lo menos 90% de identidad con el polipéptido de la SEC ID nº 2.

Aunque puede ser que el organismo hospedante en estado salvaje posea el polinucleótido definido anteriormente, la presente invención tiene por objeto el organismo hospedante *transformado*. Según un modo de realización de la presente invención, el organismo hospedante está transformado con un polinucleótido de la invención, con vistas a

la expresión del polipéptido de la invención. Según otro modo de realización de la presente invención, el organismo hospedante está transformado con un polinucleótido de la invención, con vistas a la sobreexpresión del polipéptido de la invención.

Las técnicas de construcción de vectores, de transformación de organismos hospedantes y de expresión de proteínas heterólogas en estos organismos están ampliamente descritas en la bibliografía (Ausubel F.M. *et al*., "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes 1 y 2, Greene Publishing Associates y Wiley - Interscience, 1989; T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular Cloning A laboratory Handbook, 1982).

Aditivos alimenticios y alimentos para animales

La presente invención se refiere asimismo a unos aditivos alimenticios que aportan una actividad fitasa. La aportación de este tipo de actividad enzimática permite mejorar la digestibilidad del alimento y mejorar su valor nutricional.

Se entiende por aditivo nutricional una sustancia añadida intencionadamente a un alimento, generalmente en pequeñas cantidades, para mejorar sus características nutricionales o su digestibilidad. Los aditivos nutricionales para animales pueden contener por ejemplo unas vitaminas, unas sales minerales, unos aminoácidos y unas enzimas.

Típicamente, los aditivos nutricionales para animales comprenden un polipéptido según la invención, un organismo hospedante según la invención o un sobrenadante de cultivo/mosto de fermentación de un organismo hospedante según la invención. Así, los polipéptidos que tienen una actividad fitasa según la invención pueden ser purificados o aislados de una cepa de *Debaryomyces Castellii* o de un organismo hospedante recombinante para la fabricación de un aditivo nutricional para animales. Alternativamente, una cepa de *Debaryomyces Castellii* o un organismo hospedante que producen unas fitasas según la invención pueden ser utilizados directamente para la fabricación de un aditivo nutricional para animales. En un modo de realización preferido de la invención, el sobrenadante de cultivo o mosto de fermentación de un organismo hospedante según la invención se utiliza para la fabricación de aditivos nutricionales para animales. Este modo de realización es particularmente ventajoso cuando la fitasa es segregada en el medio extracelular por un organismo hospedante. Habitualmente, este sobrenadante de cultivo está concentrado o liofilizado para la fabricación del aditivo nutricional.

Así, la invención se refiere asimismo a un procedimiento de preparación de fitasa que comprende las etapas siguientes:

a) cultivar un organismo hospedante transformado según la invención en unas condiciones de inducción de la expresión de la fitasa,

b) separar el sobrenadante de cultivo que comprende la fitasa.

Este sobrenadante de cultivo o mosto de fermentación puede ser concentrado o liofilizado a continuación para la formulación de un aditivo alimenticio o de un alimento para animales. El procedimiento puede comprender unas etapas suplementarias de purificación de la fitasa a partir del sobrenadante de cultivo.

Si el organismo hospedante no segrega la fitasa en el medio de cultivo, una etapa suplementaria de ruptura de las células y de purificación del extracto celular puede resultar necesaria.

Los aditivos nutricionales de la presente invención comprenden por lo menos una fitasa según la invención pero pueden comprender asimismo otras sustancias nutricionales tales como unas vitaminas, unos aminoácidos o unas sales minerales.

Los aditivos según la invención aumentan la digestibilidad de los alimentos, contribuyendo así a una mejor valorización nutricional de los regímenes a base de cereales (trigo, cebada, maíz, avena, centeno, etc.) y de tortas oleaginosas (soja, girasol, colza, etc.) en particular.

La presente invención se refiere asimismo a los alimentos para animales que comprenden una base nutricional y un aditivo nutricional según la invención. Estos alimentos se presentan habitualmente en forma de harinas o de gránulos en los que se incorporan los aditivos según la invención.

La presente invención tiene asimismo por objeto unos alimentos para animales que comprenden un polipéptido según la invención, un organismo hospedante según la invención o un mosto de fermentación/sobrenadante de cultivo de un organismo hospedante según la invención.

Se entiende por "alimento" todo lo que puede servir para la alimentación de los animales.

En un modo de realización de la invención, los aditivos nutricionales y los alimentos para animales según la invención comprenden una asociación de por lo menos dos fitasas que tienen unas actividades complementarias. Estos aditivos y estos alimentos comprenden así por lo menos una fitasa según la invención asociada a otra fitasa. La fitasa asociada a la fitasa según la invención se puede seleccionar por ejemplo de entre las fitasas de los organismos siguientes: *Schwanniomyces occidentalis*, *Aspergillus awamori* (fitasa A y fitasa B), *Aspergillus niger* (fitasa A y fitasa B),

Penicillium funiculosum, *Aspergillus oryzae*, *Peniophora lycii*, *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus nidulans*, *Talaromyces thermophilus*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus terreus*.

De manera ventajosa, la fitasa según la presente invención hidroliza todos los grupos fosfato del ácido fítico. Puede por lo tanto ser utilizada en particular para mejorar o completar la actividad de fitasas que no hidrolizan todas los grupos fosfatos. Preferentemente, la fitasa según la presente invención se asocia a la fitasa de *Aspergillus niger* (Ullah, A. H. J y Sethumadhavan, K., (2003) PhyA gene product of *Aspergillus ficuum* and *Peniophora lycii* produces dissimilar phytases. Biochemical and Biophysical Research Communications 303: 463-468) o a una fitasa de una cepa de *Penicillium funiculosum* (WO 03/054199, WO 99/57325).

Preferentemente, los aditivos y los alimentos comprenden una fitasa según la presente invención asociada a una fitasa de *Aspergillus niger* o a una fitasa de *Penicillium funiculosum*.

Para la cría intensiva de los animales, los alimentos para animales comprenden habitualmente una base nutricional y unos aditivos nutricionales.

Se entiende por "base nutricional", lo que constituye lo esencial de la ración alimenticia del animal, constituido a título de ejemplo por una mezcla de cereales, de proteínas y de materias grasas de origen animal y/o vegetal.

Las bases nutricionales para animales se adaptan a la alimentación de estos animales y son bien conocidas por el experto en la materia. Habitualmente, estas bases nutricionales comprenden por ejemplo maíz, trigo, guisantes y soja. Estas bases nutricionales están adaptadas a las necesidades de las diferentes especies animales a las que están destinadas. Estas bases nutricionales pueden contener ya unos aditivos nutricionales tales como unas vitaminas, unas sales minerales y unos aminoácidos.

En un modo de realización preferido, la invención se refiere a unos alimentos para animales monogástricos y en particular para las aves de corral y los cerdos. Las aves de corral comprenden en particular las gallinas ponedoras, los pollos, los pavos y los patos. Los cerdos comprenden en particular los cerdos en crecimiento y finalización así como los lechones.

Descripción de las figuras

Figura 1: Actividad de la fitasa de *D. Castellii* en función del pH (pH 3 a 3,5 Tampón glicina 200 mM, pH 3,5 a 7 tampón acetato de sodio 200 mM, pH 7 a 7,5 tampón tris HCl 200 mM). Los diferentes valores obtenidos a pH 3,5 con 2 tampones diferentes, muestra el efecto de la naturaleza del tampón sobre la actividad fitásica.

Figura 2: Actividad de la fitasa de *D. Castellii* en función de la temperatura. La actividad se mide a pH 4, a 37ºC durante 20 minutos.

Figura 3: Desnaturalización térmica de la fitasa de *D. Castellii*. El extracto se preincuba a diferentes temperaturas durante 1-10-20-40-60-120 minutos o bien en agua (líneas llenas), o bien en tampón acetato 125 mM, pH 4 (líneas de puntos). La actividad se mide después a 37ºC durante 20 minutos.

Figura 4: Estudio de la estabilidad al pH y a la temperatura. La actividad fitásica de *D. Castellii* se mide después del tratamiento del extracto a diferentes pH durante 1 hora a dos temperaturas (40ºC o 60ºC). La actividad se mide a pH 4.

Figura 5: Esquema de hidrólisis del ácido fítico por la fitasa de *D. Castellii*.

Figura 6: Evolución del rendimiento en fitasa recombinante (círculos) y en biomasa (cuadros) en función del índice de crecimiento durante unos cultivos en modo "fed-batch" (A) y continuo (B).

Figura 7: Seguimiento de la aparición de diversos inositoles fosfatos mediante cromatografía después de la hidrólisis química y de la hidrólisis enzimática del $InsP_6$ por la fitasa de *D. Castellii* después de 15, 75, 120 minutos de hidrólisis.

Figura 8: Ensamblaje y comparación de los espectros de las 4 fracciones de hidrólisis que contienen InsP1, InsP2, InsP3 e InsP4. Las atribuciones alternativas están en cursiva. Con el fin de completar esta comparación, bajo la escala de los desplazamientos químicos, se representa asimismo el espectro del InsP5 obtenido por diferencia al inicio de la cinética. Las señales positivas son las del InsP5 y las dos señales negativas corresponden al InsP6 de partida. Estos espectros, característicos de los diferentes inositoles fosfatos permiten seguir la aparición y la desaparición de los diferentes productos durante la cinética de hidrólisis.

Figura 9: Cinética lenta seguida a 500 MHz y a 17ºC con una disolución de 1,7 mM de InsP6, 10 mM de tampón acetato, pH 4,0 (500 μl de H2O/D2O, 16/84 v/v) y 1 μl de la disolución de enzima. El intervalo de tiempo entre dos espectros es de 23 minutos. Después de una noche, se añaden 20 μl de enzima para acelerar la reacción. Después de 16 horas, la hidrólisis se completa y se obtiene el espectro característico del inositol (espectro de arriba). Esta cinética muestra claramente la aparición sucesiva del InsP5, del InsP4 y del InsP3.

Figura 10: Cinética más rápida que permite un seguimiento de la hidrólisis completa del InsP6 (600 MHz, 17ºC, 500 μl D2O, 3,8 mM en InsP6 pH 4,0, 5 μl de enzima). Un espectro ha sido registrado cada 3 minutos durante 20 horas (400 espectros). Después de 10 horas, la hidrólisis está prácticamente completa. Los espectros trazados corresponden a un espectro de 10 (30 minutos entre dos espectros). Se observan algunas señales características.

Figura 11: Evolución de las concentraciones en 5 horas de los diferentes productos durante la hidrólisis. Este gráfico permite conocer en qué momento se obtiene la concentración óptima para cada producto. Observación: la altura de la señal RMN característica de cada uno de los compuestos ha sido utilizada para evaluar las variaciones de concentraciones. Las señales utilizadas no representan siempre el mismo número de protones y no tienen siempre la misma multiplicidad. De hecho, las concentraciones no se pueden comparar entre sí.

Ejemplos

Ejemplo 1

Producción, caracterización bioquímica y estereoespecificidad de la fitasa de Debaryomyces castellii

Materiales y métodos

1. *Organismo*

La cepa utilizada está clasificada en Centraal Bureau voor Schimmelculture (Delft) con el nombre de *Debaryomyces Castellii* CBS 2923.

2. *Medios y condiciones de cultivo*

Medio sintético para los cultivos en Batch (MSA-B): Glucosa (10 g/l); Fitato de sodio $C_6H_6O_{24}P_6Na_{12}$ (0,4 g/l)

Sales minerales: $(NH_4)_2SO_4$ (3 g/l), $MnSO_4$, H_2O (7,5 mg/l), KCl (0,5 g/l), $MgSO_4$, $7H_2O$ (0,5 g/l), $CaCl_2$, $2H_2O$ (0,1 g/l)

Oligoelementos: H_3BO_4 (500 μg/l), $CuSO_4$, $5H_2O$ (40 μg/l), Kl (100 μg/l), Na_2MoO_4, $2H_2O$ (200 μg/l), $ZnSO_4$, $7H_2O$ (400 μg/l), $FeCl_3$, $6H_2O$ (200 μg/l).

Vitaminas: Pantotenato Ca (2 mg/l), Tiamina (B1) (2 mg/l), Myo-inositol (2 mg/l), Piridoxina (B6) (2 mg/l), Ac. Nicotínico (PP) (0,5 mg/l), Biotina (0,02 mg/l).

Medio sintético para los cultivos en continuo (MSA-C): Composición del medio MSA-B, los diversos componentes están 10 veces más concentrados.

Cultivo en Erlenmeyer

El primer precultivo se lleva a cabo en presencia de YMPG (glucosa 10 g/l, yeast extract 3 g/l, bacto peptone 5 g/l, malt extract 3 g/l). Los cultivos se realizan en unos frascos de Erlenmeyer llenos a 1/10ª de su volumen en presencia de medio MSA-B tamponado a pH 5,4 con tampón tartrato 0,2 M. Éstos se llevan en medio ventilado a un agitador de vaivén (80 oscilaciones por minuto, amplitud 7 cm), a 28ºC.

Cultivo en fermentador

Los cultivos se realizan en un fermentador Applikon (Holanda) (1,5 l de volumen útil) o Beaun Biostat E (3 l de volumen útil). El pH se mide mediante una sonda Ingold. Se regula mediante adición de sosa 2M o de ácido sulfúrico 1M. La ventilación está asegurada por insuflación de 2 v.v.m (volumen de aire.(volumen de cultivo)$^{-1}$.(minuto)$^{-1}$) de aire esterilizado por filtración. La presión parcial en oxígeno disuelto se mide con la ayuda de una sonda polarográfica Ingold. Se mantiene a un valor superior a 30% mediante variación de la velocidad de agitación. La temperatura se mantiene a 28ºC. El control y la adquisición de los datos se efectúan en línea gracias a un programa de adquisición Bioexpert (Applikon).

Análisis de los gases a la salida del fermentador

La concentración en CO_2 en los gases efluentes se mide con la ayuda de un analizador con infrarrojos Beckman Industrial 870. La concentración en O_2 se mide con la ayuda de un analizador Beckman Industrial 775A cuyo detector utiliza la susceptibilidad paramagnética del oxígeno molecular.

Dosificación de los sustratos carbonados durante el cultivo

Los sustratos y los metabolitos presentes en el medio de cultivo (glucosa, acetato, etanol) se separan y se cuantifican mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (CLPH) con la ayuda de una columna FFJ (Waters) de exclusión de iones. La fase móvil es ácido fosfórico 3 mM, cuyo caudal es de 1 ml/minuto. Una muestra del medio de cultivo

se extrae en continuo cada dos horas y se filtra estérilmente de manera tangencial (filtro Millipore 0,22 μm GV) con la ayuda del módulo de filtración A-SEP Applikon y del módulo FAM de adquisición y de filtración Waters. Los sustratos carbonados son detectados mediante refractometría (Waters 410). El conjunto se controla mediante el sistema de control Waters 600 E. Los cromatógrafos son analizados gracias al programa Millenium (Waters).

Unas gamas patrones han sido realizadas para cada sustrato en una escala de 1 a 50 g/l.

3. *Purificación*

Ultrafiltración

El sobrenadante de cultivo obtenido después de la centrifugación se filtra sobre una membrana de umbral de corte de 0,22 μm (Millipore) antes de ser ultrafiltrado sobre un casete de ultrafiltración de flujo tangencial Filtron (superficie: 836 cm^2) cuyo umbral de exclusión es de 10 kDa. El concentrado se lava 3 veces (VN) con agua ultra pura y después se concentra por un factor 25. El extracto obtenido se utiliza para la purificación.

Cromatografía hidrófoba

La separación de las proteínas se realiza a 20ºC sobre una columna HiPrep 16/10 Phenyl FF (Amersham) de diámetro interno de 16 mm y de longitud de 100 mm (volumen de 20 ml).

Antes de la inyección sobre el gel de purificación, las muestras se equilibran en sulfato de amonio 2M. La mezcla se deja durante 2 a 16 horas a 4ºC y después se centrifuga (12.000 g, 20 minutos) con el fin de eliminar las proteínas precipitadas. El sobrenadante de la centrifugación constituye el extracto depositado sobre el gel.

El gel se equilibra en primer lugar con el equivalente de 5 volúmenes de columna con la ayuda de una disolución tampón Tris-HCl 50 mM, pH 6,1 y de sulfato de amonio 2M. Se inyectan 1 a 5 ml de muestra.

Las proteínas no fijadas se eliminan mediante un lavado equivalente a 5 volúmenes de columna con la disolución tampón sulfato de amonio de equilibrado.

La elución se realiza efectuando un gradiente de tres segmentos lineales: (1) sulfato de amonio de 2 a 1,7 M, en una duración equivalente a 1,5 volúmenes de columna, (2) sulfato de amonio 1,7 M, en una duración equivalente a 4 volúmenes de columna, (3) sulfato de amonio de 1,7 a 0 M, en una duración equivalente a 0,1 volúmenes de columna. La fitasa se eluye a 1,7 M de sulfato de amonio.

El caudal se fija a 5 ml/min. Unas fracciones de 4 ml se recogen a la salida de la columna, la absorbancia se mide a 280 nm.

Las fracciones activas se reúnen, se lavan con agua ultra pura y se concentran mediante ultrafiltración (membrana Millipore, umbral de corte 10 kDa).

4. *Electroforesis*

Las electroforesis en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes se realizan sobre unos geles prevertidos de 4 a 15% de acrilamida (Biorad). Las proteínas se detectan con azul de Coomassie.

La revelación específica de las fitasas se realiza incubando los geles en 100 ml de una disolución tampón acetato de sodio 250 mM pH 5,5 que contiene 200 mg de α naftil P (Sigma) y 100 mg de Fast Garnet GBC (Sigma) y 92 mg de fitato de sodio. Después de la hidrólisis del α naftil P, se forma un complejo α naftil/Fast Garnet GBC de color marrón.

5. *Digestión con endoglicosidasa H*

Desglicosilación: se añaden 1.000 unidades de endoglicosidasa H (Biolab Ozyme P0702S) a la muestra desnaturalizada que contiene aproximadamente 20 μg de proteínas. La mezcla se incuba durante 2 horas a 37ºC al baño maría.

6. *Determinación del peso molecular mediante espectrometría de masas*

El análisis se lleva a cabo sobre la fitasa purificada sobre SDS-PAGE con la ayuda de un espectrómetro MALDL-TOF Biflex III scout 384 (Bruker, Breme, Germany).

7. *Métodos analíticos*

7.1 *Determinación de la materia seca*

La concentración celular se obtiene mediante la medición de la densidad óptica (DO) con la ayuda de un espectrómetro Beckman DU530. Una unidad de DO corresponde a 0,570 g/l de biomasa.

7.2 *Dosificación de las proteínas*

El contenido en proteínas se determina mediante el método de Bradford (Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254). (Biorad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, BIORAD 500-0006), y la absorbancia se mide a 595 nm (espectrofotómetro UV/visible Beckman DU 530). El calibrado se efectúa con una gama de suero de albúmina bovina.

7.3 *Método enzimático*

La actividad fitásica se mide siguiendo la liberación de fosfato inorgánico a lo largo del tiempo.

La actividad se mide en presencia de 8 mM de fitato de sodio (Sigma) disuelto en un tampón acetato de sodio pH 5,5 o pH 4, 250 mM, 1 mM de $CaCl_2$, a 37ºC (5 volúmenes). La reacción se inicia mediante la adición del extracto enzimático (1 volumen). La reacción se detiene mediante acidificación del medio por el ácido tricloroacético 20% (1 volumen de medio de reacción + 1 volumen de ácido). La cantidad de fosfato liberado se determina después de diferentes tiempos de incubación.

Una unidad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que libera un μmol de fosfato inorgánico en un minuto.

Caracterización de la enzima

El efecto del pH sobre la actividad fitásica se determina utilizando las disoluciones tampón siguientes: Glicina-HCl 200 mM, pH 2-3,5; Acetato de sodio-ácido acético 200 mM, pH 3,5-7; y Tris-HCl 200 mM, pH 7-9. Las reacciones se llevan a cabo a +37ºC utilizando el fitato como sustrato. La temperatura óptima se determina haciendo variar la temperatura de +30 a +80ºC. Las reacciones se llevan a cabo a pH 4 (tampón acetato de sodio 200 mM) utilizando el fitato como sustrato. La estabilidad térmica se determina mediante la incubación de la muestra enzimática en un tampón acetato de sodio 125 mM, pH 4, durante diferentes duraciones a unas temperaturas comprendidas entre +37 y +70ºC. Después del tratamiento térmico, le mezcla se enfría en hielo y la actividad fitásica se determina utilizando el fitato como sustrato. Los parámetros cinéticos se determinan a +37ºC y a pH 4 para los experimentos con el fitato de sodio y a pH 5,5 para los experimentos con el p-NPP.

7.4 *Dosificación de los fosfatos*

La cantidad de fosfato liberado se mide mediante colorimetría. La disolución de revelación, preparada extemporáneamente, contiene sulfato de hierro (380 mM, 1 volumen) y heptamolibdato de amonio (12 mM, 4 volúmenes). La medición de la absorbancia, a 700 nm, se lleva a cabo después de 30 minutos de revelación a temperatura ambiente (1 volumen de medio de reacción + 1 volumen de disolución de revelación), con la ayuda de un espectrofotómetro UV/visible (Beckman DU 530).

Se establece previamente una recta de calibrado con potasio dihidrogenofosfato.

7.5 *Condiciones de hidrólisis de las fitasas para el estudio de la estereoespecificidad*

El tubo de reacción contiene 2 volúmenes de fitato de sodio (20 mM), 2 volúmenes de tampón acetato pH 4 (0,25 M) y 1 volumen de enzima diluida (0,6 U/ml al final).

Se realizan unas extracciones a diferentes tiempos durante 6 horas. La reacción se detiene mediante calentamiento a 100ºC (durante 10 minutos).

7.6 *Determinación de los inositoles fosfatos*

7.6.1 *Mediante HPIC*

Se trata de un método que utiliza la cromatografía iónica de alto rendimiento (HPIC) para separar y determinar los inositoles mono- a hexafosfatos obtenidos mediante la degradación del ácido fítico por las fitasas estudiadas (Hatzack, F., Hübel, F., Zhang, W., Hansen, P.E. y Rasmussen, S.K. (2001) Inositol phosphates from barley low-phytate grain mutants analysed by metal-dye detection HPLC and NMR. Biochem. J. 354, 473-480; Skoglund, E., Carlsson, N.G. y Sanberg, A.S. (1997) Determination of isomers of inositol mono- to hexaphosphates in selected foods and intestinal contents using High-Performance Ion Chromatography. J. Agric. Food Chem. 45, 431-436; Türk, M., Sandberg, A.S.,

Carlsson, N.G. y Andlid, T. (2000) Inositol hexaphosphate hydrolysis by baker's yeast. Capacity, kinetics, and degradation products. J. Agric. Food Chem. 48, 100-104). El método incluye la separación de los diferentes $InsP_n$ sobre columna intercambiadora de iones en HPLC con un gradiente de elución y la reacción post-columna durante la cual los inositoles fosfatos se complejan con hierro y se detectan mediante UV a 290 nm. Este sistema permite detectar del $InsP_2$ al $InsP_6$ pero sólo los diferentes isómeros del $InsP_4$ e $InsP_5$ pueden ser separados.

Preparación de una muestra de referencia

Los picos se identifican después de una hidrólisis química. Se disponen 50 mg de fitato de sodio en 5 ml de HCl (6 M) a 100ºC durante 16 horas. Unos alícuotas de 25 μl se secan con Speed Vac y después se recogen en 100 μl de HCl 0,025 M para obtener aproximadamente 300 nmoles por inyección.

Análisis de las muestras

La separación de los diferentes picos se realiza mediante cromatografía de intercambio de aniones fuertes sobre una columna analítica Omni Pac PAX-100 (4 x 250 mm) y una precolumna de guardia PAX-100 (4 x 50 mm) (Dionex Corp., Sunnyvale CA). El caudal es de 0,8 ml/min., el bucle de inyección es de 100 μl. Los $InsP_n$ se eluyen con un gradiente de 5-98% HCl (0,5 M) en conjugación con agua ultra pura y un disolvente orgánico (50% de 2-propanol). Los eluyentes se combinan según la Tabla 1 siguiente:

Tiempo (min.)	HCl (%)	2-propanol (%)	Agua (%)
T (0)	5	2	93
T (40)	98	2	0
T (45)	5	2	93

Se necesita un tiempo de 15 minutos para equilibrar la columna después de cada cromatografía.

Los inositoles fosfatos se detectan después de una reacción post-columna por la medición de la absorbancia a 290 nm con la ayuda de un espectrofotómetro UV (Biocad, Sprint). El eluyente se mezcla, en una reacción post-columna, con 0,1% de $Fe(NO_3)_3.9H_2O$ en una disolución al 2% de $HClO_4$. El caudal de la bomba del reactivo (Minipuls 3, Gilson) es de 0,4 ml/min. El paso por un serpentín de teflón (0,25 mm, 4 m) permite complejar los $InsP_n$ y el hierro para la detección (Phillippy, B.Q. y Bland, J.M. (1988) Gradient ion chromatography of inositol phosphates. Anal. Biochem. 175, 162-166).

7.6.2 *Mediante RMN*

Después de la liofilización, las diferentes muestras de inositoles aislados por HPIC (50-200 μg) son solubilizadas en 500 μl de D2O.

Los espectros de protones han sido registrados a 500 ó 600 MHz sobre unos espectrómetros Avance Bruker equipados con una criosonda (1H, 13C y 15N) y con gradientes sobre el eje z. Los espectros de protones desacoplados del fósforo y los espectros de correlación 1H-31P (HMQC) han sido registrados sobre un espectrómetro Avance Bruker 400 MHz con una sonda TBI. La señal residual del agua ha sido suprimida por una presaturación selectiva de una duración de 1 s. Todos los espectros han sido registrados a 17ºC. Los espectros de protones son calibrados con respecto al (trimetilsilil)-3-propionato de sodio-*d4* (TSP, 0 ppm) o a la señal residual del agua (4.914 ppm a 17ºC). Para la atribución de las resonancias de protón, los experimentos COSY y TOCSY han sido registrados con 512 incrementos de tiempo. El tiempo de contacto utilizado para el TOCSY es de 50 ms. Los experimentos HMQC han sido obtenidos con 64 incrementos de tiempo.

La atribución de los espectros de protones se realizará mediante el análisis de los experimentos COSY y TOCSY. Se debe apreciar que para algunos isómeros que poseen un plano de simetría, los protones H1 y H3 y los protones H4 y H6 no se pueden diferenciar. En este caso, se anotarán H1 (o H3) y H4 (o H6). Una vez obtenida la atribución, queda por determinar las posiciones fosforiladas. Éstas se determinarán con la ayuda de dos experimentos diferentes, por un lado con la ayuda del espectro de protón desacoplado del fósforo y, por otro lado mediante el experimento HMQC. La comparación del espectro de protón sin y con desacoplamiento del fósforo permite identificar las señales que poseen un acoplamiento $^3J_{HCOP}$ 8,5-10 Hz y así la(s) posición(es) de fosforilación.

El experimento ^1H-^{31}P HMQC, por medio de la constante de acoplamiento $^3J_{HCOP}$, permite a su vez identificar las correlaciones protón-fósforo. Cuando se conoce la atribución de las resonancias de protones, los espectros desacoplados del fósforo y HMQC permiten identificar las posiciones fosforiladas sin ninguna ambigüedad. La posición de los grupos fosfatos se verifica asimismo mediante el análisis de las constantes de acoplamiento del espectro de protón.

7.6.3 *Cinética de hidrólisis seguida por RMN*

La muestra utilizada para seguir la hidrólisis por RMN se prepara a partir de una disolución madre de InsP6/tampón fosfato, 96/700 mM en D2O. Típicamente, 20 μl de esta disolución son añadidos a 480 μl de D2O (dilución 25) para conducir a una muestra que contiene 3,8 mM de InsP6 y 28 mM de tampón acetato de sodio y TSP como referencia interna. En función de la velocidad de hidrólisis deseada, se añade una mayor o menor cantidad de enzima (1 a 20 μl de la disolución madre a 3 U/ml). La cinética se sigue a 17ºC por medio del registro de un espectro (32 escaneos) cada 3 minutos durante 20 horas (400 espectros). A partir de los espectros característicos de los diferentes inositoles fosfatos determinados anteriormente, su aparición y desaparición pueden ser seguidas en el conjunto de la cinética.

Resultados

1- *Estudio de la biosíntesis de la fitasa de Debaryomyces castellii*

La biosíntesis de la fitasa ha sido seguida en cultivo batch y continuo con el fin de determinar las condiciones óptimas de producción. Los cultivos se realizan sobre un medio sintético (véase Materiales y métodos). Un estudio previo ha permitido determinar una concentración óptima en fitato de 0,4 g/l para producir 5 g/l de biomasa. Esta concentración es necesaria y suficiente para asegurar el crecimiento celular máximo y no reprimir la biosíntesis de las fitasas. Se efectúan unas extracciones a lo largo del tiempo; se mide la biomasa y la actividad fitásica.

1.1 *Producción en cultivo batch*

Cinco cultivos Batch se realizan a pH 3, 4, 5, 6, y 7 en presencia de 10 g/l de glucosa y de medio MSA-B. La biomasa máxima se obtiene a pH 5, el índice de crecimiento disminuye 20% a pH 3 y a pH 7. La actividad fitásica máxima, medida en los sobrenadantes de cultivo, se obtiene a pH 4, y no se detecta ninguna actividad a pH 3. La actividad fitásica aumenta aproximadamente 20%, 12 horas después del inicio de la fase estacionaria. Es posible que ninguna parte de la fitasa sea parietal y liberada en el medio en fase de no crecimiento. Se ha verificado que se obtenía un mismo nivel de inducción en presencia o en ausencia de sal de calcio.

1.2 *Producción en cultivo continuo*

El cultivo continuo se realiza a pH 4, en presencia de 100 g/l de glucosa y de medio MSA-C. Las mediciones de biomasa y de actividades fitásicas se efectúan después de por lo menos 3 renovaciones del fermentador.

La producción de biomasa es constante hasta un índice de dilución de 0,20 h^{-1}, con un rendimiento $Y_{biomasa/sustrato}$ (g/g) de 50%, el metabolismo celular es oxidativo, y el coeficiente respiratorio (QR) es igual a 1. La producción de fitasa aumenta con el índice de dilución. Para un índice de dilución (D) de 0,25 h^{-1}, el rendimiento de crecimiento disminuye 40%, el QR es superior a 1, el metabolismo celular es oxido-fermentador, y se produce la formación de metabolitos secundarios tales como acetato y etanol. La producción de fitasa disminuye asimismo en un factor 5.

La mejor producción (1487 U/l) se obtiene con D=0,20 h^{-1}. Se debe observar que 20% de fitasa está unida a las células, y el mantenimiento del cultivo a 4ºC durante por lo menos 4 horas permite la liberación de la enzima en el medio de cultivo.

2- *Estudio de la fitasa*

2.1 *Purificación*

Las diferentes etapas de purificación de la fitasa de *D. Castellii* se resumen en la tabla 2.

TABLA 2

Purificación de la fitasa de Debaryomyces castellii mediante cromatografía hidrófoba

	Actividad total (U)	Proteínas totales (mg)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento %
Extracto bruto	144	12,4	11,6	1	
Extracto concentrado y ultrafiltrado	136,5	8,2	16,7	1,45	95
Cromatografía hidrófoba	84,4	0,54	156	13,6	59

El extracto bruto tiene una actividad específica de 11,4 U/ml. Después de una etapa de concentración y de ultrafiltración, el extracto se purifica mediante cromatografía hidrófoba. La fitasa se purifica en una sola etapa por un factor 13 con un rendimiento de 59%. La actividad específica es de 156 U/mg. La presencia de una sola banda proteica sobre una electroforesis SDS-PAGE muestra que la enzima es pura.

2.2 *Masa molecular y estructura*

2.2.1 *Determinación de la masa molar mediante electroforesis o cromatografía de gel de permeación*

Una electroforesis SDS-PAGE permite estimar la masa molecular de la fitasa a 77 kDa y de la enzima desglicosilada por tratamiento con endoglicosidasa H a 51 kDa, es decir, 34% de glicosilación. En condición no desnaturalizante, la masa molar de la fitasa es más difícil de determinar debido a la presencia de corrientes, y se sitúa entre 440 y 150 kDa. La de la enzima desglicosilada es de 87 kDa. Una coloración específica permite mostrar que la fitasa desglicosilada es activa.

La masa molar determinada mediante cromatografía de gel de permeación (columna HR 200 Pharmacia) es de 318 kDa para la fitasa glicosilada y de 218 kDa para la fitasa desglicosilada.

2.2.2 *Espectrometría de masa*

La determinación de la masa mediante espectrometría de masa confirma los resultados obtenidos por electroforesis SDS-PAGE, es decir 74 kDa para la fitasa y 53 kDa para la enzima desglicosilada, es decir, 28,4% de glicosilación.

La fitasa nativa estaría por lo tanto constituida por 4 monómeros de masa idéntica.

2.2.3 *Cristalografía*

Durante el año de prioridad, la estructura de la fitasa de *Debaryomyces Castellii* (461 residuos) ha sido determinada mediante cristalografía con una resolución de 2,3 Å.

Es un tetrámero que contiene 10 moléculas de N-acil glucosamina y 1.256 moléculas de agua.

La estructura es accesible en el sitio del RCSB Protein Data Bank con el código pdb siguiente: 2GFl.

3- *Propiedades enzimáticas*

3.1 *Efecto del pH*

El efecto del pH sobre la fitasa se determinó midiendo la actividad enzimática en presencia de diferentes tampones: para los pH comprendidos entre 2 y 3,5 (tampón glicina), para los pH de 3,5 a 7 (tampón acetato de sodio) y para los pH de 7 a 7,5 (tampón tris HCl) (figura 1). La fitasa es activa entre unos valores de pH de 2,5 a 6,5, con un valor óptimo entre pH 4 y 4,5. Se puede observar un efecto de la naturaleza del tampón sobre la actividad fitásica, a pH 3,5, siendo el tampón acetato de sodio inhibidor con respecto al tampón glicina.

3.2 *Efecto de la temperatura*

La temperatura óptima se determina sobre la fitasa nativa, efectuando una medición de la actividad fitásica a diferentes temperaturas: de 30 a 80ºC (figura 2).

La temperatura óptima de la fitasa está comprendida entre 55 y 60ºC. La energía de activación calculada según la representación de Arrhenuis es de 38 kJ/mol.

3.3 *Acción de los efectores*

Entre los diferentes cationes ensayados, sólo el Mn^{2+} provoca una fuerte inhibición de 72%. En presencia de los cationes Co^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} y Mg^{2+}, la actividad está inhibida de 58 a 22%. Se puede observar que la presencia de calcio no es necesaria para la actividad de esta enzima (tabla 3).

TABLA 3

Influencia de los efectores sobre la actividad fitásica de D. castellii

Efectores	Concentración (mM)	% de actividad
Fitato de control	9	100
$CaCl_2$	5	90
$MnCl_2$	5	28,8
$MgCl_2$	5	68,7
$CuCl_2$	5	66,6
$ZnCl_2$	5	57
$FeCl_3$	5	92
$CoCl_2$	5	42,3
$CrCl_2$	5	107,6
$HgCl_2$	5	96,2
PCMB	3	94,5
EDTA	3	104,5
Ácido yodoacético	3	100
2-mercaptoetanol	3	107
N-bromosuccinimida	0,1 y 1	1
N-bromosuccinimida + triptófano	1 + 3	100
yodo	3	25,6
yodo + triptófano	1 + 3	88,1

Entre los 6 inhibidores ensayados, sólo la N-bromosuccinimida que actúa sobre los grupos triptófano, tirosina e histidina inhibe totalmente la actividad fitásica. La adición de triptófano restablece la actividad. El yodo, específico de grupos tirosina, inhibe asimismo en gran medida (75%). El triptófano y la tirosina parecen estar altamente implicados en el sitio catalítico de la enzima.

Por el contrario, el ácido yodoacético que actúa sobre los grupos cisteína e histidina no provoca ninguna inhibición de la actividad.

La ausencia de efecto del 2-mercaptoetanol, del yodoacetato y del pCMB muestra que los grupos -SH no están probablemente implicados en el sitio catalítico.

3.4 *Estudio de la estabilidad*

Temperatura

Un estudio de la desnaturalización térmica a diversas temperaturas muestra que la enzima es estable durante una hora a 60ºC cuando está en agua y una hora a 66ºC cuando está en un tampón acetato 125 mM, pH 4 (figura 3). Está desnaturalizada por encima de 68ºC, con una pérdida de actividad de 70% después de una hora a 70ºC. La energía de activación de la desnaturalización calculada por la representación de Arrhenius es de 606 kJ/mol.

pH

La fitasa está totalmente desnaturalizada después de 21 días de conservación a -20ºC para los pH inferiores a 5. Por el contrario, no se observa ninguna desnaturalización después de 67 días de conservación a esta misma temperatura para los pH comprendidos entre 5 y 7.

pH y temperatura

La actividad fitásica se mide después de la incubación de la enzima a 2 temperaturas (40 y 60ºC) en unos tampones cuyo pH está comprendido entre 2 y 8 (figura 4). Para los dos pH extremos (2 y 8) se observa una pérdida total de actividad después de 1 hora de contacto. Por el contrario, en la gama de 3 a 7, de 80 a 100% de actividad se conserva a 40ºC. A 60ºC, la fitasa se desnaturaliza en mayor medida a los pH 3 y 8. Se puede apreciar que existe un fuerte efecto debido a la naturaleza del tampón a pH 8; en presencia de tampón acetato, la desnaturalización es total mientras que en presencia de un tampón tris HCL, la desnaturalización es de sólo 50%.

Entorno - Fuerza iónica

La enzima se pre-incuba en tampón acetato 250 mM, pH 4 que contiene cloruro de calcio 1 mM, a 20ºC y 66,5ºC, durante 60 minutos en presencia de diferentes aditivos. Al final del tratamiento, el extracto se enfría en agua a +4ºC. La actividad se mide después a 37ºC durante 20 minutos a pH 4, tampón 250 mM (tabla 4).

Se ensayan tres tipos de elementos:

- azúcares o azúcar alcohol: sacarosa, lactosa, trehalosa, arabinosa, glicerol.
- la ausencia de calcio,
- la molaridad del tampón.

La enzima se pre-incuba en un tampón acetato 250 mM, calcio 1 mM, pH 4, a 20ºC y 66,5ºC, durante 60 minutos en presencia de diferentes aditivos. Al final del tratamiento, el extracto se enfría en agua a +4ºC.

La actividad se mide a continuación a 37ºC durante 20 minutos a pH 4, tampón 250 mM, 1 mM de calcio (véase Materiales y Métodos).

TABLA 4

Influencia del entorno sobre la termo-estabilidad de la fitasa de Debaryomyces Castellii CBS2923

Elementos	Concentración	1h a 20°C	1h a 66,5°C
Control		99	47
$CaCl_2$	0 mM	100	1
Sacarosa	10%	97	57
Lactosa	10%	95	47
Trehalosa	10%	94	56
Arabinosa	10%	90	36
Glicerol	10%	96	56
Tampón acetato	200 mM	100	53
Tampón acetato	150 mM	98	78
Tampón acetato	125 mM	84	95
Tampón acetato	100 mM	87	89
Tampón acetato	50 mM	99	89

Dos elementos son muy importantes, el calcio y la fuerza iónica. El calcio, a pesar de que no tiene ninguna influencia sobre la actividad enzimática, desempeña una función protectora muy importante; la desnaturalización es total en ausencia de calcio. El aumento de la fuerza iónica del tampón aumenta la desnaturalización por la temperatura hasta 50% a 250 mM.

4- *Estudios cinéticos*

Estudio de la especificidad

Las constantes cinéticas se determinan sobre 2 sustratos. La afinidad de la fitasa es 4 veces más fuerte en presencia de fitato de calcio que de p-nitro-fenil-fosfato (pNPP) (tabla 5).

TABLA 5

Especificidad de la fitasa de D. Castellii sobre diferentes sustratos

Sustratos	Km (mM)	Vm (µmol/min./mg)
pNPP	2,27	30,9
Fitato de sodio	0,532	35,8

Esta fitasa posee un amplio espectro de actividad, con una hidrólisis preferencial del pNPP, del fosfoenol piruvato, del ATP y del ADP (tabla 6A). Se clasifica en las fitasas de espectro amplio tales como las fitasas de *A. fumigatus*, *E. nidulans*.

Degrada asimismo el Ins (2) P_1, (tabla 6B) que es raramente hidrolizado por las fitasas debido a su posición axial sobre la molécula de ácido fítico. Su funcionamiento es inhibido por los fosfatos con un Ki de 1, 3 mM.

TABLA 6

Comparación de la especificidad de la fitasa de D. Castellii en presencia de diferentes sustratos

(A) La concentración en sustratos es de 4 mM. Las cinéticas de liberación de fosfato se realizan en tampón acetato de sodio 250 mM, $CaCl_2$ 1 mM, pH 4, a 37ºC

Sustratos	Concentración (mM)	% de actividad
Ácido fítico (control)	9	100
P-Nitrofenilfosfato	4	135
Fructosa 6 fosfato	4	35
Glucosa 6 fosfato	4	82
Adenosina 5' monofosfato	4	50
Adenosina 5' difosfato	4	120
Adenosina 5' trifosfato	4	133
L-α-glicerofosfato	4	78
Ácido D (-) 3-fosfoglicérico	4	95
Fosfo(enol)piruvato	4	130

(B) Hidrólisis de diversos inositoles fosfatos por la fitasa de *D. Castellii*. Las cinéticas de liberación de fosfatos se realizan en tampón acetato de sodio 250 mM, $CaCl_2$ 1 mM, pH 4. Las mediciones se realizan después de 30 minutos de hidrólisis a 37ºC

Sustratos	Concentración (mM)	% de actividad
Ácido fítico (control)	9	91
Ins (1) P_1	1	58
Ins (2) P_1	1	84
Ins (1,4) P_2	0,1	65
Ins (1,4,5) P_3	0,1	56

5- *Estereoespecificidad*

5.1 *Separación e identificación de los inositoles fosfato mediante cromatografía (HPIC)*

Los isómeros de myo-inositol fosfato se separan sobre una columna analítica Omni Pac-100 utilizando un gradiente de 5% a 98% de HCl (0,5 M) y H_2O/2-propanol (v/v). Los eluyentes se mezclan en un reactor post-columna con una disolución de 0,1% $Fe(NO_3)_3$, $9H_2O$ y $HClO_4$ 2% (Phillippy, B.Q. y Bland, J.M. (1988) Gradient ion chromatography of inositol phosphates. Anal. Biochem. 175, 162-166). El caudal total es de 1,2 ml/min. Estas condiciones permiten separar los diferentes Ins Ps (Ins P_6 al Ins P_1) e identificar diferentes isómeros del Ins P_5 y del Ins P_4.

Los diferentes isómeros se identifican mediante la comparación de los cromatogramas obtenidos con (1) los descritos en la bibliografía, obtenidos en unas condiciones idénticas (Skoglund, E., Carlsson, N.G. y Sanberg, A.S. (1997) Determination of isomers of inositol mono- to hexaphosphates in selected foods and intestinal contents using High-Performance Ion Chromatography. J. Agric. Food Chem. 45, 431-436), (2) con los compuestos obtenidos mediante hidrólisis química (Türk, M., Sandberg, A.S., Carlsson, N.G. y Andlid, T. (2000) Inositol hexaphosphate hydrolysis by baker's yeast. Capacity, kinetics, and degradation products. J. Agric. Food Chem. 48, 100-104), y (3) con los productos de hidrólisis del ácido fítico por las fitasas de *A. niger* y *P lycii* (Lassen, S. F., Bech, L., Fuglsang, C.C., Ohmann, A., Breinholt, J. y Stergaard, P.R. (2000), patente US nº 6.060.298).

5.1.2 *Hidrólisis química*

Después de una hidrólisis química (HCl 6M, 100ºC, 16 horas), el cromatograma obtenido permite identificar 12 isómeros entre los Ins P_5 e Ins P_4. Los isómeros del Ins P_3, Ins P_2 e Ins P_1 no son separados mediante este método.

5.1.3 *Identificación de los inositoles fosfato formados durante la hidrólisis del ácido fítico mediante la fitasa de D. Castellii*

Las condiciones de hidrólisis se describen en Materiales y Métodos. La aparición de los diversos Ins P_n se sigue a lo largo del tiempo. Después de 15 minutos de hidrólisis, el Ins P_6 ha desaparecido prácticamente, se detectan 4 picos mayoritarios y corresponden al Ins (1, 2, 4, 5, 6) P_5, al Ins (1, 2, 5, 6) P_4, y unos picos del Ins P_3, Ins P_2 e Ins P_1 no identificados mediante este método (figura 7). La atribución de los Ins P_5 e Ins P_4 se confirma mediante la adición de muestras auténticas de inositoles. Después de 120 minutos de hidrólisis, los picos del Ins P_3 y del Ins P_1 son mayoritarios. Esto podría traducir una velocidad de hidrólisis claramente más baja del Ins P_3 con respecto a los Ins $P_{4,5}$ y $_6$. Después de 300 minutos de hidrólisis, la cantidad de fosfato dosificado corresponde a 100% de los fosfatos potenciales de la molécula de fitato. La enzima libera la totalidad de los fosfatos. La caracterización de las fracciones del Ins P_n separadas mediante cromatografía se lleva a cabo mediante análisis RMN.

5.2 *RMN* (figuras 8-11)

5.2.1 *Preparación de las muestras*

Los diferentes productos de hidrólisis del Ins P_6 por la fitasa de *D. Castellii* son separados mediante cromatografía de intercambio de iones según el método utilizado en el párrafo anterior. La cantidad inyectada corresponde a 369,5 μg del Ins P_6. El agente reactivo post-columna se sustituye por agua, y se realizan 12 cromatografías.

Las fracciones que corresponden a los Ins P_5, Ins P_4, Ins P_3, Ins P_2, Ins P_1, se recogen, se reúnen y se liofilizan. Los liofilizados se rehidratan con 0,5 ml de D_2O y se analizan mediante RMN a 17ºC.

5.2.2 *Análisis de los InsP*

Tal como se ha detallado en Materiales y Métodos, las diferentes fracciones de inositoles se caracterizan mediante el análisis de los espectros de protones (1D y 2D COSY y TOCSY) y de sus espectros de correlación 31P-1H (HMQC). Si es posible distinguir los estereoisómeros, que son unas imágenes no espejo, no se pueden distinguir los enantiómeros, que proporcionan unas imágenes espejo y unos espectros idénticos.

Así, la caracterización RMN de los productos de hidrólisis no permite distinguir una 3-fitasa de una 1-fitasa, y una 6-fitasa de una 4-fitasa. Convencionalmente, según la bibliografía, cuando los enlaces 3 ó 1 son hidrolizados en primer lugar, se da el nombre de 3-fitasa, al igual que para los enlaces 6 ó 4 se da el nombre de 6-fitasa.

5.2.2.1 *Análisis de la fracción HPLC que contiene los Ins P_1*

El espectro de protón indica la presencia de una mezcla de tres productos cuyos sistemas de espín han sido identificados con la ayuda de los experimentos TOCSY y COSY. Estos tres productos son: el Ins (2) P1 (36%), el Ins (1 ó 3) P1 (16%) y el inositol (48%). El espectro fósforo indica la presencia de fósforo inorgánico que se caracteriza por una señal fina. El HMQC confirma que dos de ellos son monofosforilados y que el 3º no lo es, es el inositol.

5.2.2.2 *Análisis de la fracción HPLC que contiene los Ins P_2*

El espectro de protón indica la presencia de un producto mayoritario (≈ 90%). Partiendo de la señal que corresponde al protón H2 (4,741 ppm), el COSY permite la atribución del espectro. El análisis de las constantes de acoplamiento indica que las posiciones 2 y 1 (o 2 y 3) están fosforiladas y que el producto mayoritario corresponde al Ins P (2, 1 ó 2, 3) P2. El espectro desacoplado del 31 P y el HMQC confirman esta atribución. Los productos minoritarios, por lo menos 2, no han sido identificados.

5.2.2.3 *Análisis de la fracción HPLC que contiene los Ins P_3*

El espectro de protón indica la presencia de un producto prácticamente puro. El análisis del espectro indica que corresponde al Ins (2, 1, 6 ó 2, 3, 4) P3. La fosforilación de estas tres posiciones consecutivas se confirma mediante el espectro desacoplado de 31 P y mediante HMQC.

5.2.2.4 *Análisis de la fracción HPLC que contiene los Ins P4*

El espectro de protón indica la presencia de un producto mayoritario (≈ 90%) que resulta ser el Ins (2, 1, 6, 5 ó 2, 3, 4, 5) P4. Las posiciones de los grupos fosfatos deducidas del análisis de las constantes de acoplamientos (3JHCOP = 8-10 Hz) se confirman por los experimentos de desacoplamiento 31 P y por el experimento HMQC. Los productos minoritarios no han sido identificados.

5.2.2.5 *Caracterización del Ins P5*

Teniendo en cuenta que InsP5 es el primer producto formado y que se encuentra tan pronto degradado en InsP4, no ha sido posible aislarlo suficientemente mediante HPLC para poder caracterizarlo mediante RMN.

Con el fin de evitar esta dificultad, el Ins P5 ha sido caracterizado *in situ* durante una cinética de hidrólisis realizada a 17ºC con una baja densidad de fitasa (véase a continuación). En estas condiciones, se han podido obtener los espectros de protones (espectro de diferencia 1D, TOCSY y COSY) del Ins P5. El conjunto de estos espectros permite caracterizar el Ins (1, 2, 4, 5, 6) P5 indicando que la posición 3 (o 1) es la primera posición en ser defosforilada. El espectro 31P del Ins P5 no ha sido registrado (figura 8).

5.2.3 *Cinética de hidrólisis del InsP6*

Unos estudios preliminares han permitido por un lado mostrar que la enzima era insensible a la presencia de deuterio y, por otro lado, ajustar la concentración de enzima para obtener una cinética ni demasiado rápida ni demasiado lenta con respecto a las limitaciones técnicas de observación.

En función de la temperatura (en este caso 17ºC) y de la concentración en enzima, una cinética puede ser lenta (1 μl de enzima) y la aparición de los primeros intermediarios fácilmente observada. En estas condiciones se han obtenido las características espectrales del InsP5 y se observa claramente la aparición sucesivamente del Ins P5, Ins P4 e Ins P3.

En presencia de 5 μl de enzima, se observa la formación de los Ins P2, Ins P1 y del inositol. En la fase intermedia, la complejidad de los espectros obtenidos demuestra la mezcla de los Ins Pn. Después de 10 horas, la hidrólisis no es total. En presencia de 20 μl de enzima, se ha obtenido una hidrólisis total en aproximadamente 4 horas. Estos resultados cinéticos confirman la hidrólisis de los 6 enlaces fosfato observada anteriormente. Muestran claramente que la hidrólisis de los 2 últimos enlaces es claramente más lenta que las demás. El efecto inhibidor del fosfato que se acumula en el medio sería en parte el responsable (figuras 9, 10, 11).

En este estudio, se han descrito las vías de hidrólisis del ácido fítico mediante la fitasa de *D. Castellii*. El análisis mediante cromatografía y mediante RMN homo y heteronuclear ha permitido determinar sin ninguna ambigüedad la estructura de los principales y de los diferentes Ins Ps formados: Ins P5, Ins P4, Ins P3, Ins P2, Ins P1. La secuencia de desfosforilación se presenta en la figura 5. Se puede resumir en la forma 3/4/5/6/1,2. A pesar de que los isómeros de la posición 1 y 3, y 4 y 6 no se puedan discernir mediante RMN, se ha podido determinar sin embargo gracias a los análisis en HPIC que los grupos fosfato en posición 3 y después en 4 son los dos primeros en ser hidrolizados. La cinética seguida por RMN confirma esta observación. Las hidrólisis siguientes se sitúan sobre el fosfato adyacente al grupo hidroxilo. La hidrólisis de los 2 últimos enlaces fosfato Ins (1, 2) P2 se realiza simultáneamente. Sin embargo, la velocidad de hidrólisis de la posición 2 parece dos veces más baja que la de la posición 1 (o 3). Por último, sea cual sea el método utilizado (enzimático, HPLC o RMN), la obtención cuantitativa de inositol al final de la hidrólisis muestra que los seis enlaces fosfato son hidrolizados por la fitasa de la levadura *D. Castellii*. Esta fitasa se puede clasificar como una 3-fitasa (EC 3.1.3.8) parecida a numerosas fitasas de microorganismos.

Ejemplo 2

Clonación, sobreexpresión y caracterización bioquímica de la fitasa recombinante

Materiales y métodos

Organismos, vectores y secuencias oligonucleotídicas

Las cepas, plásmidos y cebadores utilizados en este estudio se describen en la tabla 7.

TABLA 7

Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados para este estudio

Cepas, plásmidos o cebadores	Descripción o características	Referencia o fuente
Cepas		
D. castellii CBS 2923	Productor de fitasa	CBS, Delft (NL)
E. coli XL1-Blue MRF	Δ(*mcr*A)*183*Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173 *end*A1 *sup*E44 *thi*-1 *rec*A1 *lac* [F'*pro*AB *lac* IqZΔM15 Tn *10* (Tet')]	Stratagene
P. pastoris X33		Invitrogen
Plásmidos		
pGEM-T	Contiene el gen que confiere la resistencia a la ampicilina	Promega
pPICZαB	Promotor AOX1 inducible; secuencia señal del factor α de *S. cerevisiae*; gen *Sh ble* que confiere la Resistencia a la zeocina; integrativo	Invitrogen
pGAPZαB	Promotor GAP constitutivo; secuencia señal del factor α de *S. cerevisiae*; gen *Sh ble* que confiere la Resistencia a la zeocina; integrativo	Invitrogen

TABLA 7 (continuación)

Cepas, plásmidos o cebadores	Descripción o características	Referencia o fuente
Cebadores		
phyt-Nter-for	5'-TCIAA(A/G)TT(A/G)AT(T/C/A)AA(T/C)AA(T/C) GG-3' Péptido correspondiente: SKLINNG	
phyt-pepI -rev	5'-GG(ATT/C/G)AC(A/G)AA(A/G)TA(C/T)TC(A/G)TA (A/G)TC-3' Péptido correspondiente: PVFYEYD	
AP1	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	BD Biosciences
AP2	5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3'	BD Biosciences
5phyt-spe-1	5'-TATGGAGCAGCTCCTCCTAAGAATCTG-3'	
5phyt-spe-2	5'-ATGATGTTATATTGCTCGACGGACGCTTG-3'	
3phyt-spe-1	5'-TATGGAGCAGCTCCTCCTAAGAATCTG-3'	
3phyt-spe-2	5'-CTGGCTCCGGAAAGAAATATAAGGCTGTA-3'	
3bisphyt-spe-1	5'-GAAGTGTAGCTCTGGTCCTGGTTTCTCATG-3'	
3bisphyt-spe-2	5'-ATGTTGCTGAAAGAGTTGCAGGTACCAACT-3'	
phytDc-PstI-for	5'-GCACTGCAGTCTCAGTCTCAAAGTTAATTAAC-3'	
phytDc-XbaI-rev	5'-AGTTCTAGATTAACTGTTGATAAGGGAAGCGGT-3'	

La levadura *Debaryomyces Castellii* CBS 2923 se cultiva en Erlenmeyer llenos a 1/10ª de su volumen en condiciones aerobias y a 28ºC. Durante la extracción del ADN genómico, la cepa se cultiva en presencia de 500 ml de medio YPD o de 20 ml de medio MSA.

La cepa *E. coli* XL1-Blue MRF', utilizada durante la amplificación del ADN, se cultiva en Erlenmeyer llenos a 1/10ª de su volumen en condiciones aerobias y a 37ºC, en presencia de medio Luria-Bertani (Sambrook; J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA) adicionado con ampicilina (100 mg/l) o con medio Luria-Bertani "low salt" (NaCl 5 g/l) cuyo pH se ajusta a 7,5 con sosa y adicionado con zeocina (25 mg/l). Durante el cultivo en medio sólido, los medios anteriores son adicionados con 15 g/l de Bacto agar.

La cepa de levadura *Pichia Pastoris* X33 se utiliza para la expresión heteróloga del gen que codifica la fitasa. Los transformantes son seleccionados, en condiciones aerobias, a 28ºC, sobre medio gelosado YPDS, adicionado con zeocina (100 mg/l).

El vector pGEM-T (Promega) se utiliza para la clonación en *E. coli* de fragmentos amplificados mediante la reacción de polimerización en cadena (RPC) y para la secuenciación del ADN. El marcador de selección de este plásmido es el gen de resistencia a la ampicilina. Se utilizan dos vectores de expresión, pPICZaB y pGAPZaB (tabla 7). El vector pPICZaB contiene el promotor del gen del alcohol (metanol) oxidasa (AOX1) que permite obtener fuertes índices de expresión del gen de interés en *P. Pastoris* y la expresión de la proteína recombinante es inducible por el metanol (Cereghino, J. L. y Cregg, J. M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Fems Microbiology Reviews 24, 45-66). El vector pGAPZαB contiene el promotor del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP) que permite una expresión constitutiva y de fuerte índice de la proteína recombinante en *P. Pastoris* (Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V. y Cregg, J. M. (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. Gene 186, 37-44). Estos dos vectores poseen asimismo las secuencias necesarias para la replicación en las bacterias. La selección de los clones transformados por estos vectores se basa en un marcador de selección, la zeocina, y esta selección es aplicable al mismo tiempo en *P. Pastoris* y en *E. coli*. Además, las proteínas recombinantes son expresadas en función con la secuencia señal del factor α de *S. cerevisiae*.

Medios

Se cultiva *D. Castellii* CBS 2923 en presencia de medio YPD (extracto de levaduras 10 g/l, peptona 20 g/l, glucosa 20 g/l) o de medio MSA-B (véase en el ejemplo 1 Materiales y métodos) tamponado a pH 5,4 mediante un tampón ftalato 100 mM. Después de la transformación, los transformantes *P. Pastoris* X33 se seleccionan sobre medio YPDS sólido (extracto de levaduras 10 g/l, peptona 20 g/l, glucosa 20 g/l, sorbitol 1 M, Bacto agar 20 g/l). Durante la selección de los clones productores en medio gelosado, los transformantes *P. pastoris* son cultivados sobre un medio sólido sintético que contiene glucosa o metanol al 0,5%, Bacto agar 20 g/l, sales FM21 100 ml/l (FM21 10X: $CaSO_4 2H_2O$ 1,5 g/l, K_2SO_4 23,8 g/l, $MgSO_4 7H_2O$ 19,5 g/l, KOH 6,5 g/l, H_3PO_4 85% 3,5% v/v), oligoelementos PTM1 10 ml/l (PTM1 100X: $ZnCl_2$ 2 g/l, $Fe(SO_4)7H_2O$ 6,5 g/l, $CuSO_4 5H_2O$ 0,6 g/l, $MnSO_4 H_2O$ 0,3 g/l, KI 10 mg/l, H_3BO_4 2 mg/l, Na_2MoO_4 20 mg/l, H_2SO_4 96% 0,2%), $(NH_4)_2SO_4$ 4 g/l, H2PO_4NH4 12 g/l y D-biotina 80 μg/l, tamponado a pH 5,4 mediante un tampón tartrato-fosfato 200 mM. Durante la selección de los clones productores en medio líquido, los transformantes *P. pastoris* son cultivados en presencia de un medio sintético que contiene una fuente de carbono

(glucosa 10 g/l, glicerol 20 g/l o metanol 3,9 g/l), sales FM21 100 ml/l, oligoelementos PTM1 10 ml/l, $(NH_4)_2SO_4$ 4 g/l, $H_2PO_4NH_4$ 12 g/l y D-biotina 80 μg/l, tamponado a pH 5,4 mediante tampón tartrato-fosfato 200 mM. Durante los cultivos en biorreactor, los precultivos se realizan en presencia de medio YMPG (extracto de levaduras 3 g/l, extracto de malta 3 g/l, peptona 5 g/l, glucosa 10 g/l) y después en presencia de medio sintético: glicerol 40 g/l, sales FM21 100 ml/l, oligoelementos PTM1 10 ml/l, $(NH_4)_2SO_4$ 4 g/l, $H_2PO_4NH_4$ 12 g/l y D-biotina 80 μg/l, tamponado a pH 5,4 mediante tampón tartrato-fosfato 200 mM (Klein *et al*., 1998). Los cultivos en modo batch se llevan a cabo en presencia de medio sintético que contiene glicerol 40 g/l o glucosa 20 g/l, sales FM21 100 ml/l, oligoelementos PTM1 10 ml/l y D-biotina 80 μg/l. Cuando se realiza un segundo cultivo en batch, se añade una disolución de glicerol en el fermentador de manera que se obtiene una concentración final de glicerol de 40 g/l. Esta adición se realiza después del consumo total del glicerol inicialmente presente, siendo esto visualizable mediante un aumento brusco del índice de oxígeno disuelto. Los cultivos en modo fed-batch son alimentados por un medio sintético que contiene glicerol a 400 g/l, glucosa a 400 g/l o metanol a 780 g/l, oligoelementos PTM1 50 ml/l y D-biotina a 1 mg/l. El cultivo en modo continuo está alimentado por un medio sintético: metanol 66,67 g/l, sales FM21 50 ml/l, oligoelementos PTM1 25 ml/l y D-biotina 500 μg/l.

Extracción de ADN genómico

Extracción rápida de ADN genómico (ADNg)

Las células procedentes de un cultivo de *D. castellii* CBS 2923 en presencia de medio MSA son recogidas después de 9 h de cultivo, centrifugadas (3.500 x g, 20 min., +4ºC) y lavadas en 10 ml de agua esterilizada. Las células se resuspenden a continuación en 200 μl de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, triton X-100 2% v/v, SDS 1% p/v), 200 μl de bolas de vidrio (diámetro 0,45-0,5 mm) y 200 μl de mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1; v/v/v). La lisis de las células se lleva a cabo por agitación vigorosa durante 3 minutos y después se añaden 200 μl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). La disolución se centrifuga (8.000 x g, 5 minutos, +4ºC). Las proteínas se extraen de la fase acuosa con un volumen de mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24/1; v/v), y se centrifugan (8.000 x g, 2 minutos, +4ºC). El ADN genómico se precipita con 1 ml de etanol absoluto (-20ºC), se centrifuga (12.000 x g, 5 minutos, +4ºC) y se vuelve a poner en disolución en 370 μl de tampón TE. El ARN se elimina mediante incubación durante 15 minutos a +37ºC en presencia de 75 μg/ml de ARNasa A. Después, el ADN se precipita con etanol absoluto (-20ºC), se resuspende en 50 μl de tampón TE y se conserva a -20ºC.

Preparación de ADN líquido de alto peso molecular de levadura

Las células procedentes de un cultivo de *D. castellii* CBS 2923 en presencia de 500 ml de medio YPD se recogen durante la fase exponencial, se centrifugan (6.000 x g, 15 minutos, +4ºC) y se lavan en 40 ml de agua estéril. El residuo de vuelve a poner en disolución en 3,5 ml de disolución SCE (sorbitol 1 M, citrato de sodio 0,1 M, EDTA 60 mM) que contiene 40 μl de ditiotreitol 2 M y 5 mg (5.000 unidades) de zimolasa 100-T (ICN Biomedical, 32093) y se incuba durante 1 hora a +37ºC. Se añaden a continuación 7 ml de la disolución de lisis (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,5, sarcosil sodio 3,2% p/v, EDTA 0,2 M, proteinasa K 100 μg/ml (Roche Diagnostics, Meylan, Francia) y la suspensión se incuba durante 15 minutos a +65ºC, y después se enfría rápidamente hasta temperatura ambiente.

Se prepara un gradiente de sacarosa vertiendo sucesivamente en un tubo de ultracentrifugación 11 ml de sacarosa al 20% p/v, 11 ml de sacarosa al 15% p/v y después 3 ml de sacarosa al 50% p/v. La suspensión celular lisada se deposita delicadamente sobre el gradiente y después se ultracentrifuga durante 3 horas a 26.000 rpm a +20ºC (ultracentrifugadora Centrikon T-1075, Kontron Instrument). El ADN, que forma un velo en el gradiente, se recupera con una pipeta, se precipita con etanol y se resuspende en 100 μl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). El ARN se elimina mediante incubación durante 3 horas a +37ºC en presencia de 50 μg/l de ARNasa A. El ADNg se precipita nuevamente con etanol y después se resuspende en 200 μl de tampón TE y se conserva a -20ºC.

Clonación del gen de la fitasa

Amplificación de un primer fragmento del gen

Una reacción de polimerización en cadena (RPC) se realiza utilizando como matriz el ADNg de *D. castellii* CBS 2923, obtenido mediante el método de extracción rápida de ADN genómico. El par de cebadores phyt-Nter-for/phyt-pep1-rev se dibuja a partir de secuencias de la proteína limitando al máximo el índice de degenerescencia (tabla 7). El ADN se amplifica gracias a la polimerasa Taq (Promega) con la ayuda del termociclador Minicycler (MJ Research). Después de una primera desnaturalización del ADNg durante 3 minutos a +94ºC, la amplificación se lleva a cabo en 30 ciclos según el programa de temperatura siguiente: 1 minuto de desnaturalización a +94ºC, 1 minuto de hibridación a +45ºC y después 1 minuto de polimerización a +72ºC. Estos ciclos son seguidos de un intervalo de 10 minutos a +72ºC.

Clonación de la secuencia completa del gen de la fitasa

La secuencia completa del gen se obtiene utilizando la técnica de "paseo genómico" (Universal Genome Walker Kit, BD Biosciences) según las instrucciones del proveedor. El ADNg de *D. castellii* CBS 2923 (2,5 μg), extraído mediante el método "preparación de ADN líquido de alto peso molecular de levadura", es digerido durante 16 horas a +37ºC por cuatro enzimas de restricción separadamente (50 unidades de *Dra*I, *Eco*RV, *Pvu*II o *Stu*I). Cada fragmento

presenta así unos extremos libres. Los fragmentos son purificados mediante extracción con fenol/cloroformo y se precipitan con etanol. Los fragmentos se unen después a los adaptadores suministrados con el kit de "paseo genómico" durante 16 horas a +16ºC. La ligación se detiene mediante calentamiento a +70ºC durante 5 minutos y después adición de 9 volúmenes de tampón TE. Cuatro bancos son así construidos y denominados "banco *Dra*I, *Eco*RV, *Pvu*II o *Stu*I". Un primer ciclo de paseo genómico se realiza utilizando cada banco como matriz y un par de cebadores que comprenden el cebador AP1 específico del adaptador y los cebadores 5phyt-spe-1/3phyt-spe-1 específicos del gen (tabla 7). La eficacia de este primer ciclo de RPC se verifica sobre gel de electroforesis de agarosa LE 1,5%. La mezcla, procedente de la primera RPC, se diluye 50 veces y sirve de matriz para el segundo ciclo de RPC. Este segundo ciclo se realiza utilizando el cebador AP2 específico del segundo adaptador y los cebadores 5phyt-spe-2/3phyt-spe-2 específicos del gen (tabla 7). Los fragmentos así amplificados son separados sobre gel de electroforesis de agarosa 1,2% de bajo punto de fusión, purificados con la ayuda de un kit "GeneClean" y clonados en el vector pGEM-T con el fin de ser secuenciados. Un segundo ciclo de paseo genómico ha sido necesario para obtener la secuencia completa del gen. Para cada banco, dos ciclos de amplificación por RPC son realizados como anteriormente utilizando los cebadores AP1/3bisphyt-spe-1 para el primer ciclo y AP2/3bisphyt-spe-2 para el segundo ciclo (tabla 7).

Construcción de los plásmidos de expresión

De manera que se clone el gen *phytDc* en *P. pastoris* con la ayuda de los vectores de expresión pPICZαB y pGAPZαB, la secuencia completa del gen se amplifica mediante RPC. Esta RPC se realiza utilizando como matriz el ADNg de *D. castellii* CBS 2923, extraído mediante el método de extracción rápida de ADN genómico, con la ayuda de la polimerasa *Pfu* Turbo (Stratagene). Durante esta amplificación, el par de cebadores utilizado, phytDc-PstI-for y phytDc-XbaI-rev (tabla 7), ha permitido la creación de sitios de restricción *Pst*I y *Xba*I respectivamente en 5' y en 3' del gen. Después de una primera desnaturalización del ADNg durante 2 minutos a +95ºC, la amplificación se efectúa en 25 ciclos según el programa de temperatura siguiente: 30 s de desnaturalización a +95ºC, 30 s de hibridación a +55ºC y después 1,5 minutos de polimerización a +72ºC. Estos ciclos son seguidos de un intervalo de 10 minutos a +72ºC. La ausencia de mutación se verifica mediante secuenciación.

Transformación

Las células de *E. coli* XL1-blue MRF' son transformadas mediante choque térmico tal como se ha descrito por Sambrook *et al*. (Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA). Las células de *P. pastoris* X33 son transformadas mediante electroporación (Manual de instrucción Invitrogen pPICZaA, B y C, versión E o manual de instrucción Invitrogen pGAPZaA, B y C, versión F, Invitrogen Ltd, UK). Las transformaciones se llevan a cabo con la ayuda de un aparato Gene Pulseur (Biorad) ajustado a un voltaje de 1,5 kV y una capacitancia de 25 μF y un Pulse Controller (Biorad) ajustado a 200 ohms.

Síntesis y análisis de las secuencias

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores de RPC han sido sintetizados por la compañía MWG-Biotech (Alemania). La microsecuenciación de la secuencia N-terminal y de péptidos internos de la fitasa ha sido efectuada con la ayuda de un microsecuenciador de proteínas (Beckman/porton LF 3000) utilizando los agentes reactivos y los métodos recomendados por el fabricante. El microsecuenciador estaba conectado directamente a un sistema cromatográfico de tipo RP-HPLC (Beckman 125S) con un detector UV a 268 nm (Beckman 166). Los datos se tratan con el programa Gold V8.20. La búsqueda de alineaciones locales entre unas secuencias nucleotídicas o proteicas y unos bancos de datos generalistas se efectúa con los programas BLAST2 (Basic Local Alignment Search Tool) y FASTA. La comparación entre dos secuencias se lleva a cabo con los programas LALIGN y LFASTA, nucleico o proteico, del package FASTA. Estos programas están disponibles en el servidor de Infobiogen (http://www.infobiogen.fr). La predicción de péptido señal y el cálculo de los pHi teóricos a partir de secuencias proteicas se efectúan con el programa Antheprot 2000 V5.2 release 1.1.6. Los sitios de glicosilación se predicen con la ayuda de los servidores NetNGlyc 1.0, DictyOGlyc 1.1 et NetOGlyc 2.0, Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark.

Selección de los clones productores en medio líquido

Los transformantes *P. pastoris* pGAPphyt son cultivados a +28ºC en presencia de 5 ml de medio sintético que contiene 10 g/l de glucosa. Después de 48 h, los cultivos se centrifugan durante 5 minutos a 1.676 x *g*. Los sobrenadantes se conservan a +4ºC. Los transformantes *P. pastoris* pPICphyt son cultivados a +28ºC en presencia de 5 ml del mismo medio que contiene 20 g/l de glicerol en lugar de glucosa. Después de 48 h, los cultivos se centrifugan durante 5 minutos a 1.676 x *g*. La producción de recPhyt se induce añadiendo 2,5 ml del mismo medio que contiene 3,9 g/l de metanol en lugar de glucosa en los tubos que contienen las células. Después de 24 horas de inducción, los cultivos se centrifugan durante 5 minutos a 1.676 x *g*. Se añaden 2,5 ml del mismo medio que contiene 3,9 g/l de metanol en lugar de glucosa en los tubos que contienen las células. Después de 24 horas de incubación, los cultivos son centrifugados durante 5 minutos a 1.676 x *g*. Los sobrenadantes se conservan a +4ºC. Estos cultivos se llevan a cabo en unos tubos estériles de 13 ml.

Producción de fitasa recombinante

Precultivo en Erlenmeyer

Los precultivos se llevan a cabo en presencia de medio YMPG en Erlenmeyer llenos a 1/10ª de su volumen. Éstos se incuban a +28ºC bajo agitación (80 oscilaciones por minutito, amplitud 7 cm) durante 24 horas. Los precultivos se realizan a continuación en presencia de medio sintético durante 24 horas.

Cultivos en biorreactor

Los cultivos en modo batch, fed-batch y continuo se llevan a cabo en unos fermentadores Applikon de 1 ó 3 l (Holanda). El pH se ajusta a 4 mediante unas adiciones automáticas de NH_3 16% (v/v) o de H_2SO_4 2 N, y la temperatura se mantiene a +28ºC. Con el fin de evitar la formación de espuma, se añade anti-espuma Biospumex 153K (Cognis Dusseldorf, Alemania) durante el cultivo: anti-espuma al 5% (v/v) para los cultivos en modo fed-batch o al 1% (v/v) para los cultivos en modo continuo. La presión parcial en oxígeno disuelto se mide con la ayuda de una sonda Applisens (Holanda) y se mantiene a un valor superior a 30% mediante la regulación de la agitación y de la ventilación. La adquisición de los datos y el control de los cultivos se efectúan gracias al programa BioExpert de Applikon.

Condiciones de cultivo

Véase el ejemplo 1, cultivo en fermentador.

Determinación de la concentración en biomasa

Las concentraciones celulares se miden mediante densidad óptica (DO) con la ayuda de un espectrofotómetro (DU530, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA) a 600 nm.

Una unidad de DO corresponde a 0,462 g de materia seca/l (g MS/l) sobre glicerol, 0,442 g MS/l sobre metanol y 0,491 g MS/l sobre glucosa.

Purificación de la fitasa recombinante

Véase el ejemplo 1, Materiales y Métodos 3.

Electroforesis SDS-PAGE

Véase el ejemplo 1, Materiales y Métodos 4.

Determinación de la concentración en proteínas

Véase el ejemplo 1, Materiales y Métodos 7.2.

Técnicas enzimáticas

Detección de la actividad fitásica en medio gelosado

La actividad fitásica se detecta utilizando el método de Kim *et al*. (Kim, Y. O., Kim, H. K., Bae, K. S., Yu, J. H. y Oh, T. K. (1998) Purification and properties of a thermostable phytase from Bacillus sp. DS11. Enzyme Microb. Technol. 22, 2-7) modificado para la revelación específica de las fosfatasas en gel de poliacrilamida. Los transformantes *P. Pastoris* se cultivan en condiciones aerobias a +30ºC sobre un medio sintético sólido que contiene 0,5% de glucosa o de metanol según el vector utilizado. Estos cultivos se incuban durante 3 días. En el caso de los clones *P. Pastoris* transformados con el vector pPICZaB modificado, se añaden 50 μl de metanol diariamente en la tapa de las cajas de Petri a partir del tercer día. La disolución de revelación (Bacto agar 10 g/l, α-naftilfosfato 2 g/l, FastGarnetGBC 1 g/l, fitato de sodio 0,92 g/l, tamponado a pH 5,5 mediante tampón acetato de sodio 0,25 M) se prepara justo antes de su utilización, se enfría a 45ºC y se vierte en capa fina sobre las colonias. La coloración (marrón, rojo oscuro) de los clones productores de fitasa aparece inmediatamente.

Determinación de la actividad fitásica mediante hidrólisis del fitato

Véase el ejemplo 1, Materiales y Métodos 7.3.

Determinación de la actividad fitásica mediante hidrólisis del p-nitrofenilfosfato (p-NPP)

La determinación de la actividad se efectúa mediante la realización de cinéticas enzimáticas. El medio de reacción (2 volúmenes en total), tamponado a pH 5,5 (acetato de sodio 125 mM) contiene 6 mM de p-nitrofenilfosfato y el extracto enzimático diluido o no (1 volumen). Después de diferentes duraciones de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detiene mediante la adición de hidróxido de sodio 0,3 N (1 volumen) para basificar el medio y revelar la

coloración. La absorbancia se mide a 450 nm con la ayuda de un espectrofotómetro lector de microplaca Sanofi Pasteur PR 2100. La unidad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que libera un micromol de p-nitrofenol por minuto a partir de la disolución de p-nitrofenilfosfato en unas condiciones definidas: temperatura ambiente, pH 5,5. Una recta de calibrado ha sido previamente establecida con p-nitrofenilfosfato (0,012-0,12 μmol).

Estudios cinéticos

Véase el ejemplo 1, 7.5 y 7.6.

Resultados

Caracterización del gen de la fitasa

Clonación del gen de la fitasa de D. Castellii CBS 2923

Un péptido interno y el péptido N-terminal de la fitasa pura de *D. Castellii* han sido secuenciados. A partir de estas secuencias peptídicas, se dibujan unos cebadores de RPC, limitando al máximo el índice de degenerescencia (tabla 7). Se realiza una RPC utilizando como matriz el ADNg de *D. Castellii* CBS 2923. Un fragmento de aproximadamente 300 pares de bases (pb) ha podido así ser amplificado. De manera que se clone la secuencia completa del gen de la fitasa de *D. Castellii* CBS 2923, se ha elegido utilizar la técnica de "paseo genómico". A partir de la secuencia del fragmento de 300 pb obtenido anteriormente, se sintetizan unos cebadores que corresponden a los extremos del fragmento y que permiten amplificar las secuencias adyacentes de este fragmento (tabla 7). Una RPC se realiza utilizando los bancos de ADNg de *D. Castellii* CBS 2923 como matrices. El primer ciclo ha permitido amplificar un fragmento de aproximadamente 1.600 pb corriente arriba y de aproximadamente 1.100 pb corriente abajo de la secuencia de 300 pb a partir de los bancos *Eco*RV y *Pvu*II respectivamente. Así, se ha podido reconstituir un fragmento de aproximadamente 3.000 pb que comprende una fase abierta de lectura (ORF) de 1.325 pb truncada en 3'. Se ha realizado un segundo ciclo de RPC utilizando nuevos cebadores dibujados a partir del extremo 3' del fragmento obtenido durante la primera RPC. Esta RPC ha permitido amplificar un fragmento de aproximadamente 100 pb a partir del banco *Eco*RV. Se ha podido así reconstituir la fase abierta de lectura de 1.386 pb. La secuencia proteica deducida de esta ORF contiene los dos péptidos secuenciados anteriormente, lo cual permite confirmar que este gen corresponde al gen que codifica la fitasa de *D. Castellii* CBS 2923 (véase la SEC ID nº 1). Con el fin de verificar la secuencia, se han sintetizado unos cebadores que corresponden a los extremos del gen (tabla 7). El gen completo ha sido amplificado mediante RPC y la secuenciación ha confirmado los resultados obtenidos anteriormente.

Análisis de las secuencias nucleotídica y proteica

Gracias a los experimentos de "paseo genómico", un fragmento de 2.990 pb ha podido ser reconstituido. Este fragmento contiene una fase abierta de lectura de 1.386 pb denominada "secuencia *phytDc*". La secuencia proteica de 461 aminoácidos correspondiente contiene varios motivos (SEC ID nº 2). Un motivo RHGERYP corresponde a la secuencia de consenso RHGXRXP presente en el sitio activo de numerosas fosfatasas ácidas de alto peso molecular. La secuencia presenta asimismo el motivo HD en la parte C-terminal, motivo presente en numerosas secuencias de fitasas. La secuencia N-terminal empieza a partir del segundo aminoácido de la proteína deducida, lo cual parece indicar que esta proteína, a pesar de ser excretada, no presenta ningún péptido señal. Esta observación está apoyada por la obtención de un resultado negativo durante la búsqueda de un sitio potencial de escisión de péptido señal con la ayuda del programa Antheprot. La proteína deducida tiene una masa molecular estimada de 51,2 kDa, parecida a la masa obtenida experimentalmente (53/55 kDa) por espectrometría de masa a partir de la proteína expresada en *D. Castellii* CBS 2923, purificada y desglicosilada mediante la endoglicosidasa H. La diferencia de masa se puede explicar por la presencia de residuos de N-acetil glucosamina o de motivos de O-glicosilación que no están eliminados por la endoglicosidasa H. El análisis de la secuencia proteica muestra la presencia de 9 sitios potenciales de N-glicosilación y 4 sitios potenciales de O-glicosilación. El pHi de esta proteína se estima en 4,3. La búsqueda de homologías con unos bancos de datos muestra que la fitasa de *D. Castellii* CBS 2923 presenta de 21 a 36% de homologías con diversas fitasas de origen de levadura o fúngico. Los tamaños de las secuencias de estas fitasas son muy parecidos (440-480 aminoácidos) pero la fitasa de *D. Castellii* CBS 2923 no se alinea perfectamente sobre toda la longitud de su secuencia. La secuencia *phytDc* comparte, sobre toda su longitud, 69,2% de homología con la secuencia de la fitasa de *S. Occidentalis*. Como la secuencia del gen que codifica la fitasa de *S. Occidentalis* se ha obtenido a partir del ADN complementario, esta alineación permite pensar que el gen que codifica la fitasa de *D. Castellii* no posee ningún intrón. Por otro lado, esta secuencia posee unas homologías con unas fosfatasas.

Selección de los clones de P. Pastoris hiperproductores de fitasa recombinante

El gen *phytDc* ha sido amplificado mediante RPC e insertado en los vectores de expresión pPICZaB y pGAPZaB. Los transformantes han sido seleccionados en medio YPDS que contiene zeocina. El índice de transformación es de 10^2 transformantes por μg de ADN. Los clones obtenidos con el vector pPICZαB se denominan "clones PIC" y los clones obtenidos con el vector pGAPZaB se denominan "clones GAP". Para cada transformación, se han extraído 100 clones al azar y su producción de fitasa recombinante (recPhyt) ha sido evaluada en medio gelosado. Después de la revelación, los clones más productores presentan un halo marrón alrededor de las colonias. El 96% de los clones PIC y 66% de los clones GAP son productores. Entre los clones más productores, 10 clones GAP y 10 clones PIC han sido ensayados sobre un medio sintético en Erlenmeyer. Para cada clon, se ha determinado la relación entre la biomasa

(evaluada mediante la medición de la D.O.) y la actividad fitásica en el sobrenadante de cultivo (medida mediante la hidrólisis del p-NPP). La relación varía de 0 a 0,48 entre los clones PIC y de 1,28 a 6,07 para los clones GAP. En estas condiciones de cultivo, los clones GAP son los mejores productores. Según Waterham *et al.* (Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V. y Cregg, J. M. (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. Gene 186, 37-44), el promotor GAP en cultivo sobre glucosa parece más fuerte que el promotor AOX1 en cultivo sobre metanol, durante unos cultivos en Erlenmeyer.

Para completar esta fase de selección, los clones PIC81 y PIC61 por un lado, y GAP29 y GAP66 por otro lado han sido ensayados en un fermentador. Para los clones PIC, dos batch sucesivos sobre glicerol (40 g/l) permiten obtener una biomasa elevada antes de la inducción por el metanol (780 g/l) en modo feed-batch. Para los clones GAP, un primer cultivo batch sobre glucosa (20 g/l) está seguido de una fase de producción en modo fed-batch sobre glucosa 400 g/l. El clon PIC81 permite obtener una biomasa final de 81 g MS/l mientras que la biomasa final del clon PIC61 es sólo de 65 g MS/l. Por el contrario, los dos clones producen sustancialmente la misma cantidad de recPhyt (100 U/ml). Los clones GAP presentan unos crecimientos idénticos (100 g MS/l) al final del cultivo pero las producciones obtenidas son de 11 U/ml para el clon GAP29 y 9 U/ml para el clon GAP66. Las cepas recombinantes obtenidas producen respectivamente 100 (cepas PIC) y 10 (cepas GAP) veces más de fitasa que la cepa salvaje de *D. Castellii* CBS 2923. La producción por los clones PIC81 y GAP29 ha sido optimizada en un fermentador.

Producción de fitasa recombinante

Expresión constitutiva - Influencia de la fuente de carbono y de la velocidad específica de crecimiento sobre la producción del clon GAP

La producción de recPhyt ha sido estudiada en cultivo sobre glucosa (400 g/l), glicerol (400 g/l) y metanol (780 g/l) en modo fed-batch. Los resultados se presentan en la tabla 8.

TABLA 8

Comparación de los parámetros obtenidos durante los cultivos fed-batch del clon GAP29. Para todos los experimentos, las fases batch han sido realizadas sobre el mismo medio que contiene 40 g/l de glicerol

Sustrato para el Fed-batch	μ impuesto h^{-1}	Fase de cultivo	Biomasa g MS/l	Yx/ s g/g	μ global h^{-1}	recPhyt U/ml	YrecPhyt /x U/g MS
Glucosa	0,010	Batch (49 h)[a]	19,3	0,5	0,20	6,5	340
		Fed-batch (94 h)[a]	34,6	0,3	0,009	10	289
		Final (143 h)[b]	53,9			16,5	306
Glicerol	0,010	Batch (49 h)[a]	20,5	0,5	0,20	7	341
		Fed-batch (94 h)[a]	35,2	0,3	0,008	9,6	272
		Final (143 h)[b]	*55,7*			*16,6*	*298*
Glucosa	0,040	Batch (26 h)[a]	19,2	0,5	0,20	5	260
		Fed-batch fase 1 (38)	44,6	0,56	0,037	7,1	159
		Fed-batch fase 2 (24 h)[a]	17,7	0,38	0,016	3,9	220
		Final (88 h)[b]	*81,5*			*16*	*196*
Glicerol	0,040	Batch (31 h)[a]	20,3	0,5	0,20	6	295
		Fed-batch fase 1 (38,5 h)[a]	45,3	0,55	0,039	7,3	161
		Fed-batch fase 1 (24 h)[a]	13,2	0,3	0,016	3,3	250
		Final (93,5h)[d]	*78,8*			*16,6*	*210*
Metanol	0,010	Batch (29 h)[a]	40	0,5	0,15	9,6	240
		Fed-batch (113 h)[a]	43,8	0,16	0,009	4,9	112
		Final (142 h)[b]	*83,8*			14,5	173

[a]: Estos valores corresponden a los valores obtenidos durante cada fase.
[b]: Estos valores corresponden a los valores al final del cultivo.

Para los dos primeros sustratos, un solo batch sobre glicerol (40 g/l) permite alcanzar 20 g/l de biomasa y una velocidad específica de crecimiento de 0,2 h^{-1}. Según la duración de la fase estacionaria antes del fed-batch, la producción de recPhyt es diferente: próxima a 7 U/ml, es decir, 340 U/g MS para una fase estacionaria de 12 h, próxima a 5,5 U/ml, es decir, 275 U/g MS para una fase estacionaria de 3 h. La producción en modo fed-batch sobre glucosa y

glicerol con una velocidad específica de crecimiento impuesta de 0,01 h^{-1} permite alcanzar 55 g/l de biomasa, y una producción de fitasa de 16,5 U/ml, es decir, 280 U/g MS. Durante el cultivo fed-batch sobre metanol después de dos batch sobre glicerol (40 g/l) y una velocidad específica de crecimiento impuesta de 0,01 h^{-1}, la biomasa alcanzada es de 84 g/l, y la producción de fitasa de 14,5 U/ml, es decir, 112 U/g MS. La producción en modo fed-batch sobre glucosa y glicerol con una velocidad específica de crecimiento impuesta de 0,04 h^{-1} permite alcanzar 80 g/l de biomasa, una producción de fitasa de 16,5 U/ml, es decir, 200 U/g MS.

En el caso en el que la producción de fitasa está bajo el control del promotor GAP, la glucosa y el glicerol son mejores sustratos para la producción de fitasa recombinante con respecto al metanol, más favorable para el crecimiento.

Expresión inducible - Influencia de la velocidad específica de crecimiento sobre la producción del clon PIC

La producción por el clon PIC81 ha sido estudiada en modo fed-batch (figura 6 y tabla 9) y en modo continuo (figura 6 y tabla 9).

TABLA 9

Comparación de los parámetros obtenidos durante unos cultivos fed-batch y continuo del clon PIC81

Modo de cultivo		μ o D h^{-1}	Biomasa g MS/l	Yx/s g/g	recPhyt U/ml	YrecPhyt/x U/g MS
Fed batch	Fase 1 (64 h)[a]	0,012	28,8	0,21	34,7	1105
0,01	Fase 2 (54 h)[a]	0,011	22,9	0,18	72,3	2342
h1	*Final (118 h)*[b]		51,7		*107*	*1337*
Fed-batch	Fase 1 (22,5 h)[a]	0,047	32,5	0,41	16,7	472
0,03h-1	Fase 2 (28,5 h)[a]	0,033	49,6	0,28	47,2	880
	Final (51 h)[b]		*82,1*		*63,9*	*614*
Contínuo[c]		0,032	21,6	0,32	57,7	2700
		0,053	27,2	0,41	11,6	430
		0,077	26,3	0,39	5,7	210
		0,095	26,6	0,40	3	116

[a]: Estos valores corresponden a los valores obtenidos durante cada fase.
[b]: Estos valores corresponden a los valores al final del cultivo.
[c]: Para cada índice de dilución, las mediciones han sido realizadas después de por lo menos tres renovaciones del contenido del fermentador.

En cultivo fed-batch, se han impuesto dos valores de velocidad específica de crecimiento (μ) (0,01 h^{-1} y 0,03 h^{-1}). La biomasa obtenida es 1,5 veces más elevada con μ = 0,03 h^{-1} (82 g/l) que con μ = 0,01 h^{-1} (52 g/l). La producción de fitasa se efectúa en dos fases (tabla 9). Para una velocidad específica de crecimiento impuesta de 0,01 h^{-1}, una primera fase conduce a la producción de 28,8 g/l de biomasa con una producción de fitasa de 1.105 U/g MS. Durante la segunda fase, se obtienen 22,9 g/l de biomasa y la producción de fitasa alcanza 2.342 U/g MS, es decir, 107 U/ml. Unos resultados similares se obtienen con μ = 0,03 h^{-1}, en el que la producción de fitasa pasa de 472 U/g MS durante la primera fase a 880 U/g MS durante la segunda fase, es decir, 64 U/ml. El aumento de la velocidad específica de crecimiento es más favorable para el crecimiento celular que para la producción de fitasa recombinante. En cultivo continuo, se han impuesto cuatro índices de dilución (tabla 9). Para unos valores de índice de dilución superiores a 0,053 h^{-1}, la biomasa en equilibrio es de 27 g/l mientras que es sólo de 21,6 g/l a un índice de dilución de 0,032 h^{-1}. Tal como en el cultivo en modo fed-batch, el aumento del índice de dilución es favorable para la producción de biomasa en detrimento de la producción de proteínas recombinantes. Los valores máximos, 2.700 U/g MS, es decir, 57,7 U/ml, se obtienen para un índice de dilución de 0,032 h^{-1}. La comparación de la producción de fitasa por un sistema inducible (promotor AOX1, clon PIC81) y por un sistema constitutivo (promotor GAP, clon GAP29) muestra que el promotor AOX1 es claramente superior al promotor GAP. La cepa PIC81 ha permitido obtener 107 U/ml de fitasa recombinante, es decir, 7 veces más que la cepa GAP29 (16 U/ml). La producción específica es de respectivamente 2.700 U/g MS (PIC81) y 340 U/g Ms (GAP29), es decir, 100 y 10 veces superior a la de la cepa *D. Castellii*.

Purificación

El sobrenadante obtenido después de uno de los cultivos en modo fed-batch del clon PIC81 ha sido purificado en una etapa tal como se ha descrito en la parte Materiales y Métodos. La actividad fitásica específica es de 101 U/mg de proteínas en el extracto bruto, y de 182 U/mg de proteínas en el extracto purificado. Así, el factor de purificación es de 1,8. Este valor relativamente bajo sugiere que la fitasa recombinante es la proteína mayoritaria en el extracto bruto.

Esta hipótesis se ha confirmado realizando una electroforesis SDS-PAGE. Sobre el gel, la banda que corresponde a la fitasa recombinante representa 60% de las proteínas totales. Por otra parte, después de la purificación, se observa una sola banda que confirma así la purificación con homogeneidad de la proteína.

La actividad específica obtenida después de la purificación es superior a la obtenida durante la expresión de la fitasa de *Aspergillus fumigatus* en *P. pastoris* (43 U/mg de proteínas) (Rodriguez, E., Mullaney, E. J. y Lei, X. G. (2000) Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun. 268, 373-378).

Caracterización de la fitasa recombinante

Efectos del pH

RecPhyt es activa para unos valores de pH comprendidos entre 2 y 6,5, y el valor óptimo se sitúa entre 4 y 4,5. La fitasa de *D. Castellii* CBS 2923 presenta unas características similares.

Efecto de la temperatura

Las determinaciones de la actividad fitásica a diferentes temperaturas muestran que la fitasa recombinante es más activa para las temperaturas elevadas, con un valor óptimo a +60ºC, tal como la fitasa de *D. Castellii* CBS 2923. La mayoría de los valores citados para la temperatura óptima son inferiores a +45ºC, salvo para algunos hongos y levaduras tales como *Aspergillus ficuum* (+58ºC) (Ullah, A. H. J. y Gibson, D. M. (1987) Extracellular phytase (EC 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. Prep. Biochem. 17, 63-91), *Aspergillus terreus* (+70ºC) (Yamada, K., Minoda, Y. y Yamamoto, S. (1968) Phytase from *Aspergillus terreus*. 1. Production, purification and some general properties of the enzyme. Agric. Biol. Chem. 32, 1275-1282) y *S. castellii* (+77ºC) (Segueilha, L., Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G. y Galzy, P. (1992) Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. J. Ferment. Bioeng. 74, 7-11). La representación de Arrhenius permite calcular la energía de activación de la reacción, E=37,9 kJ/mol. El estudio de la desnaturalización térmica muestra que la fitasa recombinante es estable para unas temperaturas inferiores a +67ºC y fuertemente desnaturalizada para unas temperaturas superiores a +70ºC. La energía de activación calculada gracias a la representación de Arrhenius es de E=794,2 kJ/mol. La fitasa de *D. Castellii* CBS 2923 presenta unas características de termo-resistencia similares.

Especificidad del sustrato

La fitasa recombinante sigue una cinética de Michaelis-Menten, con un K_m de 0,24 mM y una V_m de 137,8 U/mg sobre el fitato de sodio, y un K_m de 2,05 mM y una V_m de 274,6 U/mg sobre el p-NPP (determinación gracias a la representación de Lineweaver-Burk; datos no publicados). Así, la enzima tiene una mayor afinidad para el fitato. La fitasa de *D. castellii* CBS 2923 tiene unos valores de K_m similares.

Estudios cinéticos

Los productos principales de la degradación del $InsP_6$ son el DL-Ins(1,2,4,5,6)P_5 y el DL-Ins(1,2,5,6)P_4. La fitasa recombinante es por lo tanto una 3-fitasa. Por otra parte, el cromatograma muestra que la degradación de los $InsP_5$, $InsP_4$, $InsP_3$ e $InsP_2$ empieza antes incluso de que el $InsP_6$ se agote, y que existe una acumulación del $InsP_3$. Esto sugiere que la fitasa recombinante tiene una afinidad menos fuerte para $InsP_3$ que para $InsP_4$, $InsP_5$ e $InsP_6$. La fitasa de *D. castellii* CBS 2923 muestra los mismos perfiles cromatográficos.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido, **caracterizado** porque comprende un polipéptido seleccionado de entre los polipéptidos siguientes:

- el polipéptido de la SEC ID nº 2,
- un fragmento del polipéptido de la SEC ID nº 2 que tiene una actividad fitasa,
- un polipéptido que tiene una actividad fitasa y que presenta por lo menos 90% de identidad con el polipéptido de la SEC ID nº 2.

2. Polinucleótido que codifica para una actividad fitasa, **caracterizado** porque se selecciona de entre los polinucleótidos siguientes:

- el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 1538 y la posición 2923 de la SEC ID nº 1,
- un polinucleótido que codifica para un polipéptido según la reivindicación 1.

3. Polinucleótido, **caracterizado** porque tiene la secuencia de la SEC ID nº 1 o la secuencia complementaria a la SEC ID nº 1.

4. Casete de expresión, **caracterizado** porque comprende, en el sentido de la transcripción:

- un promotor funcional en un organismo hospedante;
- un polinucleótido según la reivindicación 2; y
- una secuencia terminadora en el mismo organismo hospedante.

5. Vector que comprende un polinucleótido según una de las reivindicaciones 2 a 3, y/o un casete de expresión según la reivindicación 4.

6. Procedimiento de transformación de un organismo hospedante mediante la integración en dicho organismo hospedante

- de por lo menos un polinucleótido según una de las reivindicaciones 2 ó 3,
- de un casete de expresión según la reivindicación 4, o
- de un vector según la reivindicación 5,

siendo dicho organismo hospedante *Pichia Pastoris*.

7. Aditivo nutricional para animales, **caracterizado** porque comprende un polipéptido según la reivindicación 1.

8. Aditivo nutricional para animales, **caracterizado** porque comprende un organismo hospedante según la reivindicación 6 y/o un mosto de fermentación de un organismo hospedante según la reivindicación 6.

9. Aditivo nutricional para animales según una de las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizado** porque se presenta en forma líquida o en forma de polvo.

10. Alimento para animales, **caracterizado** porque comprende una base nutricional para animales y un aditivo nutricional para animales según una de las reivindicaciones 7 a 9.

11. Alimento para animales, **caracterizado** porque comprende un polipéptido según la reivindicación 1, un organismo hospedante obtenido mediante el procedimiento según la reivindicación 6 y/o un mosto de fermentación de un organismo hospedante obtenido mediante el procedimiento según la reivindicación 6.

12. Utilización de un polipéptido según la reivindicación 1 o de un organismo hospedante obtenido mediante el procedimiento según la reivindicación 6 para la fabricación de un aditivo nutricional para animales o de un alimento para animales.

13. Utilización de un polipéptido según la reivindicación 1 o de un organismo hospedante obtenido mediante el procedimiento según la reivindicación 6 para la hidrólisis del myo-inositol hexakisfosfato en monofosfato inorgánico, en myo-inositol de grado de fosforilación inferior y en myo-inositol libre.

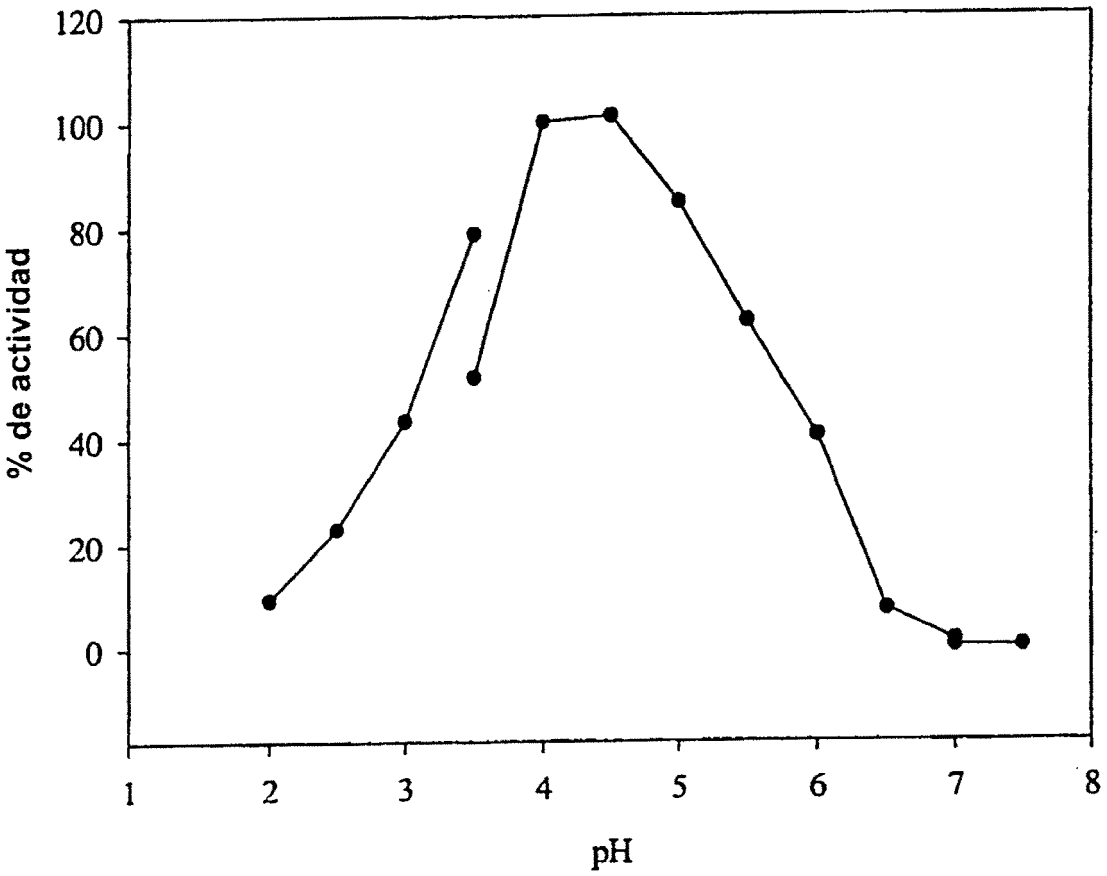


Fig. 1

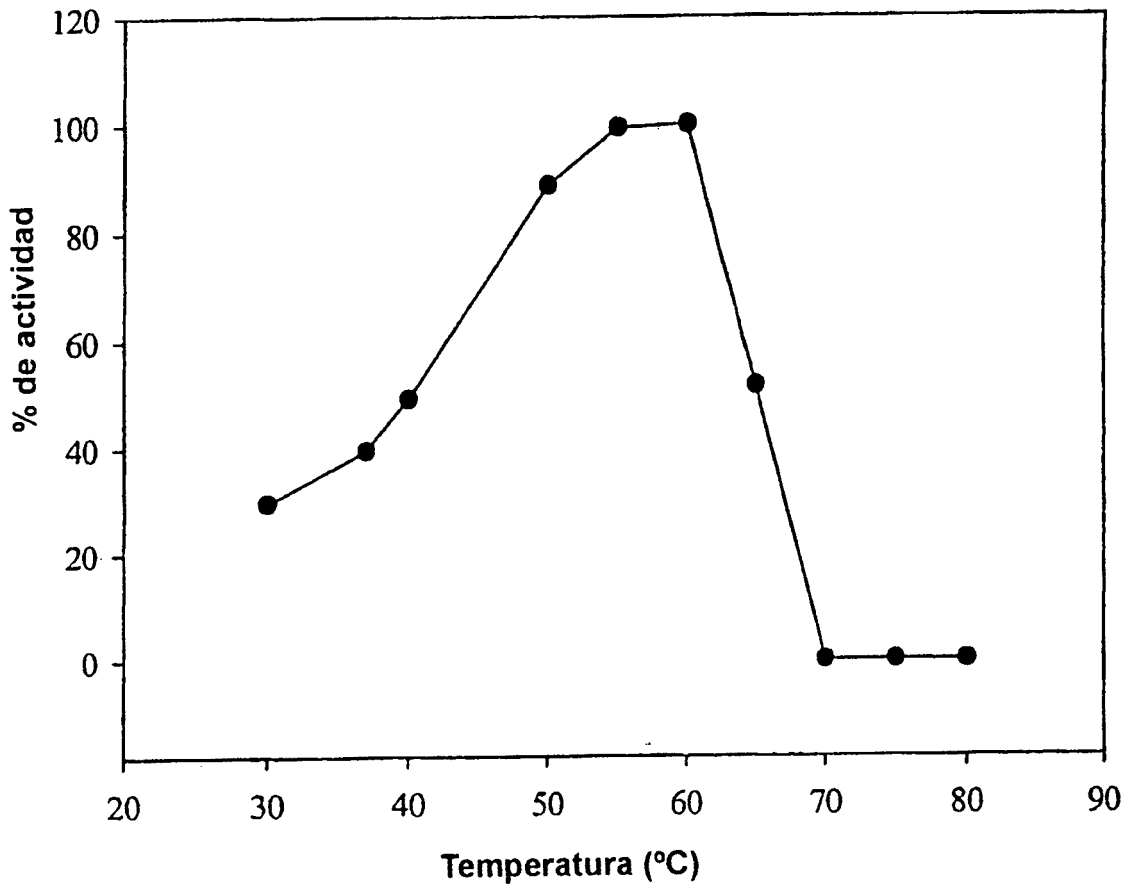

120
100
80
60
40
20
0
% de actividad
20
30
40
50
60
70
80
90
Temperatura (°C)

Fig. 2

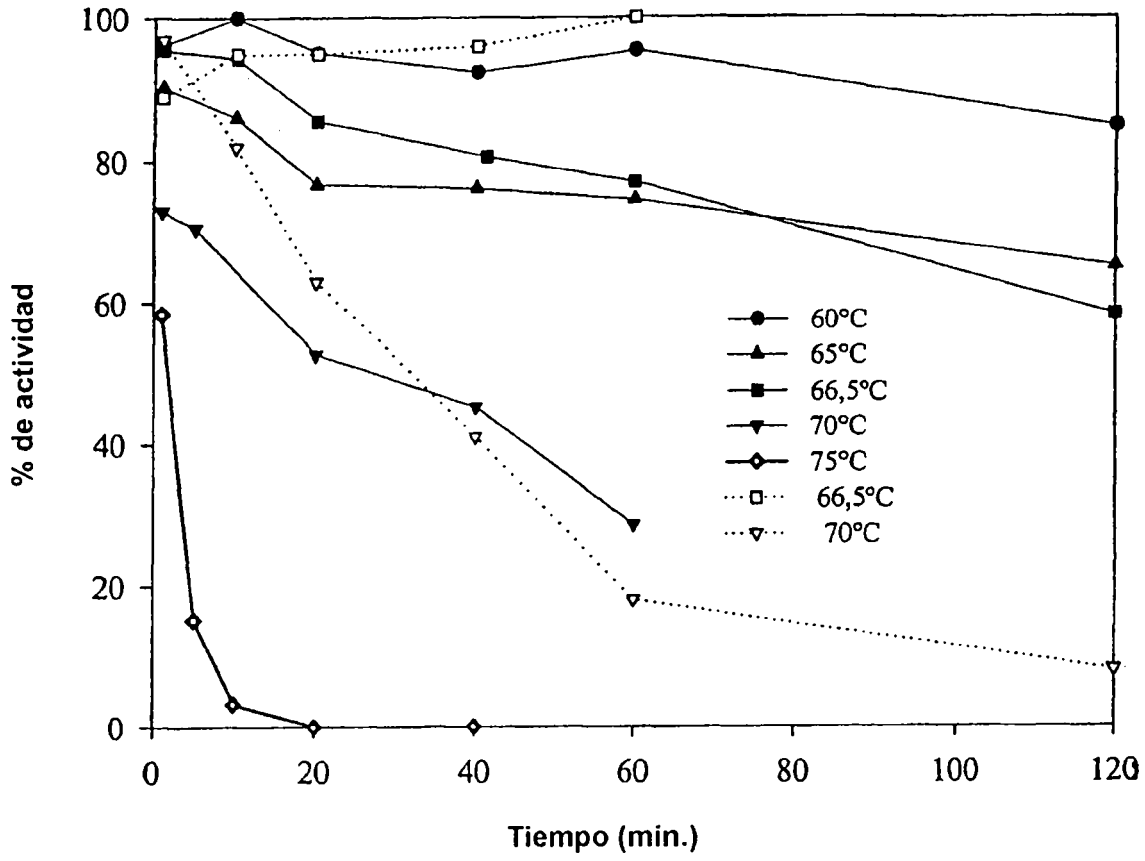

100
80
60
40
20
0
% de actividad
0
20
40
60
80
100
120
Tiempo (min.)
60°C
65°C
66,5°C
70°C
75°C
66,5°C
70°C

Fig. 3

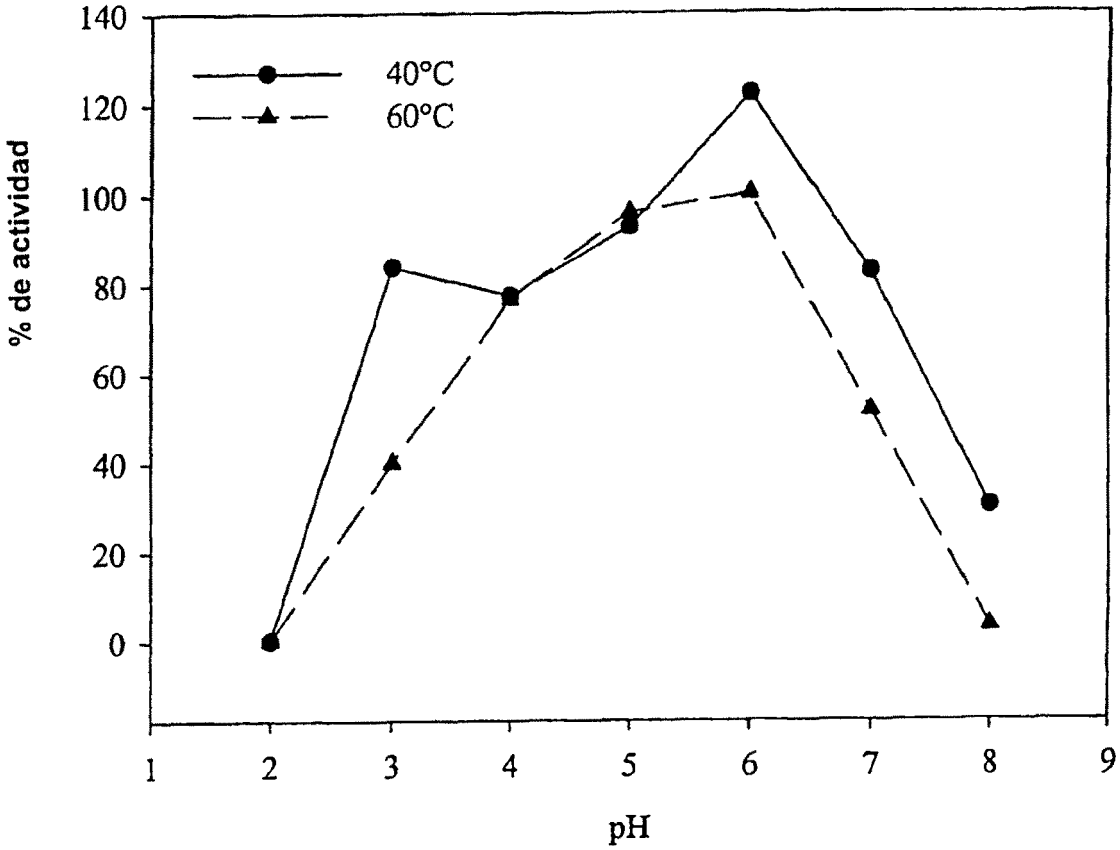


Fig. 4

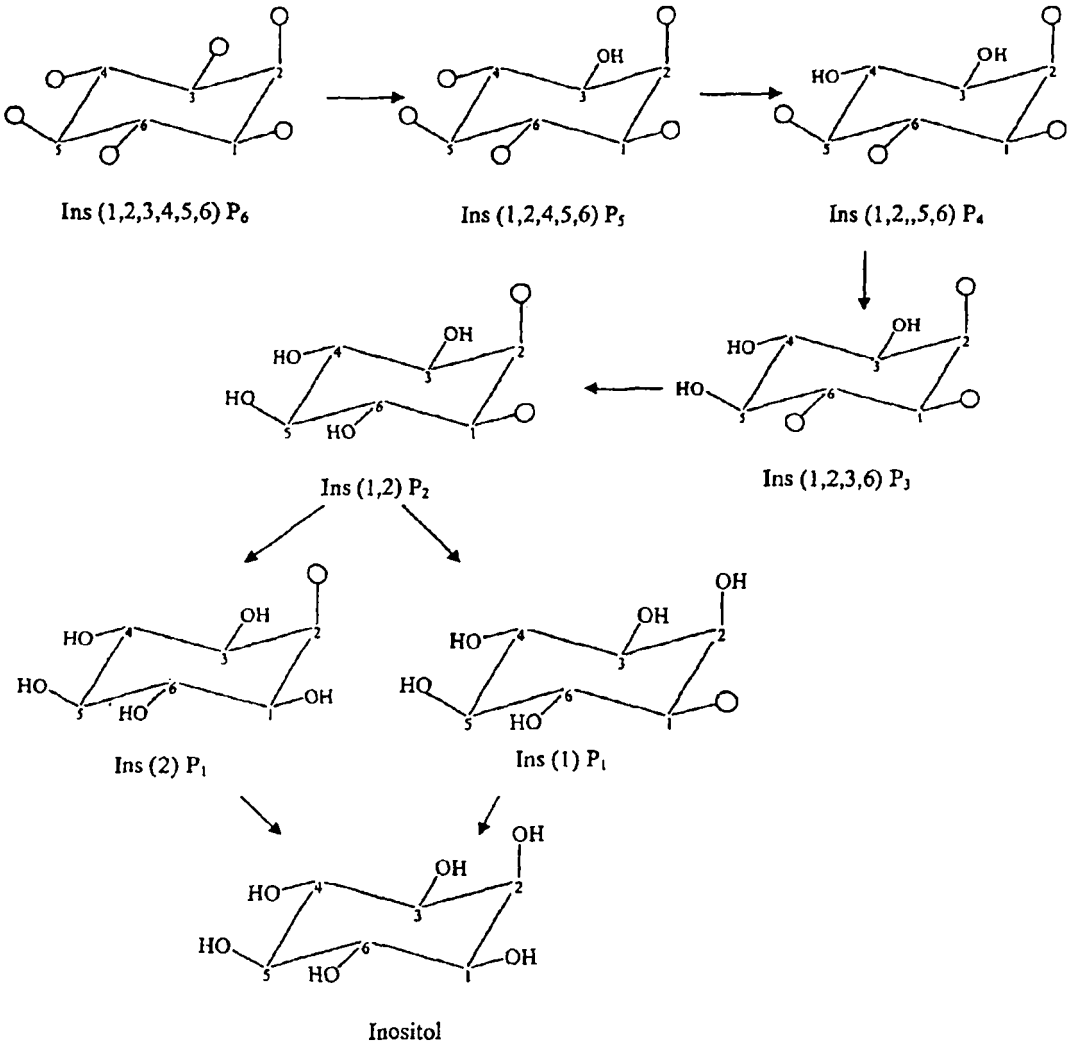
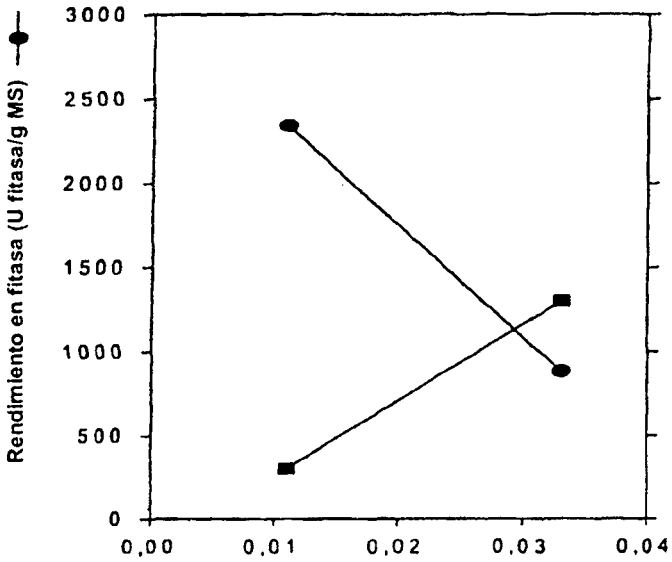

Ins (1,2,3,4,5,6) P6
Ins (1,2,4,5,6) P5
Ins (1,2,,5,6) P4
Ins (1,2,3,6) P3
Ins (1,2) P2
Ins (2) P1
Ins (1) P1
Inositol

Fig. 5

A)


Rendimiento en fitasa (U fitasa/g MS)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0,00
0,01
0,02
0,03
0,04

B)

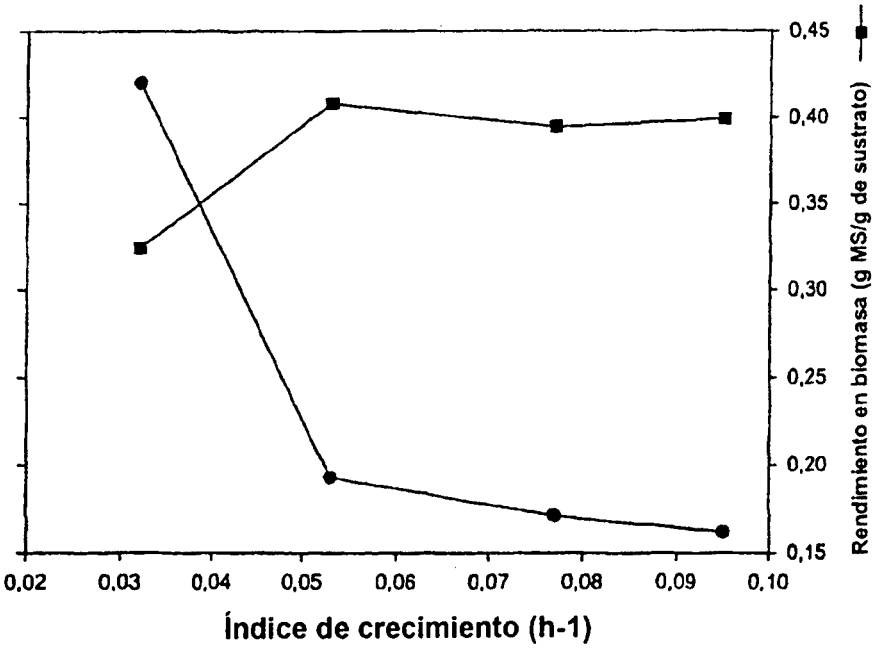

0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
Rendimiento en biomasa (g MS/g de sustrato)
0,02
0,03
0,04
0,05
0,06
0,07
0,08
0,09
0,10
Índice de crecimiento (h-1)

Fig. 6

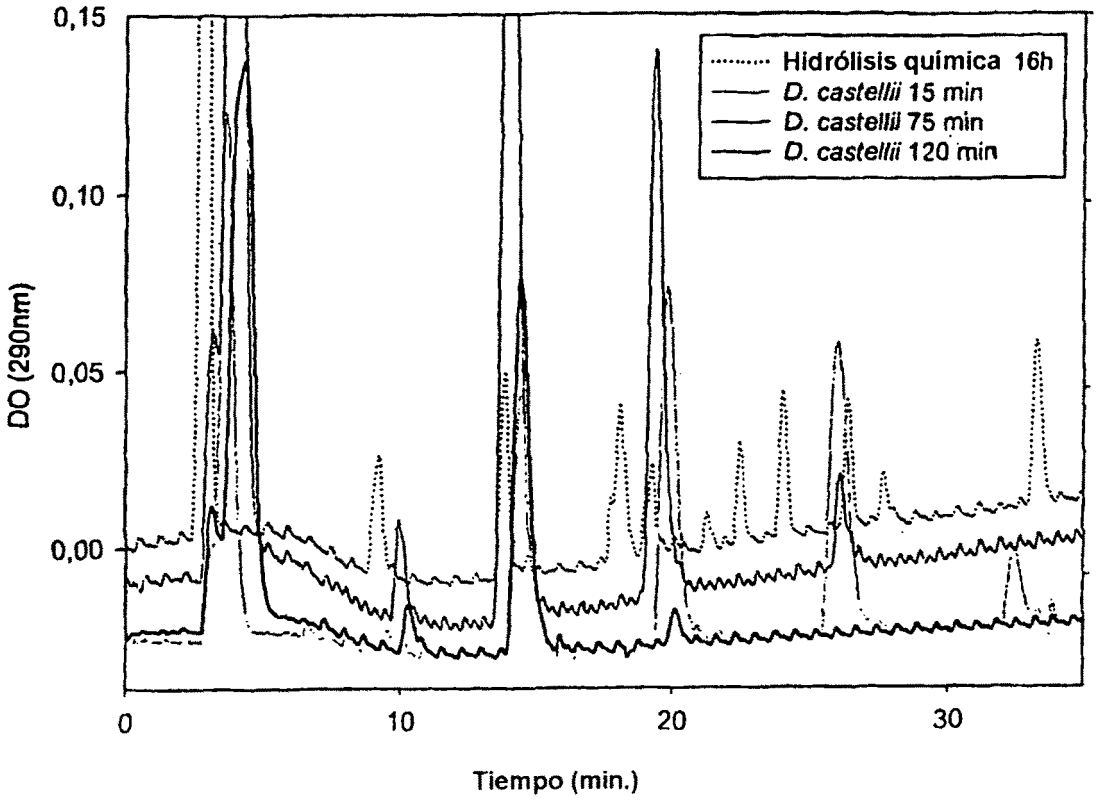

0,15
0,10
0,05
0,00
DO (290nm)
0
10
20
30
Tiempo (min.)
Hidrólisis química 16h
D. castellii 15 min
D. castellii 75 min
D. castellii 120 min

Fig. 7

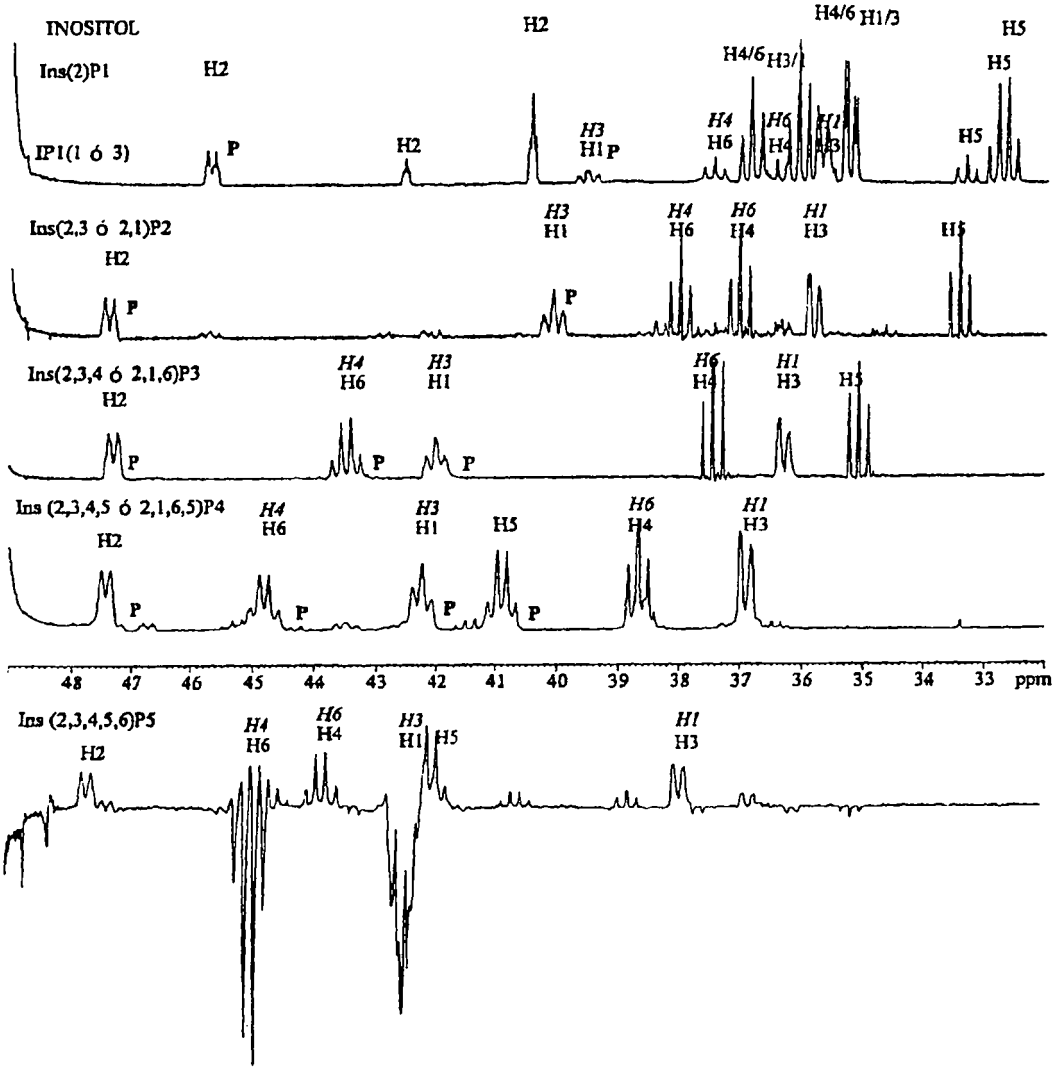

INOSITOL
Ins(2)P1
IP1(1 ó 3)
Ins(2,3 ó 2,1)P2
Ins(2,3,4 ó 2,1,6)P3
Ins (2,3,4,5 ó 2,1,6,5)P4
Ins (2,3,4,5,6)P5
H2
H1/3
H4/6
H5
H3
H4
H6
H1
P
48 47 46 45 44 43 42 41 40 39 38 37 36 35 34 33 ppm

Fig.8

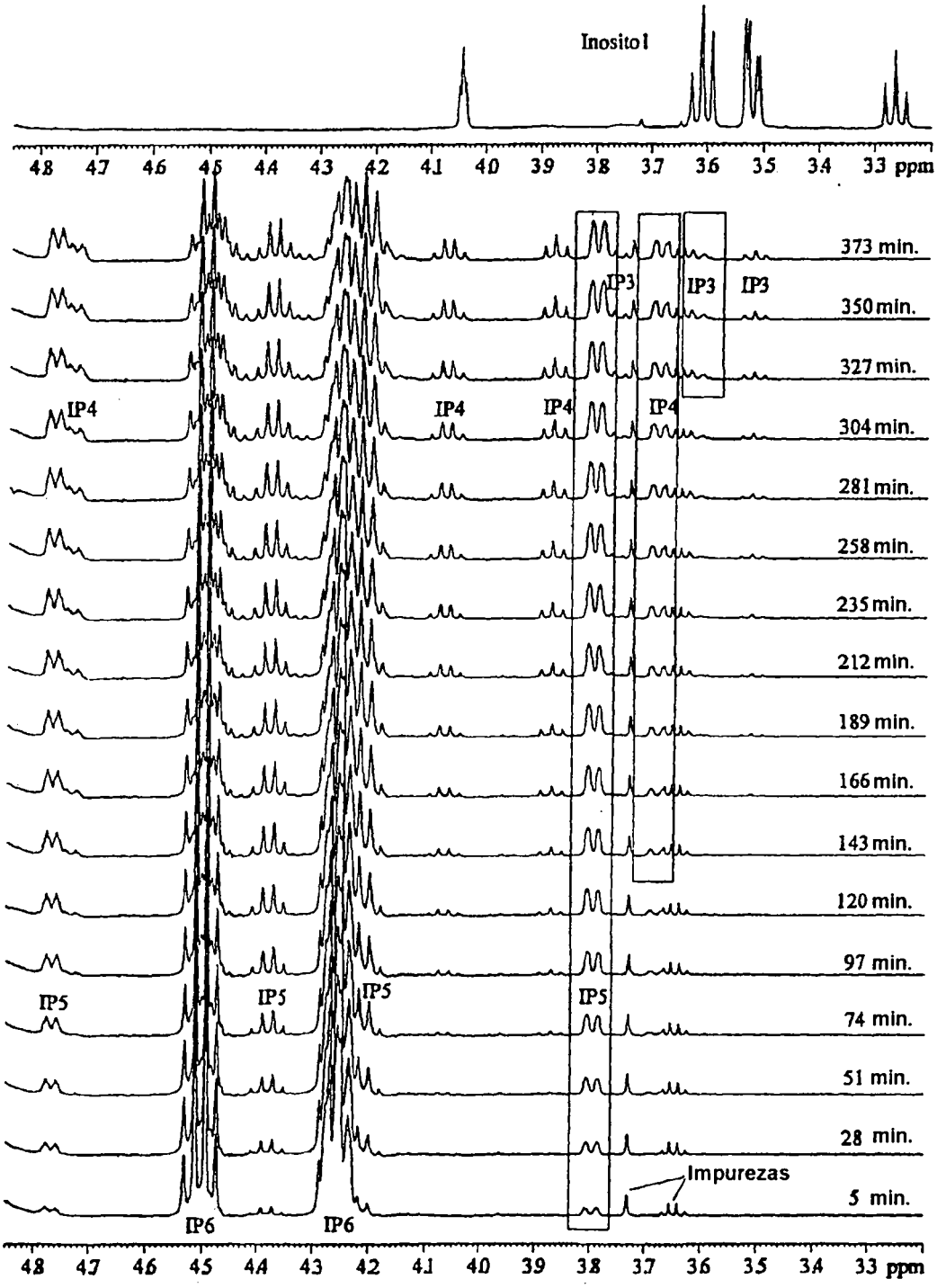

Inositol
48 47 46 45 44 43 42 41 40 39 38 37 36 35 34 33 ppm
373 min.
350 min.
327 min.
304 min.
281 min.
258 min.
235 min.
212 min.
189 min.
166 min.
143 min.
120 min.
97 min.
74 min.
51 min.
28 min.
5 min.
IP3
IP4
IP5
IP6
Impurezas

Fig. 9

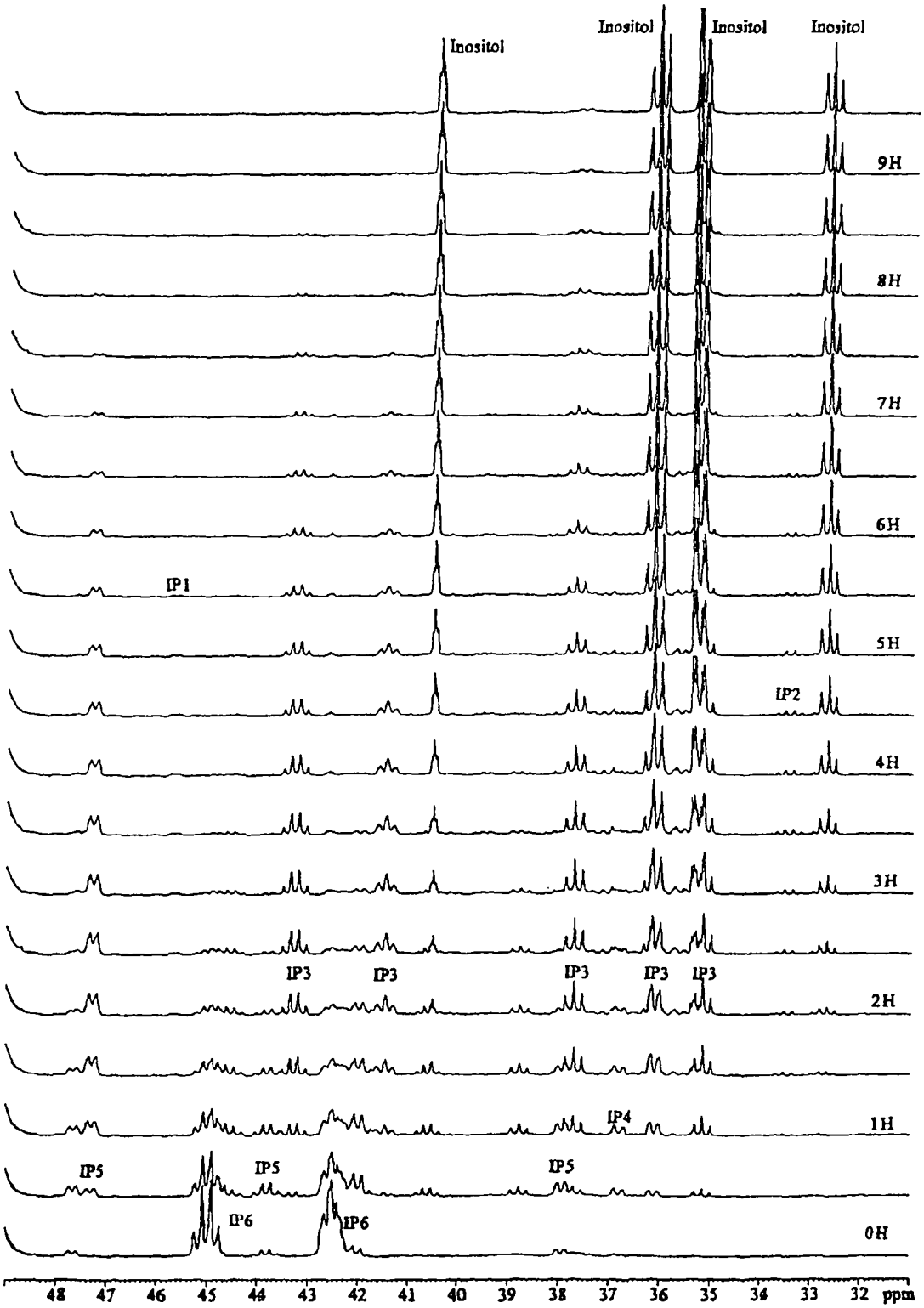

Inositol
Inositol
Inositol
Inositol
9H
8H
7H
6H
IP1
5H
IP2
4H
3H
IP3
IP3
IP3
IP3
IP3
2H
IP4
1H
IP5
IP5
IP5
IP6
IP6
0H
48 47 46 45 44 43 42 41 40 39 38 37 36 35 34 33 32 ppm

Fig. 10

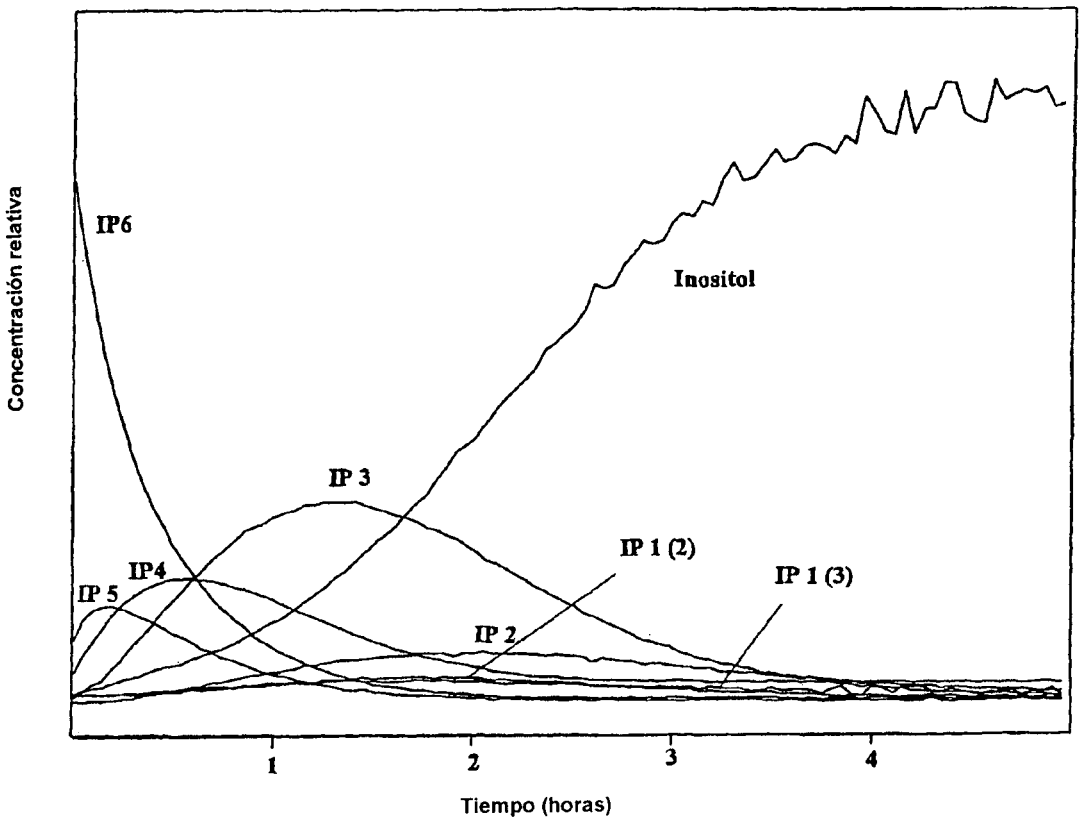

Concentración relativa
IP6
Inositol
IP 3
IP 1 (2)
IP4
IP 5
IP 1 (3)
IP 2
1
2
3
4
Tiempo (horas)

Fig. 11

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ADISSEO FRANCE SAS

<120> Fitasa de *Debaryomyces castellii*

<130> HL/SG/EP-49825

<150> FR05.07336
<151> 2005-08-07

<160> 18

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 2973
<212> ADN
<213> *Debaryomyces castellii*

<220>
<221> misc_feature
<222> (782)..(782)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> CDS
<222> (1538)..(2923)

<400> 1

aagattgtgt tagataataa gaagcaaacc cttgatgatt tttttggaaa aaaggatttt 60

gctcttatag aaagggccgc tgctgttgat aaagaaggtt ctacagaacc tgagattata 120

aatgatgctt ctaaggaaaa atcagcaagt ccgtcagata gcagaatttc tcgatcagaa 180

attgaaaaca tgaattctaa cgaagaaaat ctctcgcttt taggtaagaa gcgcttaagc 240

gcaaaggaaa gaagattgtt aagaaagaat aaaaagaatg actctgctgc tcaaagtgat 300

gatgatgatg atgtgttaga tccaattaaa caacagttgc aaaaattaaa acttcaagaa 360

agtaaggcta ctgaaaaaga agctcctaac cagaaaccac ctaatgttag aggtaaaaaa 420

gccaagctta agaagattgc agctaagtat gcagatcaaa cagaggaaga aagaagattg 480

agaatggaag cattgggaac tttgaagcaa gttgaacagg aaaagcaaaa tcaattgcaa 540

aatgatcata agaatgagct caacaatgaa aaggcacaaa tgaatcttga aaagaaaaag 600

aaacaggaag aaagagaata ccgtaaatat atcatggatg aagtagacga gtcggaatca 660

tccttgacaa attacttaga aatacttgat tccttcattt caaagccgca gccatctgat 720

gtgctttctc atccaatcgc ggtgtttgca ccgtggtcct ctctccaaaa attcaaatat 780

atggtcaaaa tccacccggg ttcaggaaag aagggtaaat gcatcaacga cactcttaac 840

tacttcacta ctcggaaatt ggatgagctg cgttctgata ccgatttgga ctggctgcat 900

gaaagagata tgcttaagcg cataaagccc aacgatctta tgggggtgtt taccgttagc 960

aaagttaaat tagtgctacc aggtggcctg gagtcaaaca aagctctggg tgcgaataag 1020

aaggcgactg gctccaaaag gaaaaagtga ttaacgcccc aatcggacct ttgttttatg 1080

tacaattaat tagtttaatt agttcgtatt tgcattgatt tactctttct ctagaatatg 1140

acctgatagg acactacata ccattcttaa taatagatac atatcccgga ctaatatgtt 1200

ttgtgtcaaa ttaggaaatc ctctgtcaaa tctgtctaat aacaatgtaa attagtgaga 1260

ctaattacat tatctacagc acgtgtatca ctactttaag ctttgaccct tgtgacctaa 1320

aggattcttt tacacgtgtg tggaagcagc agaactattg gacacagacg aaagtgtgct 1380

tcttcatcga tcaatataga atgcataata agcgaattgt ttttgagtcc caaaaaagca 1440

gagaactgtt atgaatatgg ttgtgaaaag tataaaagac aaagaagtcc tcgaattgct 1500

atggatagat tcataagtat caaagtaaat agtcaat atg gtc tca gtc tca aag 1555
Met Val Ser Val Ser Lys
1 5

```
tta att aac aat ggt tta ttg ttg gta ggt caa ggt gcc tac caa gat      1603
Leu Ile Asn Asn Gly Leu Leu Leu Val Gly Gln Gly Ala Tyr Gln Asp
            10                  15                  20

ttg gct tcc cca caa caa gcg tcc gtc gag caa tat aac atc atc aga      1651
Leu Ala Ser Pro Gln Gln Ala Ser Val Glu Gln Tyr Asn Ile Ile Arg
        25                  30                  35

ttc tta gga gga gct cct cca tat atc caa aac aaa ggg ttc ggt atc      1699
Phe Leu Gly Gly Ala Ala Pro Tyr Ile Gln Asn Lys Gly Phe Gly Ile
    40                  45                  50

tct act gat atc cca gat caa tgt act ctt gag caa gtc caa ttg ttc      1747
Ser Thr Asp Ile Pro Asp Gln Cys Thr Leu Glu Gln Val Gln Leu Phe
55                  60                  65                  70

agc aga cat ggt gaa aga tac cca tcc act ggc tcc gga aag aaa tat      1795
Ser Arg His Gly Glu Arg Tyr Pro Ser Thr Gly Ser Gly Lys Lys Tyr
                75                  80                  85

aag gct gta tat gaa aag ttg atg tca tac aac ggt act ttc aag gga      1843
Lys Ala Val Tyr Glu Lys Leu Met Ser Tyr Asn Gly Thr Phe Lys Gly
            90                  95                  100

gaa ttg gct ttc ctc aat gac gat tat gaa tat ttt gtt cct gac tca      1891
Glu Leu Ala Phe Leu Asn Asp Asp Tyr Glu Tyr Phe Val Pro Asp Ser
        105                 110                 115

gtg tat ctt gaa aag gaa aca tca cca aag aat tct gac agt atc tac      1939
Val Tyr Leu Glu Lys Glu Thr Ser Pro Lys Asn Ser Asp Ser Ile Tyr
    120                 125                 130

gct ggt acc act gat gcc atg aag cat ggt atc gcc ttt aga acc aag      1987
Ala Gly Thr Thr Asp Ala Met Lys His Gly Ile Ala Phe Arg Thr Lys
135                 140                 145                 150

tac ggt gaa ttg ttc gat act aat gac act ctt cca gtt ttc act tcc      2035
Tyr Gly Glu Leu Phe Asp Thr Asn Asp Thr Leu Pro Val Phe Thr Ser
                155                 160                 165

aat tct ggt aga gta tat caa acc tct caa tac ttt gca aga ggt ttt      2083
Asn Ser Gly Arg Val Tyr Gln Thr Ser Gln Tyr Phe Ala Arg Gly Phe
            170                 175                 180

atg gga gat gat ttc agt aac gat acc gtc aaa acc aat att atc tct      2131
Met Gly Asp Asp Phe Ser Asn Asp Thr Val Lys Thr Asn Ile Ile Ser
        185                 190                 195

gaa gac gct gat atg ggt gcc aac tca tta aca cca aga gat ggt tgt      2179
Glu Asp Ala Asp Met Gly Ala Asn Ser Leu Thr Pro Arg Asp Gly Cys
    200                 205                 210

ttc aac tac aat gaa aat gct aac act gct att gtt gat gaa tac act      2227
Phe Asn Tyr Asn Glu Asn Ala Asn Thr Ala Ile Val Asp Glu Tyr Thr
215                 220                 225                 230
```

```
act gaa tat tta act aaa gct ctt aac aga ttt aaa gct tct aat cct      2275
Thr Glu Tyr Leu Thr Lys Ala Leu Asn Arg Phe Lys Ala Ser Asn Pro
                235                 240                 245

ggt ttg aac att act gaa gat gat gtt tct aat ctt ttt gga tac tgt      2323
Gly Leu Asn Ile Thr Glu Asp Asp Val Ser Asn Leu Phe Gly Tyr Cys
            250                 255                 260

gct tat gaa tta aat gtt aaa gga gct tct cca atg tgt gat atc ttt      2371
Ala Tyr Glu Leu Asn Val Lys Gly Ala Ser Pro Met Cys Asp Ile Phe
        265                 270                 275

act aat gaa gag ttc att caa tac tct tac agt gtt gat ctt gat gac      2419
Thr Asn Glu Glu Phe Ile Gln Tyr Ser Tyr Ser Val Asp Leu Asp Asp
    280                 285                 290

tat tac tcc aac agt gca ggt aat aat atg act aga gtc atc ggt tca      2467
Tyr Tyr Ser Asn Ser Ala Gly Asn Asn Met Thr Arg Val Ile Gly Ser
295                 300                 305                 310

aca tta tta aac gca tcc ttg gaa tta tta aac cat gac aaa aat gag      2515
Thr Leu Leu Asn Ala Ser Leu Glu Leu Leu Asn His Asp Lys Asn Glu
                315                 320                 325

aat aag att tgg tta tct ttc act cac gat act gat att gaa att ttt      2563
Asn Lys Ile Trp Leu Ser Phe Thr His Asp Thr Asp Ile Glu Ile Phe
            330                 335                 340

cat tct gct att ggt att ctt atc cct gat gaa gat tta cca gtt gat      2611
His Ser Ala Ile Gly Ile Leu Ile Pro Asp Glu Asp Leu Pro Val Asp
        345                 350                 355

tac act cca ttc cca tct cct tat tct cac gtt gga att act cct caa      2659
Tyr Thr Pro Phe Pro Ser Pro Tyr Ser His Val Gly Ile Thr Pro Gln
    360                 365                 370

ggt gct aga act att att gaa aag tac gcg tgt ggt aat gaa tct tat      2707
Gly Ala Arg Thr Ile Ile Glu Lys Tyr Ala Cys Gly Asn Glu Ser Tyr
375                 380                 385                 390

gtt aga tat gtt atc aat gat gct gtt att cca att aag aag tgt agc      2755
Val Arg Tyr Val Ile Asn Asp Ala Val Ile Pro Ile Lys Lys Cys Ser
                395                 400                 405

tct ggt cct ggt ttc tca tgt aat ctt aat gat tat aat gat tat gtt      2803
Ser Gly Pro Gly Phe Ser Cys Asn Leu Asn Asp Tyr Asn Asp Tyr Val
            410                 415                 420

gct gaa aga gtt gca ggt acc aac tat gtt gaa caa tgt ggt aat aac      2851
Ala Glu Arg Val Ala Gly Thr Asn Tyr Val Glu Gln Cys Gly Asn Asn
        425                 430                 435

aat gct tca gct gtt aca ttc tac tgg gat tac gaa act act aac tac      2899
Asn Ala Ser Ala Val Thr Phe Tyr Trp Asp Tyr Glu Thr Thr Asn Tyr
    440                 445                 450

acc gct tcc ctt atc aac agt taa aatttttctt tcttttactt tcttcttcaa     2953
Thr Ala Ser Leu Ile Asn Ser
455                 460

aacaagtttc tatttctttt                                               2973
```

<210> 2

<211> 461

<212> PRT

<213> *Debaryomyces castellii*

<400> 2

```
Met Val Ser Val Ser Lys Leu Ile Asn Asn Gly Leu Leu Leu Val Gly
1               5                  10                  15

Gln Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Ala Ser Pro Gln Gln Ala Ser Val Glu
            20                  25                  30

Gln Tyr Asn Ile Ile Arg Phe Leu Gly Gly Ala Ala Pro Tyr Ile Gln
        35                  40                  45

Asn Lys Gly Phe Gly Ile Ser Thr Asp Ile Pro Asp Gln Cys Thr Leu
    50                  55                  60

Glu Gln Val Gln Leu Phe Ser Arg His Gly Glu Arg Tyr Pro Ser Thr
65                  70                  75                  80

Gly Ser Gly Lys Lys Tyr Lys Ala Val Tyr Glu Lys Leu Met Ser Tyr
                85                  90                  95

Asn Gly Thr Phe Lys Gly Glu Leu Ala Phe Leu Asn Asp Asp Tyr Glu

            100                 105                 110

Tyr Phe Val Pro Asp Ser Val Tyr Leu Glu Lys Glu Thr Ser Pro Lys
        115                 120                 125

Asn Ser Asp Ser Ile Tyr Ala Gly Thr Thr Asp Ala Met Lys His Gly
    130                 135                 140

Ile Ala Phe Arg Thr Lys Tyr Gly Glu Leu Phe Asp Thr Asn Asp Thr
145                 150                 155                 160
```

Leu Pro Val Phe Thr Ser Asn Ser Gly Arg Val Tyr Gln Thr Ser Gln
165 170 175

Tyr Phe Ala Arg Gly Phe Met Gly Asp Asp Phe Ser Asn Asp Thr Val
180 185 190

Lys Thr Asn Ile Ile Ser Glu Asp Ala Asp Met Gly Ala Asn Ser Leu
195 200 205

Thr Pro Arg Asp Gly Cys Phe Asn Tyr Asn Glu Asn Ala Asn Thr Ala
210 215 220

Ile Val Asp Glu Tyr Thr Thr Glu Tyr Leu Thr Lys Ala Leu Asn Arg
225 230 235 240

Phe Lys Ala Ser Asn Pro Gly Leu Asn Ile Thr Glu Asp Asp Val Ser
245 250 255

Asn Leu Phe Gly Tyr Cys Ala Tyr Glu Leu Asn Val Lys Gly Ala Ser
260 265 270

Pro Met Cys Asp Ile Phe Thr Asn Glu Glu Phe Ile Gln Tyr Ser Tyr
275 280 285

Ser Val Asp Leu Asp Asp Tyr Tyr Ser Asn Ser Ala Gly Asn Asn Met
290 295 300

Thr Arg Val Ile Gly Ser Thr Leu Leu Asn Ala Ser Leu Glu Leu Leu
305 310 315 320

Asn His Asp Lys Asn Glu Asn Lys Ile Trp Leu Ser Phe Thr His Asp
325 330 335

```
Thr Asp Ile Glu Ile Phe His Ser Ala Ile Gly Ile Leu Ile Pro Asp
            340                 345                 350

Glu Asp Leu Pro Val Asp Tyr Thr Pro Phe Pro Ser Pro Tyr Ser His
        355                 360                 365

Val Gly Ile Thr Pro Gln Gly Ala Arg Thr Ile Ile Glu Lys Tyr Ala
    370                 375                 380

Cys Gly Asn Glu Ser Tyr Val Arg Tyr Val Ile Asn Asp Ala Val Ile
385                 390                 395                 400

Pro Ile Lys Lys Cys Ser Ser Gly Pro Gly Phe Ser Cys Asn Leu Asn
                405                 410                 415

Asp Tyr Asn Asp Tyr Val Ala Glu Arg Val Ala Gly Thr Asn Tyr Val
            420                 425                 430

Glu Gln Cys Gly Asn Asn Asn Ala Ser Ala Val Thr Phe Tyr Trp Asp
        435                 440                 445

Tyr Glu Thr Thr Asn Tyr Thr Ala Ser Leu Ile Asn Ser
    450                 455                 460
```

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 3

```
Arg His Gly Xaa Arg Xaa Pro
1               5
```

<210> 4
<211> 7

<212> PRT
<213> *Debaryomyces castellii*

<400> 4

Arg His Gly Glu Arg Tyr Pro
1 5

<210> 5
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_feature
<223> Cebador Phyt-Nter-for

<400> 5

tcaarttrat haayaaygg 19

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_feature
<223> Cebador Phyt-pepl-rev

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 6

ggnacraart aytcrtartc 20

<210> 7
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_feature
<223> Cebador AP1

<400> 7

gtaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 8
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_feature
<223> Cebador AP2

<400> 8

actatagggc acgcgtggt 19

<210> 9
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_feature
<223> Cebador 5phyt-spe-1

<400> 9

tatggagcag ctcctcctaa gaatctg 27

<210> 10
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_feature
<223> Cebador 5phyt-spe-2

<400> 10

atgatgttat attgctcgac ggacgcttg 29

<210> 11
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_feature

<223> Cebador 3phyt-spe-1

<400> 11

tatggagcag ctcctcctaa gaatctg 27

<210> 12
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_feature
<223> Cebador 3phyt-spe-2

<400> 12

ctggctccgg aaagaaatat aaggctgta 29

<210> 13
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc feature
<223> Cebador 3bisphyt-spe-1

<400> 13

gaagtgtagc tctggtcctg gtttctcatg 30

<210> 14
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_feature
<223> Cebador 3bisphyt-spe-2

<400> 14

atgttgctga aagagttgca ggtaccaact 30

<210> 15
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<221> misc_feature
<223> Cebador phytDC-PstI-for

<400> 15

gcactgcagt ctcagtctca aagttaatta ac 32

<210> 16
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_feature
<223> Cebador phytDC-XbaI-rev

<400> 16

agttctagat taactgttga taagggaagc ggt 33

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> *Debaryomyces castellii*

<400> 17

Ser Lys Leu Ile Asn Asn Gly
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> *Debaryomyces castellii*

<400> 18

Pro Val Phe Tyr Glu Tyr Asp
1 5