



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 092**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **91200687 .1**

86 Fecha de presentación : **25.03.1991**

87 Número de publicación de la solicitud: **0449375**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.10.1991**

54 Título: **Expresión de fitasa en plantas.**

30 Prioridad: **23.03.1990 US 498561**
21.09.1990 US 586765

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73 Titular/es: **Koninklijke DSM N.V.**
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL
Syngenta Mogen B.V.

72 Inventor/es: **Pen, Jan;**
Hoekema, Andreas;
Sijmons, Peter Christiaan;
Van Ooyen, Albert J.J.;
Rietveld, Krijn y
Verwoerd, Teunis Cornelis

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 267 092 T3

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

DESCRIPCIÓN

Expresión de fitasa en plantas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención está relacionada con la producción de fitasa en plantas transgénicas y el uso de la fitasa producida de ese modo en procesos industriales.

10 **Antecedentes de la invención**

El fósforo es un elemento esencial para el crecimiento de todos los organismos. En la producción pecuaria, el pienso se debe complementar con fósforo inorgánico para obtener un buen nivel de crecimiento de los animales monogástricos (por ejemplo, cerdos, aves de corral y peces).

15 En contraste, no es necesario agregar fosfato inorgánico al forraje de los rumiantes. Los microorganismos, presentes en el rumen, producen enzimas que catalizan la conversión del fitato (mio-inositolhexakis-fosfato) a inositol y fosfato inorgánico.

20 El fitato está presente como una fuente de almacenamiento de fósforo en prácticamente todos las sustancias alimentarias de origen vegetal (por una revisión consulte: *Phytic acid, chemistry and applications*, E. Graf (ed.), Pilatus Press; Minneapolis, MN, EE.UU (1986)). El fitato comprende un 1 a 3% de todos los frutos secos, cereales, legumbres, semillas oleaginosas, esporas y polen. Las sales complejas del ácido fítico se denominan fitina. El ácido fítico se considera un factor antinutritivo puesto que forma quelatos con minerales como calcio, cinc, magnesio, hierro y también puede reaccionar con proteínas, reduciendo de ese modo la biodisponibilidad de las proteínas y de los minerales importantes desde el punto de vista nutritivo.

30 El fósforo del fitato pasa a través del aparato digestivo de los animales monogástricos y se excreta en el estiércol. Aunque se produce algo de hidrólisis del fitato en el colon, el fósforo inorgánico liberado de este modo no tiene valor nutritivo puesto que el fósforo inorgánico se absorbe sólo en el intestino delgado. En consecuencia, una cantidad significativa del fósforo importante desde el punto de vista nutritivo no es utilizada por los animales monogástricos, a pesar de su presencia en los alimentos.

35 La excreción de fósforo del fitato en el estiércol tiene consecuencias adicionales. La producción pecuaria intensiva ha aumentado enormemente durante las últimas décadas. Por consiguiente, la cantidad de estiércol producido ha aumentado correspondientemente y ha causado problemas ambientales en diversas partes del mundo. Esto se debe, en parte, a la acumulación de fosfato del estiércol en las aguas superficiales lo que ha provocado eutroficación.

40 Las enzimas producidas por microorganismos, que catalizan la conversión del fitato a inositol y fósforo inorgánico son ampliamente conocidas como fitasas. Los microorganismos que producen fitasas comprenden bacterias como *Bacillus subtilis* (V.K. Paver y V.J. Jagannathan (1982) *J. Bacteriol.* **151**, 1102) y *Pseudomonas* (D.J. Cosgrove (1970) *Austral. J. Biol. Sci.* **23**, 1207); levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (N.R. Nayini y P. Markakis (1984) *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* **17**, 24); y hongos como *Aspergillus terreus* (K. Yamada, Y. Minoda y S. Yamamoto (1986) *Agric. Biol. Chem.* **32**, 1275). Se sabe que otras varias especies de *Aspergillus* producen fitasa, de las cuales, se ha determinado que la fitasa producida por *Aspergillus ficuum* posee uno de los más altos niveles de actividad específica, y que también tiene mejor termoestabilidad que las fitasas producidas por otros microorganismos (van Gorcom *et al.* (1991) Solicitud de Patente Europea 89202436.5, Publicación N°. 0 420 358, presentada el 27 de septiembre de 1989).

50 Las fitasas también están endógenamente presentes en muchas especies vegetales (consulte Loewus, F.A. (1990) en: *Plant Biology* vol. 9: "Inositol metabolism in plants" (eds. D.J. Morré, W.F. Boss, F.A. Loewus) 13). Gellatly, K.S. y Lefebvre, D.D. ((1990) *Plant Physiology* (supplement), **93**, abstract 562) mencionan el aislamiento y la caracterización de un clon de ADNc de fitasa obtenido de tubérculos de papa. Gibson, D.M. *et al.* y Christen, A.A. *et al.* ((1988) *J. Cell Biochem.*, **12C**, abstracts L407 y L402, respectivamente) mencionan la síntesis de fitasa endógena durante la germinación de semillas de soja. Sin embargo, las fitasas vegetales se producen normalmente en cantidades insuficientes para su aplicación en procesos industriales, por sí mismas.

60 La idea de agregar fitasa microbiana a los piensos de los animales monogástricos ha sido previamente descrita (Ware, J.H., Bluff, L. y Shieh, T.R. (1967) U.S. Patent N°. 3,297,548; Nelson, T.S., Shieh, T.R., Wodzinski, R.J. y Ware, J.H. (1971) *J. Nutrition* **101**, 1289). Hasta la fecha, sin embargo, la aplicación de esta idea no ha sido comercialmente factible, debido al elevado costo de producción de las enzimas microbianas (Y.W. Han (1989) *Animal Feed Sci. and Technol.* **24**, 345). Por razones económicas, todavía se sigue agregando fósforo inorgánico a los piensos de los animales monogástricos.

65 Asimismo las fitasas han encontrado otros usos industriales. Un ejemplo de tales utilidades es un proceso industrial para la producción de almidón a partir de cereales como maíz y trigo. Los productos de desecho que comprenden p. ej., piensos de gluten de maíz provenientes de un proceso de molienda húmeda como ese, se venden como alimentos para animales. Durante el proceso de maceración se puede complementar con fitasa. Las condiciones ($T \approx 50^{\circ}\text{C}$ y pH

= 5,5) son ideales para las fitasas fúngicas (consulte p. ej. Solicitud de patente europea 0 321 004 para Alko Ltd.). De manera ventajosa, los piensos derivados de los productos de desecho de este proceso contienen fosfato en lugar de fitato.

5 También se ha concebido que las fitasas se pueden utilizar en el procesamiento de la soja (consulte *Finase*TM *Enzymes by Alko*, un folleto informativo del producto publicado por Alko Ltd., Rajamäki, Finlandia). La harina de soja contiene altos niveles del factor antinutritivo fitato que torna esta fuente de proteínas inadecuada para la aplicación en alimentos para bebés y piensos para peces, terneros y otros no rumiantes. El aumento enzimático de esta valiosa fuente de proteínas mejora el valor nutritivo y comercial de este material.

10

Se ha propuesto la posibilidad de usar plantas transgénicas como un sistema de producción de proteínas valiosas. Los ejemplos hasta la fecha son la producción de interferón en tabaco (Goodman, R.M., Knauf, V.C., Houck, C.M. y Comai, L. (1987) PCT/WO 87/00865), encefalinas en tabaco, *Brassica napus* y *Arabidopsis thaliana* (Vandekerckhove, J., Van Damme, J., Van Lijsebettens, M., Botterman, J., DeBlock, M., DeClerq, A., Leemans, J., Van Montagu, M. y Krebbers, E. (1989) *Bio/Technol.* 7, 929), anticuerpos en tabaco (Hiatt, A., Cafferkey, R. y Boedish, K. (1990) *Nature* 342, 76) y albúmina sérica humana en tabaco y papa (Sijmons, P.C., Dekker, B.M.M., Schrammeijer, B., Verwoerd, T.C., van den Elzen, P.J.M. y Hoekema, A. (1990) *Bio/Technol.* 8, 217).

15

En la práctica, la transformación de un número creciente de especies vegetales, especialmente las especies dicotiledóneas (por ejemplo, tabaco, papa, tomate, Petunia, Brassica), se ha vuelto un procedimiento de rutina para los trabajadores con experiencia en el tema (Klee, H., Horsch, R. y Rogers, S. (1987) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38, 467; Gasser C.S. y Fraley, R.T. (1989) *Science* 244, 1293). Las estrategias para la expresión de genes extraños en las plantas se han vuelto muy arraigadas (Gasser y Fraley, *supra*). Se han identificado secuencias reguladoras de genes de plantas que se usan para la construcción de genes híbridos que pueden ser expresados funcionalmente en plantas y células de plantas.

20

Para la introducción de construcciones de genes en plantas, se dispone de varias tecnologías, como transformación con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*. Usando esta estrategia, se han explotado una amplia variedad de tejidos de plantas, dependiendo la elección en gran parte de la especie vegetal y de su susceptibilidad al cultivo tisular. Son ejemplos exitosos la transformación de protoplastos, microesporas o polen y explantes como hojas, tallos, raíces, hipocotilos y cotilos. Además, se usan métodos para la introducción directa de ADN en protoplastos y células o tejidos vegetales como microinyección, electroporación, bombardeo de partículas y captación directa de ADN (Gasser y Fraley, *supra*).

30

Se pueden producir proteínas en plantas usando una diversidad de sistemas de expresión. Por ejemplo, el uso de un promotor constitutivo como el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Guilley, H., Dudley, R.K., Jonard, G., Balazs, E. y Richards, K.E. (1982) *Cell* 30, 763) dará lugar a la acumulación de la proteína expresada en todos los órganos de la planta transgénica. Alternativamente, se puede hacer uso de promotores provenientes de genes que codifican proteínas que se expresan de manera muy específica en un tejido y en una etapa (Higgins, T.J.V., (1984) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 191; Shotwell, M.A. y Larkins, B.A. (1989) En: *The biochemistry of plants* Vol. 15 (Academic Press, San Diego: Stumpf, P.K. y Conn, E.E., eds.), 297), es decir, los genes se expresan sólo en el tejido diana y únicamente durante la etapa deseada del desarrollo.

35

40

Se apreciará que un procedimiento económico para la producción de fitasa será significativamente beneficioso para, entre otras cosas, la industria de los piensos. Un método para producir una fitasa más económica sería el uso de técnicas de ingeniería genética para producir plantas transgénicas u órganos de plantas transgénicas capaces de expresar fitasa la que a su vez se puede agregar después como tal, por ejemplo, a alimentos para animales o piensos para el consumo directo de los animales. Alternativamente, la fitasa expresada en estas plantas transgénicas u órganos de plantas transgénicas podría extraerse y si se desea, purificarse para la aplicación deseada.

50

Resumen de la invención

La presente invención prevé la expresión de fitasa microbiana en plantas transgénicas u órganos de plantas transgénicas y métodos para la producción de dichas plantas. Esto se logra a través de la introducción en la planta de un constructo de expresión que comprende una secuencia de ADN de origen microbiano que codifica una proteína que tiene actividad de fitasa.

55

Los constructos de expresión de ADN proporcionados por la presente invención para la transformación de las plantas están bajo el control de secuencias reguladoras que son capaces de dirigir la expresión de la fitasa. Estas secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias capaces de dirigir la transcripción en las plantas, o bien constitutivamente o de manera específica en una etapa y/o un tejido, dependiendo del uso de la planta o de las partes de ésta.

60

Las plantas transgénicas y los órganos de plantas transgénicas proporcionados por la presente invención se pueden aplicar a una diversidad de procesos industriales directamente, p. ej. en alimentos para animales o piensos o alternativamente se puede extraer la fitasa expresada y si se desea, purificarla antes de su aplicación.

65

Descripción breve de las figuras

Figura 1. Estrategia para la clonación del ADNc de la fitasa.

5 Figura 2. Secuencia nucleotídica de la región traducida del fragmento de ADNc de la fitasa y de la secuencia derivada de aminoácidos de la proteína fitasa; el inicio de la proteína fitasa madura se indica como la posición +1.

Figura 3. Vector binario pMOG23.

10 Figura 4. Oligonucleótidos bicatenarios usados en clonación.

Figure 5. Plásmido pMOG29. Plásmido pUC18 que contiene un casete de expresión para la expresión constitutiva en plantas y una secuencia que codifica un péptido señal del tabaco.

15 Figura 6. Efectos del agregado de semillas molidas que contienen fitasa sobre la liberación de fósforo inorgánico del fitato.

Figura 7. Relación dosis-respuesta de la fitasa de *Aspergillus* en un modelo de digestión *in vitro*.

20 Figura 8. Relación dosis-respuesta de la fitasa de *Aspergillus* y de la fitasa contenida en la semilla de tabaco en un modelo de digestión *in vitro*.

Descripción detallada de la invención

25 De acuerdo con la presente invención, se obtienen plantas transgénicas u órganos de plantas transgénicas en las cuales se produce fitasa microbiana. Esto se logra a través de la introducción en la planta de un constructo de expresión que comprende una secuencia de ADN de origen microbiano que codifica una proteína que tiene actividad de fitasa.

30 La presente invención proporciona constructos de expresión de ADN para la transformación estable de plantas con un gen de origen microbiano que codifica una fitasa. Estos constructos comprenden una secuencia de ADN que codifica una fitasa que está funcionalmente ligada a secuencias reguladoras que son capaces de dirigir la expresión de la fitasa. Estas secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias capaces de dirigir la transcripción en plantas, o bien constitutivamente o de manera específica en una etapa y/o un tejido, dependiendo del uso de la planta o partes de ésta.

35 Los constructos de expresión proporcionados por la presente invención se pueden insertar en un vector, preferentemente un plásmido, utilizado en la transformación mediada por bacterias de la planta huésped seleccionada. Preferentemente el constructo de expresión se integra después en el genoma de la planta huésped.

40 Dentro del contexto de la presente invención, el término fitasa abarca una familia de enzimas que catalizan reacciones que implican la liberación de fósforo inorgánico de diversos fosfatos de mioinositol. Se comprende que esto abarca todas las proteínas que tienen actividad de fitasa.

45 La secuencia de ADN que codifica la fitasa se puede obtener de una diversidad de fuentes microbianas como los hongos filamentosos *Aspergillus*. Las secuencias de ADN que más se prefieren se obtienen de *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* y *Aspergillus nidulans*.

50 La clonación de un gen o de un ADNc que codifican una proteína fitasa se puede lograr usando varios métodos. Un método es mediante purificación de la proteína fitasa, posterior determinación de la secuencia de aminoácidos N-terminal y de varias secuencias internas y clasificación de una biblioteca genómica o de ADNc del organismo que produce la fitasa, usando sondas de oligonucleótidos basadas en las secuencias de aminoácidos.

55 Si se conoce al menos una secuencia parcial del gen, esta información se puede usar para clonar el ADNc correspondiente usando, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (*PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, (1989) H.A. Ehrlich, ed., Stockton Press, Nueva York).

Será evidente a los técnicos con experiencia en el tema que se puede usar el gen clonado de la fitasa descrito anteriormente en experimentos de hibridación heteróloga, dirigidos al aislamiento de genes que codifican fitasa de otros microorganismos.

60 En otro aspecto, el gen clonado de la fitasa descrito antes se puede usar como material de partida para la construcción de fitasas de "segunda generación". Las fitasas de "segunda generación" son fitasas, alteradas por técnicas de mutagénesis (p. ej. mutagénesis sitio-dirigida), que tienen propiedades que difieren de las de las fitasas de tipo salvaje o de las fitasas recombinantes como las producidas por la presente invención. Por ejemplo, la temperatura o el pH óptimos, la actividad específica o la afinidad por el sustrato se pueden alterar para que sean más adecuados para la aplicación en un proceso definido.

65 El aislamiento del ADNc que codifica la fitasa permite la construcción de constructos de expresión capaces de dirigir la producción de fitasa en la planta huésped seleccionada mediante la aplicación de técnicas de ingeniería

genética como el intercambio de elementos reguladores como p. ej. promotores, señales secretoras, o combinaciones de éstos.

5 La fitasa se puede producir constitutivamente en las plantas transgénicas durante todas las etapas del desarrollo. Dependiendo del uso de la planta o de los órganos de la planta, las enzimas se pueden expresar de manera específica en una etapa, por ejemplo durante la formación del tubérculo o el desarrollo del fruto. También, dependiendo del uso, las enzimas se pueden expresar específicamente en un tejido, por ejemplo en los órganos de las plantas como el fruto, los tubérculos, las hojas o las semillas.

10 Las plantas transgénicas, como se definen en el contexto de la presente invención incluyen plantas (así como partes y células de dichas plantas) y su progenie, que hayan sido genéticamente modificadas utilizando técnicas de ingeniería genética para causar o aumentar la producción de una fitasa en la planta o el órgano de la planta deseados.

15 En el contexto de la presente invención, la frase “una cantidad aumentada de fitasa” se refiere específicamente a una cantidad estadísticamente significativa de tejido de la planta que, en promedio, contenga una mayor cantidad estadísticamente significativa de fitasa en comparación con la cantidad promedio de enzima fitasa encontrada en una cantidad igual de tejido de planta sin modificar.

20 Dentro del contexto de la presente invención, las plantas que se pueden seleccionar incluyen, pero no están limitadas a los cultivos productores de flores comestibles como coliflor (*Brassica oleracea*), alcachofa (*Cynara scolymus*), frutos como manzana (*Malus*, p. ej., *domesticus*), plátano (*Musa*, p. ej., *acuminata*), bayas (como la grosella, *Ribes*, p. ej., *rubrum*), cerezas (como la cereza dulce, *Prunus*, p. ej., *avium*), pepino (*Cucumis*, p. ej., *sativus*), uva (*Vitis*, p. ej., *vinifera*), limón (*Citrus limon*), melón (*Cucumis melo*), frutos secos como nuez (*Juglans*, p. ej., *regia*; maní, *Arachis hypogaeae*), naranja (*Citrus*, p. ej., *maxima*), durazno (*Prunus*, p. ej., *persica*) pera (*Pyra*, p. ej., *communis*), ciruela (*Prunus*, p. ej., *domestica*), frutilla (*Fragaria*, p. ej., *moschata*), tomate (*Lycopersicon*, p. ej., *esculentum*), hojas, como alfalfa (*Medicago*, p. ej., *sativa*), repollo (p. ej., *Brassica oleracea*), endivia (*Cichorium*, p. ej., *endivia*), puerro (*Allium*, p. ej., *porrum*), lechuga (*Lactuca*, p. ej., *sativa*), espinaca (*Spinacia* p. ej., *oleraceae*), tabaco (*Nicotiana*, p. ej., *tabacum*), raíces, como arrurruz (*Maranta*, p. ej., *arundinacea*), remolacha (*Beta*, p. ej., *vulgaris*), zanahoria (*Daucus*, p. ej., *carota*), yuca (*Manihot*, p. ej. *esculenta*), nabo (*Brassica*, p. ej., *rapa*), rábano (*Raphanus*, p. ej., *sativus*), ñame (*Dioscorea*, p. ej., *esculenta*), batata (*Ipomoea batatas*) y semillas, como frijol (*Phaseolus*, p. ej., *vulgaris*), guisante (*Pisum*, p. ej., *sativum*) soja (*Glycin*, p. ej., *max*) trigo (*Triticum*, p. ej., *aestivum*), cebada (*Hordeum*, p. ej., *vulgare*), maíz (*Zea*, p. ej., *mays*), arroz (*Oryza*, p. ej., *sativa*), colza (*Brassica napus*), mijo (*Panicum* L.), girasol (*Helianthus annuus*), avena (*Avena sativa*), tubérculos, como col (*Brassica*. p. ej., *oleraceae*), papa (*Solanum*, p. ej., *tuberosum*) y similares.

35 La elección de la especie de la planta se determina principalmente por el uso al que está destinada la planta o las partes de ésta y la susceptibilidad de las especies de la planta a la transformación.

40 Se dispone de varias técnicas para la introducción del constructo de expresión que contiene la secuencia de ADN que codifica la fitasa en las plantas diana. Dichas técnicas incluyen pero no exclusivamente la transformación de protoplastos usando el método de calcio/polietilenglicol, la electroporación y microinyección o el bombardeo de partículas (recubrimiento) (Potrykus, I. (1990) *Bio/Technol.* 8, 535).

45 Además de estos métodos denominados de transformación directa de ADN, existe una amplia disponibilidad de sistemas de transformación que involucran vectores, como los vectores víricos (p. ej., el virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y vectores bacterianos (p. ej., del género *Agrobacterium*) (Potrykus, *supra*). Después de la selección y/o clasificación, los protoplastos, células o partes de plantas que hayan sido transformados se pueden regenerar en plantas enteras, usando métodos conocidos por los técnicos con experiencia en el tema (Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. y Fraley, R.T. (1985) *Science* 227, 1229). La elección de las técnicas de transformación y/o regeneración no es crítica para esta invención.

50 Para las dicotiledóneas, una materialización preferida de la presente invención usa el principio del sistema de vector binario (Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. y Schilperoort, R.A. (1983) *Nature* 303, 179; Schilperoort, R.A., Hoekema, A. y Hooykaas, P.J.J. (1984) Solicitud de patente europea N° 0 120 516) en el cual se usan cepas de *Agrobacterium* que contienen un plásmido *vir* con los genes de virulencia y un plásmido compatible que contiene el constructo del gen que se va a transferir. Este vector se puede replicar tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium*, y se deriva del vector binario Bin19 (Bevan, M. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 8711) el que es alterado en detalles que no son importantes para esta invención. Los vectores binarios como los que se usan en este ejemplo contienen entre las secuencias de los bordes izquierdo y derecho del ADN-T, un gen NPTII idéntico que codifica la resistencia a la kanamicina (Bevan, *supra*) y un sitio de clonación múltiple para clonarse en los constructos génicos necesarios.

65 La transformación y regeneración de los cultivos de monocotiledóneas no es un procedimiento estándar. Sin embargo, el progreso científico reciente muestra que en principio las monocotiledóneas son susceptibles de transformación y que se pueden regenerar plantas transgénicas fértiles a partir de las células transformadas. El desarrollo de sistemas de cultivos tisulares reproducibles para estos cultivos vegetales, junto con métodos potentes para la introducción del material genético en las células de las plantas ha facilitado la transformación. Actualmente los métodos de elección para la transformación de monocotiledóneas son el bombardeo de microproyectiles de los explantes o las células en suspensión y la captación directa de ADN o la electroporación de los protoplastos. Por ejemplo, se han obtenido con

éxito plantas de arroz transgénico usando el gen bacteriano *hph*, que codifica la resistencia a la higromicina, como un marcador de selección. El gen se introdujo por electroporación (Shimamoto, K., Terada, R., Izawa, T. y Fujimoto, H. (1989) *Nature* 338, 274). Se obtuvieron plantas de maíz transgénico introduciendo el gen *bar* del *Streptomyces hygroscopicus*, que codifica la fosfinotricin-acetiltransferasa (una enzima que inactiva el herbicida fosfinotricina), en células embrionarias de un cultivo en suspensión de maíz por bombardeo de micropartículas (Gordon-Kamm, W.J., Spencer, T.M., Mangano, M.L., Adams, T.R., Daines, R.J., Start, W.G., O'Brien, J.V., Chambers S.A., Adams Jr., W.R., Willets, N.G., Rice, T.B., Mackey, C.J., Krueger, R.W., Kausch, A.P. y Lemaux, P.G. (1990) *The Plant Cell* 2, 603). Se ha informado de la introducción de material genético en protoplastos de aleuronas de otros cultivos de monocotiledóneas como el trigo y la cebada (Lee, B., Murdoch, K., Topping, J., Kreis, M. y Jones, M.G.K. (1989). *Plant. Mol. Biol.* 13, 21). Se han regenerado plantas de trigo a partir de cultivos embriogénicos en suspensión seleccionando sólo tejidos de callos envejecidos compactos y embriogénicos nodulares para el establecimiento de cultivos embriogénicos en suspensión (Vasil, V., Redway, F. y Vasil, I.K. (1990) *Bio/Technol.* 8, 429). La combinación con sistemas de transformación para estos cultivos permite la aplicación de la presente invención a las monocotiledóneas. Estos métodos también se pueden aplicar para la transformación y la regeneración de dicotiledóneas.

El constructo de expresión de la fitasa incluye detalles como la transcripción del gen por las polimerasas de la planta, la traducción del ARNm, etc. que son conocidos por las personas con experiencia en las técnicas de ingeniería genética. Sólo los detalles pertinentes para la comprensión adecuada de esta invención se analizan más adelante.

Las secuencias reguladoras que se sabe o se encuentra que causan expresión de la fitasa se pueden usar en la presente invención. La elección de las secuencias reguladoras utilizadas depende del cultivo diana y/o del órgano diana de interés. Dichas secuencias reguladoras se pueden obtener de las plantas o de los virus de las plantas o se pueden sintetizar químicamente. Dichas secuencias reguladoras son promotores activos en la dirección de la transcripción en las plantas, ya sea constitutivamente o de manera específica en una etapa y/o un tejido, dependiendo del uso de la planta o de las partes de ésta. Estos promotores incluyen, pero no están limitados a los promotores que muestran expresión constitutiva, como el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Guilley *et al.* (1982) *Cell* 30, 763), los de expresión específica en la hoja, como el promotor del gen de la subunidad pequeña de ribulosa bisfosfato carboxilasa (Coruzzi *et al.*, (1984) *EMBO J.* 3, 1671), los de expresión específica en las raíces, como el promotor del gen de la glutamina sintasa (Tingey *et al.*, (1987) *EMBO J.*, 6, 3565), los de expresión específica en la semilla, como el promotor de la cruciferina A de *Brassica napus* (Ryan *et al.*, (1989) *Nucl. Acids Res.* 17, 3584), los de expresión específica en los tubérculos, como el promotor patatin clase-I de la papa (Rocha-Sosa *et al.*, (1989) *EMBO J.* 8, 23; Wenzler *et al.*, (1989) *Plant Mol. Biol.* 12, 41) o los de expresión específica en el fruto, como el promotor de la poligalacturonasa (PG) del tomate (Bird *et al.*, (1988) *Plant Mol. Biol.* 11, 651).

Otras secuencias reguladoras como las secuencias terminadoras y las señales de poliadenilación incluyen cualquier secuencia de ese tipo que funcione como tal en las plantas, la elección de la cual está dentro de las capacidades del técnico experimentado. Un ejemplo de tales secuencias es la región de flanqueo 3' del gen de la nopalina sintasa (nos) de *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan, M., *supra*).

Las secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias potenciadoras, como la que se encuentra en el promotor 35S del CaMV, y secuencias estabilizadoras del ARNm como la secuencia líder del virus del mosaico de la alfalfa (AIMV) ARN4 (Brederode, F.T., Koper-Zwarthoff, E.C. y Bol, J.F. (1980) *Nucl. Acids Res.* 8, 2213) o cualquier otra secuencia que funcione de manera similar.

La fitasa se debe expresar en un ambiente que permita la estabilidad de la proteína expresada. La elección de compartimientos celulares, como el citosol, el retículo endoplasmático, la vacuola, el cuerpo proteico o el espacio periplásmico se puede usar en la presente invención para crear dicho ambiente estable, dependiendo de los parámetros biofísicos de la fitasa. Dichos parámetros incluyen, pero no están limitados al pH óptimo, la sensibilidad a las proteasas o la sensibilidad a la molaridad del compartimiento preferido.

Para obtener expresión en el citoplasma de la célula, la enzima expresada no debe contener un péptido que sea una señal secretora ni otra secuencia diana. Para la expresión en los cloroplastos y la mitocondria la enzima expresada debe contener un péptido específico denominado péptido de tránsito para la importación en estos organelos. Las secuencias diana que pueden unirse a la enzima de interés para lograr esto son conocidas (Smeekens *et al.*, (1990) *T.I.B.S.* 15, p.73; van den Broeck *et al.*, (1985) *Nature* 313, 358; Schreier *et al.*, (1985) *EMBO J.* 4, 25). Si se desea la actividad de la enzima en las vacuolas debe estar presente un péptido que sea una señal secretora, así como una secuencia diana específica que dirija la enzima a esas vacuolas (Tague *et al.*, (1988) *Plant Phys.* 86, 506). Lo mismo se cumple para los cuerpos proteicos en las semillas. La secuencia de ADN que codifica la enzima de interés debe modificarse de modo que la enzima pueda ejercer su acción en la localización celular deseada.

Para lograr la expresión extracelular de la fitasa, el constructo de expresión de la presente invención utiliza una secuencia señal secretora. Aunque se prefieren las secuencias señal que son homólogas (nativas) a las especies de la planta huésped, también se pueden usar secuencias señal heterólogas, es decir las que se originan en otras especies de la planta o las de origen microbiano. Dichas secuencias señal son conocidas por los técnicos con experiencia en el tema. Secuencias señal adecuadas que se pueden utilizar en este contexto se divulgan en Walter, P. y Blobel, G. (1986) *Biochem. Soc. Symp.*, 47, 183; Von Heijne, G. (1986) *J. Mol. Biol.*, 189, 239; y Sijmons, P.C., Dekker, B.M.M., Schrammeijer, B., Verwoerd, T.C., van den Elzen, P.J.M. y Hoekema, A. (1990) *Bio/Technol.*, 8, 217.

ES 2 267 092 T3

Todas las partes pertinentes de los constructos de ADN (promotores, secuencias reguladoras, secretoras, estabilizadoras, de acceso o de terminación) de la presente invención se pueden modificar, si se desea, para afectar a sus características de control usando métodos conocidos por los técnicos con experiencia en el tema.

5 Se señala que las plantas que contienen fitasa obtenida mediante la presente invención se pueden usar para obtener plantas u órganos de plantas con aún mayores niveles de fitasa. Por ejemplo, sería posible obtener dichas plantas u órganos de plantas utilizando técnicas de variación somoclonal o mediante técnicas de cruzamiento. Dichas técnicas son bien conocidas por los técnicos con experiencia en el tema.

10 En una materialización de la presente invención, se prepara un ADNc de cadena doble que codifica la fitasa a partir de un ARNm aislado de *Aspergillus ficuum*. El constructo de ADN se coloca bajo el control de las secuencias reguladoras del gen que codifica la proteína de reserva 12S crucifera de *Brassica napus*. Posteriormente el constructo se subclona en un vector binario como pMOG23 (en *E. coli* K-12 cepa DH5 α , depositada en Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, Países Bajos el 29 de enero de 1990 con el número de acceso CBS 102.90). Este vector se introduce en *Agrobacterium tumefaciens* que contiene un plásmido Ti desarmado. Las células bacterianas que
15 contienen este constructo se cocultivan con tejidos de plantas de tabaco o del género *Brassica*, y las células de la planta transformada se seleccionan mediante medios nutritivos que contienen antibióticos y se las induce a regenerarse en plantas diferenciadas en dichos medios. Las plantas resultantes producirán semillas que contengan y expresen el constructo de ADN.

20 En otra materialización de la presente invención, el constructo de ADN que codifica la fitasa se coloca bajo el control de secuencias reguladoras del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Posteriormente el constructo se subclona en un vector binario. Este vector se introduce después en *Agrobacterium tumefaciens* que contiene un plásmido Ti desarmado. Las células bacterianas que contienen este constructo se cocultivan con tejidos
25 de plantas de tabaco o del género *Brassica*, y las células de la planta transformada se seleccionan mediante medios nutritivos que contienen antibióticos y se las induce a regenerarse en plantas diferenciadas en dichos medios. Las plantas resultantes contendrán y expresarán el constructo de ADN constitutivamente.

30 La actividad de fitasa se puede medir mediante varios ensayos, cuya elección no es crítica para la presente invención. Por ejemplo, la actividad de la enzima fitasa del tejido de la planta transgénica se puede determinar con un ensayo de ELISA, con una inmunotransferencia de tipo Western o por ensayos enzimáticos directos utilizando técnicas colorimétricas o ensayos en gel nativo.

35 La planta u órgano de la planta que contiene fitasa, producida según la presente invención se puede usar en una diversidad de procesos industriales que requieren la acción de una fitasa.

Las plantas u órganos de la planta que contienen fitasa producida de acuerdo con la presente invención se pueden usar en procesos industriales que requieren la acción de una fitasa. Ejemplos de tales aplicaciones son el uso en aditivos de piensos para no rumiantes, en el procesamiento de la soja, o en la producción de inositol o fosfatos de inositol a
40 partir de fitato. Otros procesos industriales que usan sustratos que contienen fitato como la industria del almidón y en las industrias de la fermentación, como la industria cervecera. La formación de quelatos de los iones metálicos por el fitato puede hacer que estos minerales no estén disponibles para los microorganismos de producción. La hidrólisis enzimática del fitato evita estos problemas.

45 La fitasa producida en plantas también se puede usar en un proceso de macerado de maíz o de granos de sorgo. El tejido de la planta se puede moler antes de agregar al maíz en maceración. La fitasa liberada del tejido de la planta puede actuar sobre la fitina, que está presente en muchas preparaciones de maíz. La degradación de la fitina en el maíz en maceración es beneficiosa para el valor comercial agregado del agua de macerado del maíz, que se usa como alimento para animales o como un nutriente en las fermentaciones microbianas. Además, la degradación de la fitina
50 puede evitar los problemas relacionados con la acumulación de depósitos en los filtros, las tuberías, los recipientes del reactor, etc. durante la concentración, el transporte y el almacenamiento del agua de macerado del maíz (Vaara, T. *et al.* (1989) Solicitud de patente europea 0 321 004). La acción de la fitasa también puede acelerar el proceso de maceración y los procesos de separación implicados en la molienda húmeda del maíz.

55 Las plantas u órganos de plantas se pueden usar directamente, es decir sin procesamiento adicional, o se pueden procesar primero por medios convencionales como la molienda hasta la consistencia deseada antes de la aplicación.

Alternativamente, se puede extraer la fitasa de la planta o del órgano de la planta y, si se desea, purificarla antes de usarla mediante métodos de extracción y técnicas de purificación convencionales.

60 La producción de fitasas en plantas que son compatibles con la aplicación concebida proporciona comodidad y reducirá los costos de producción en comparación con los de las fitasas microbianas para permitir su aplicación económica, por ejemplo, en piensos, lo que finalmente derivará en una relación precio/rendimiento *in vivo* competitiva con la del fosfato inorgánico. Como beneficio adicional, el contenido de fósforo del estiércol se reducirá considerablemente.
65

Se apreciará que la aplicación de fitasas, disponibles a un precio competitivo con el fosfato inorgánico, aumentará los grados de libertad para la industria de los piensos del compuesto para producir piensos de gran calidad. Por ejemplo,

ES 2 267 092 T3

cuando los piensos se complementan con fitasa, se puede omitir el agregado de fosfato inorgánico y se puede aumentar el contenido de diversos materiales que contengan fitato.

Los ejemplos siguientes se proporcionan para dar a los técnicos con experiencia corriente en el tema una divulgación y descripción completas de cómo hacer y utilizar la invención y no fueron concebidos para limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud en lo que se refiere a los números utilizados (p. ej., cantidades, temperatura, pH, etc.) pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, la temperatura está en grados centígrados y la presión es la presión atmosférica o próxima a ella.

Ejemplo 1

Aislamiento de ARN poli A⁺ de Aspergillus ficuum

Se cultiva *A. ficuum* cepa NRRL 3135 en un medio que contiene 22,72 g/l de harina de maíz (amilasa tratada a pH 7 a 85°C durante 15 minutos), 9,36 g/l de glucosa; 2,9 g/l de KNO₃; 0,142 g/l de KCl; 0,142 g/l de MgSO₄·7H₂O y 56,8 mg/l de FeSO₄·7H₂O. Después de 6 días se recoge el micelio.

El micelio seco (0,5 g) se congela con nitrógeno líquido y se muele. Posteriormente el material se homogeneiza con un Ultra turrax (a velocidad máxima, 1 minuto) a 0°C en LiCl 3 M y urea 6 M y se mantiene durante toda la noche a 4°C según se describe en Auffray y Rougeon (1980) Eur. J. Biochem. 107, 303. Se obtiene todo el ARN celular después de la centrifugación a 16.000 X g, seguida de dos extracciones sucesivas con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, (50:48:2). El ARN se precipita con etanol y se vuelve a disolver en 1 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) y 0,5% de SDS. Para la selección de poli A⁺ se calienta toda la muestra de ARN durante 5 minutos a 65°C, se ajusta a NaCl 0,5 M y posteriormente se aplica a una columna de oligo(dT)-celulosa. Después de varios lavados con una solución que contiene Tris 10 mM de pH 7,0, EDTA 1 mM y NaCl 0,1 mM, el ARN poli A⁺ se recoge mediante elución con Tris 10 mM de pH 7,0 y EDTA 1 mM.

Ejemplo 2

Preparación y clonación de un ADNc que codifica fitasa

Para la síntesis de la primera hebra del ADNc se disuelven 5 µg de ARN poli A⁺, aislado de acuerdo con el Ejemplo 1, en 16,5 µl de H₂O y se agregan los componentes siguientes: 2,5 µl de RNasin (30 U/µl), 10 µl de un tampón que contiene Tris-HCl 50 mM de pH 7,6; MgCl₂ 6 mM y KCl 40 mM; 2 µl de KCl 1 M; 5 µl de DTT 0,1 M; 0,5 µl de oligo (dT)₁₂₋₁₈ (2,5 mg/ml); 5 µl de dNTP-mix 8 mM; 5 µl de BSA (1 mg/ml) y 2,5 µl de transcriptasa inversa Moloney MLV (200 U/µl). La mezcla se incuba durante 30 minutos a 37°C y la reacción se detiene por agregado de 10 µl de EDTA 0,2 M y 50 µl de H₂O. Se realiza una extracción usando 110 µl de cloroformo y después de una centrifugación durante 5 minutos se agregan al sobrenadante NH₄Ac 5 M y 440 µl de etanol absoluto (-20°C). Se hace una precipitación en hielo seco/solución de etanol durante 30 minutos. Después de una centrifugación (10 minutos a 0°C) el sedimento en forma de pastilla de ADNc/ARNm se lava con etanol al 70% enfriado con hielo. El sedimento en forma de pastilla se seca y se disuelve en 20 µl de H₂O.

El aislamiento del ADNc que codifica la fitasa se realiza con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en dos fragmentos. Los dos fragmentos se combinan, usando un sitio *Bam*HI dentro del gen para crear un ADNc de cadena completa. La estrategia para la clonación del ADNc de la fitasa se muestra en la Figura 1.

La secuenciación parcial del gen de la fitasa (Van Gorcom *et al.*, *supra*), revela la presencia de un sitio *Bam*HI aproximadamente a 800 pares de bases del codón de iniciación. La secuencia de nucleótidos alrededor de este sitio *Bam*HI, así como la secuencia de nucleótidos que precede al codón de inicio y la secuencia de nucleótidos después del codón de parada del gen de la fitasa se usan para diseñar oligonucleótidos para la PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa se realiza de acuerdo al proveedor de la *Ta9*-polimerasa (Cetus) usando 1,5 µl de la solución que contiene el producto de reacción de la síntesis de la primera hebra y 0,5 µg de cada uno de los oligonucleótidos. La amplificación se lleva a cabo en un amplificador de ADN de Perkin Elmer/Cetus. Después de 25 ciclos de 2 minutos a 94°C, 2 minutos a 55°C, y 3 minutos a 72°C la mezcla de reacción se desproteíniza mediante extracciones posteriores con fenol y cloroformo. El ADN se precipita, se vuelve a disolver en un tampón que contiene Tris 10 mM de pH 7 y EDTA 0,1 mM y posteriormente se digiere con enzimas de restricción adecuadas.

Para la amplificación del fragmento que codifica la parte N-terminal de la proteína, se usan los dos oligonucleótidos siguientes:

Oligo 1: 5' GGGTAGAATTCAAAAATGGGCGTCTCTGCTGTTCTA 3'

Oligo 2: 5' AGTGACGAATTCGTGCTGGTGGAGATGGTGTCTG 3'

ES 2 267 092 T3

El fragmento amplificado se digiere con *EcoRI* y se clona en el sitio *EcoRI* de pTZ18R (comprado a Pharmacia). El mapeo del sitio de restricción y la secuenciación de los nucleótidos demuestra la autenticidad del fragmento. El plásmido resultante se denomina pGB925.

5 Para la amplificación del segundo fragmento, se usan los dos oligonucleótidos siguientes:

Oligo 3: 5' GAGCACCAAGCTGAAGGATCC 3'

Oligo 4: 5' AAAGTGCAGGCGTTGAGTGTGATTGTTTAAAGGG 3'

10

El fragmento amplificado se digiere con *BamHI* y *PstI* y posteriormente se clona en pTZ18R, el que fue digerido con *BamHI* y *PstI*. El mapeo del sitio de restricción y la secuenciación de nucleótidos muestran que se aísla el fragmento correcto. El plásmido resultante se denomina pGB926.

15

A fin de aislar un ADNc de cadena completa, pGB925 se digiere con *EcoRI* y *BamHI* y se aísla el fragmento que contiene el ADN que codifica la fitasa. Este fragmento se clona en el plásmido pGB926, que fue digerido con *EcoRI* y *BamHI*, dando lugar al plásmido pGB927. El plásmido pGB927 contiene un ADNc de cadena completa que codifica la fitasa, con un tamaño aproximado de 1,8 kbp. La secuencia de la región de ADNc que codifica la proteína fitasa y la secuencia derivada de aminoácidos de la proteína fitasa se ilustran en la Figura 2.

20

Ejemplo 3

Construcción del vector binario pMOG23

25

En este ejemplo se describe la construcción del vector binario pMOG23 (en *E. coli* K-12 cepa DH5 α , depositada en Centraal Bureau voor Schimmel-cultures el 29 de enero de 1990, con el número de acceso CBS 102.90).

30

El vector binario pMOG23 (Figura 2) es un derivado del vector Bin19 (Bevan, M., *supra*). Para obtener pMOG23, el vector Bin19 se modifica de una manera que no es esencial para la presente invención, usando técnicas que son familiares a las personas con experiencia en biología molecular.

35

Primero, las posiciones del borde izquierdo (LB) y del borde derecho (RB) se intercambian con relación al gen de neomicina fosfotransferasa II (gen NPTII). En segundo lugar, la orientación del gen NPTII se revierte produciendo la transcripción en dirección al borde izquierdo. Finalmente, el poliligador de Bin19 se reemplaza con un poliligador con los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción siguientes: *EcoRI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *SacI*, *XhoI*, y *HindIII*.

Ejemplo 4

40

Clonación del ADNc de la fitasa de Aspergillus ficuum en un constructo de expresión para la expresión constitutiva en plantas

45

El gen de la fitasa de *Aspergillus ficuum* se adapta y se clona en un constructo de expresión para la expresión constitutiva secuencia abajo del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. El constructo de expresión también contiene la información de codificación para una secuencia peptídica señal de origen vegetal.

50

El ADNc de la fitasa se clona en el constructo de expresión como el presente en el plásmido pMOG29 (descrito en a)). Posteriormente todo el constructo se introduce en el vector binario pMOG23 y se transfiere a la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*.

a) *Construcción del vector de expresión pMOG29*

55

El constructo de expresión de ROK1 (Baulcombe *et al.*, (1986) *Nature* **321**, 446) se clona como un fragmento *EcoRI/HindIII* en pUC18. Este constructo contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) en un fragmento *EcoRI/BamHI* y el terminador de la transcripción de la nopalina sintasa (nos) en un fragmento *BamHI/HindIII*. El fragmento del promotor consta de la secuencia desde -800 a +1 del promotor 35S del CaMV. La posición +1, que está incluida, es el sitio de iniciación de la transcripción (Guilley *et al.*, *supra*). Se suprime la secuencia que está secuencia arriba del sitio *NcoI* en la posición -512 y este sitio se convierte en un sitio *EcoRI*. Esto se hace cortando el constructo de expresión presente en pUC18 con *NcoI*, completando los extremos monocatenarios con polimerasa Klenow y ligadura de un ligador *EcoRI*. El plásmido resultante se corta con *EcoRI*, dando lugar a la supresión del fragmento *EcoRI* que porta las secuencias del promotor 35S secuencia arriba del sitio original *NcoI*. El fragmento *BamHI/HindIII*, que contiene el terminador nos se reemplaza con un fragmento de ADN sintético (oligonucleótido bicatenario A, Figura 4) que contiene la secuencia líder del ARN4 del virus del mosaico de la alfalfa (AIMV)(Brederode *et al.*, *supra*). Esto se hace por corte con *BamHI*, seguido de corte con *HindIII* y ligadura del fragmento de ADN sintético. El sitio *BamHI* y tres nucleótidos secuencia arriba se suprimen mediante mutagénesis sitio dirigida. En el plásmido resultante, se reintroduce el fragmento *BamHI/HindIII* que contiene el terminador nos. El gen que codifica la β -glucuronidasa (que se origina del plásmido pRAJ 275; Jefferson, R.A. (1987) *Plant Mol. Biol. Reporter* **5**, 387) se ligó como un fragmento *NcoI/BamHI*, dando lugar al plásmido pMOG14. De la bibliografía se

ES 2 267 092 T3

sabe que la duplicación de la secuencia entre -343 y -90 aumenta la actividad del promotor 35S (Kay, R., Chan, A., Dayly, M. y McPherson, J. (1987) Science 236, 1299). Para obtener un fragmento promotor con una secuencia doble, denominada secuencia potenciadora, se llevan a cabo los pasos siguientes, conocidos por los técnicos con experiencia en el tema. Se aísla el fragmento potenciador del plásmido pMOG14 en un fragmento *AccI/EcoRI* y posteriormente se vuelve a clonar con polimerasa Klenow. El fragmento obtenido se introduce en pMOG14 cortado con *EcoRI* y se vuelve a clonar, de manera que el borde entre los sitios romos *EcoRI* y *AccI* generen un nuevo sitio *EcoRI*. El plásmido resultante (pMOG18) contiene el promotor 35S con una secuencia potenciadora doble, la secuencia líder del ARN4 de AIMV y el terminador nos en un constructo de expresión que todavía está presente en un fragmento *EcoRI/HindIII*. Finalmente, el fragmento *NcoI/BamHI* que codifica la β -glucuronidasa se reemplaza con el fragmento de ADN sintético B (Figura 4), derivado del ADNc PROB12 (Cornelissen, B.J.C., Hooft van Huijsduijnen, R.A.M. y Bol, J.F. (1986) Nature 321, 531). Este fragmento B codifica la secuencia peptídica señal PR-S de la proteína PR del tabaco Samsun NN. Se crea un sitio *SphI* en el péptido señal que codifica la secuencia de ADN cambiando un nucleótido. Este cambio no altera la secuencia de aminoácidos del péptido señal codificado PR-S. El plásmido resultante se llama pMOG29 (Figura 5).

15 b) Clonación del gen de la fitasa de *Aspergillus ficuum* en el vector binario

El oligonucleótido bicatenario C (Figura 4) se clona en el plásmido pMOG29, se digiere con *SphI* y *BamHI*, dando como resultado el plásmido pMOG407. El oligonucleótido bicatenario contiene la información de codificación para los 2 aminoácidos finales del péptido señal de PR-S, seguidos de los 6 primeros aminoácidos de la fitasa madura.

El plásmido pGB927, que contiene la cadena completa del ADNc de la fitasa, se digiere con *XhoI* (parcialmente) y *PstI*. El fragmento *XhoI/PstI* que comprende las secuencias de ADN que codifican la fitasa madura desde el aminoácido 6 en adelante se clona en el plásmido pMOG407 linealizado con *XhoI* y *PstI*, dando como resultado el plásmido pMOG417. El constructo entero, conteniendo el gen de la fitasa quimérica, se inserta como un fragmento *EcoRI/HindIII* en el vector binario pMOG23 linealizado con *EcoRI* y *HindIII*. El plásmido binario resultante pMOG413 se moviliza, en un apareamiento triparental con *E. coli* K-12 cepa RK2013 (que contiene el plásmido pRK2013) (Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. y Helinski, D.R. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77, 7347), en *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 que contiene un plásmido con los genes de virulencia necesarios para la transferencia del T-ADN a la planta.

30 Ejemplo 5

Expresión transitoria del gen de la fitasa quimérica en protoplastos de tabaco

35 Los protoplastos de tabaco se transforman con ADN plasmídico que lleva el gen de la fitasa quimérica bajo la regulación del promotor constitutivo 35S del CaMV. Después de 72 horas los protoplastos tratados se analizan para determinar la expresión transitoria del gen de la fitasa introducido, usando el ensayo de actividad de fitasa.

Los protoplastos se preparan a partir de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1) cultivadas axénicamente de 40 1-2 meses de edad. Todo el procedimiento es descrito por Rodenburg, K.W., DeGroot, M.J.A., Schilperoort, R.A. y Hooymaas, P.J.J. ((1989) Plant Mol. Biol. 13, 711) Para la transformación se electroporan una cantidad de protoplastos igual a 5×10^5 con 40 μ g de ADN del plásmido pMOG417). Después de la electroporación los protoplastos se vuelven a suspender en 3 ml de medio K3G. Para el ensayo de actividad de fitasa los protoplastos se sedimentan y los 3 ml del sobrenadante se dializan durante toda la noche contra un exceso de agua. El dializado se liofiliza y se vuelve a suspender en 300 μ l de acetato de sodio 25 mM de pH 5,5. Después el ensayo se lleva a cabo como se describe en detalle en el Ejemplo 10, con la única excepción de que en vez de utilizar el tampón de glicina HCl 250 mM de pH 2,5, se usa el tampón de acetato de sodio 25 mM de pH 5,5.

En estos experimentos, una unidad de fitasa (PTU) se define como 1 μ mol de fosfato liberado de una solución de fitato de sodio 1,5 mM por minuto a 37°C a pH 5,5.

No se detecta actividad en los protoplastos sin tratar. Los protoplastos electroporados con plásmido pMOG417 muestran una actividad de 0,26 PTU por mg de proteína en el sobrenadante.

55 Ejemplo 6

Expresión estable de un gen de fitasa quimérica en plantas de tabaco bajo el control del promotor 35S del CaMV

El tabaco se transforma por cocultivo de tejido de la planta con *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 que contiene el vector binario pMOG413 con el gen de la fitasa quimérica regulado por el promotor 35S del CaMV. La transformación del tabaco (*Nicotiana tabacum* SRI) se lleva a cabo usando el cocultivo de discos de hoja de acuerdo con el procedimiento de Horsch *et al.*, *supra*. Las plantas transgénicas se regeneran de brotes que crecen en medio selectivo (100 mg/l) kanamicina, se arraigan y se transfieren al suelo. Las plantas jóvenes se analizan para determinar actividad de NPTII (resistencia a la kanamicina), se las cultiva hasta la madurez y se les permite auto polinizarse y se replantan.

65 Para el ensayo de actividad de fitasa de las hojas de las plantas transgénicas, se toma un segmento de aproximadamente 5 mm de diámetro de una hoja joven de cada una de las plantas, y se homogeneizan en 300 μ l de tampón de acetato de sodio 25 mM de pH 5,5. Posteriormente, se llevan a cabo los ensayos de fitasa como se describe para los

ES 2 267 092 T3

ensayos transitorios. En 32 plantas de tabaco independientemente transformadas que se analizaron, se observó una actividad máxima de 2 PTU/mg de proteína soluble total en los extractos. Esto corresponde al 1,7% del total de proteína soluble. En las semillas de estas plantas de tabaco transformadas, se observó un nivel de expresión de fitasa máximo de 0,4% de la proteína de semilla soluble total. No se pudo detectar actividad de fitasa en las plantas sin transformar.

Dos líneas de plantas transgénicas, 413.25 y 413.32, se seleccionaron sobre la base de sus altos niveles de expresión de fitasa.

Ejemplo 7

Clonación del ADNc de la fitasa de *Aspergillus ficuum* en un constructo de expresión específico de semilla

Se construye un constructo de expresión de modo de obtener esa expresión específica en la semilla, usando secuencias del gen de la proteína de reserva 12S cruciferina de *Brassica napus* (cruA; Ryan *et al.*, *supra*). Estas secuencias se pueden reemplazar con las de genes similares específicos de semilla para alcanzar la misma meta que es el objetivo de esta invención.

El ADNc de la fitasa se clona en el constructo de expresión. Finalmente, todo el constructo se introduce en *Agrobacterium tumefaciens*, la que se usa para la transformación.

Para todas las transformaciones en *E. coli* de este ejemplo, se usa la *E. coli* K12 cepa DH5 α .

a) Construcción del constructo de expresión

Para la construcción del constructo de expresión para la expresión específica en la semilla, se sintetizan las secuencias promotora y terminadora del gen de cruciferina A (cruA) de *Brassica napus* cv. Jet Neuf usando tecnología de PCR con ADN genómico aislado (Mettler, I.J. (1987) Plant Mol. Biol. Rep. 5, 346) como molde. Este gen muestra expresión específica en la semilla y se determinaron sus secuencias de codificación y de flanqueo (Ryan *et al.*, *supra*).

Se sintetizan dos conjuntos de oligonucleótidos. Uno para permitir la amplificación de la región de flanqueo 5' de cruA y parte de la secuencia que codifica el péptido señal como un fragmento *EcoRI/NcoI*:

5' GTTCGGAATTCGGGTTCCGG 3' y 5' AACTGTTGAGCTGTAGAGCC 3'.

El otro para la amplificación de la secuencia de flanqueo 3' como un fragmento *BglIII/HindIII*:

5' CTTAAGATCTTACCCAGTGA 3' y 5' CGGAGAAGCTTGCATCTCGT 3'.

Los oligonucleótidos están diseñados para contener sitios de restricción adecuados en sus extremidades para permitir la unión directa del constructo de expresión después de la digestión de los fragmentos con las enzimas de restricción.

El fragmento 5' del gen cruA, que incluye 54 nucleótidos de la secuencia que codifica el péptido señal se clona en el vector pMOG445 (oligonucleótido bicatenario E (Figura 4) clonado en el vector pUC18, linealizado con *SstI* y *EcoRI*), cortado con *EcoRI* y *NcoI*, dando como resultado el vector pMOG424. El oligonucleótido bicatenario sintético D (Figura 4), que comprende los 5 tripletes de codificación finales para la secuencia señal de cruciferina de *Brassica napus*, la secuencia que codifica los aminoácidos 1-6 de la fitasa madura y un sitio de clonación múltiple, se clona en el vector pMOG424 cortado con *NcoI* y *HindIII*. El vector resultante se llama pMOG425. El fragmento PCR 3' de cruA se clona como un fragmento *BglIII/HindIII* en pMOG425 digerido con *BglIII* y *HindIII*, dando como resultado pMOG426.

b) Clonación del gen de la fitasa de *Aspergillus ficuum* en el vector binario

El plásmido pGB927, que contiene la secuencia de codificación entera para la fitasa de *Aspergillus ficuum*, se digiere con *XhoI* (parcialmente) y con *PstI*. El fragmento *XhoI/PstI* que comprende las secuencias de ADN que codifican la fitasa madura desde el aminoácido 6 en adelante se clona en el vector pMOG426, cortado con *XhoI* y *PstI*. Del vector resultante pMOG428, el constructo entero, que contiene el gen de la fitasa quimérica, se inserta como un fragmento *EcoRI/HindIII* en el vector binario pMOG23 linealizado con *EcoRI* y *HindIII*. El vector binario resultante pMOG429 se moviliza, en un apareamiento triparental con *E. coli* K-12 cepa RK2013 (que contiene el plásmido pRK2013) (Ditta *et al.*, *supra*), en *Agrobacterium* cepa LBA4404 (Hoekema *et al.*, 1983, *supra*) que contiene un plásmido con los genes de virulencia necesarios para la transferencia del ADN-T a la planta.

Ejemplo 8

Expresión estable de fitasa específica de semilla en las semillas de tabaco bajo el control de un promotor de cruciferina

La cepa LBA4404 de *Agrobacterium*, que contiene el vector binario pMOG429 con el ADNc de la fitasa bajo el control del promotor de cruciferina, se usa para experimentos de transformación. La transformación de tabaco (*Nico-*

ES 2 267 092 T3

5 *tiana tabacum* SR1) se lleva a cabo usando el cocultivo de discos de hoja de acuerdo con el procedimiento de Horsch *et al., supra*. Las plantas transgénicas se regeneran a partir de brotes que crecen en un medio selectivo (100 mg/l de kanamicina). Las plantas jóvenes se analizan para determinar actividad de NPTII (resistencia a la kanamicina), se las cultiva hasta la madurez y se les permite auto polinizarse y se replantan. Se juntan las semillas de cada transformante y parte de la muestra de semillas se analiza para detectar la presencia de fitasa. De los clones con los mayores niveles de expresión, en comparación con las semillas de control sin transformar, se germinan las semillas restantes en kanamicina (200 mg/L). De los datos sobre las semillas S2 resultantes, las semillas homocigotas para NPTII (en consecuencia también para fitasa) se seleccionan y se usan para la propagación masiva de plantas capaces de producir las mayores cantidades de fitasa. Estas pueden usarse después, por ejemplo, para experimentos de digestión.

10 Para determinar la actividad de fitasa encontrada en semillas transgénicas, se toman y homogeneizan aproximadamente 50 mg de semillas con un pistilo en un mortero enfriado con hielo en 1 ml de tampón de acetato de sodio 25 mM de pH 5,5. Después de la centrifugación, el sobrenadante se analiza según se describe para los ensayos transitorios. En 55 plantas de tabaco transformadas independientemente, se observó un nivel de expresión de fitasa máximo de 0,15% de la de proteína de semilla soluble total. No se detectó actividad de fitasa en los tallos, las raíces ni las hojas de las plantas transgénicas. No se pudo detectar actividad de fitasa en las plantas sin transformar.

Ejemplo 9

20 *Transformación de colza*

En este ejemplo, se describe la transformación de colza por cocultivo del tejido de la planta con *Agrobacterium tumefaciens*, que contiene un vector binario con el gen de la fitasa quimérica. Las plantas transgénicas se pueden seleccionar por la resistencia a los antibióticos. Las plantas transgénicas se pueden analizar para detectar la actividad de fitasa. Se pueden analizar más a fondo los expresores fuertes y usar en los experimentos adicionales.

30 Se moviliza el mismo constructo de la fitasa quimérica en un vector binario (pMOG429) en *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404, de manera similar a la descrita en el Ejemplo 7. Esta cepa se puede usar para transformar colza (*Brassica napus* cv. Westar). Para este objetivo, segmentos de tallos esterilizados en la superficie tomados de plantas de 5 a 6 semanas, justo antes de florecer, se preacondicionan durante 24 h en medio MS (Fry *et al.* (1987) Plant Cell Reports 6, 321) con 1 mg/l de BAP y después se cocultivan durante 48 h con *Agrobacterium* en placas recién preparadas con el mismo medio. Las plántulas transgénicas se regeneraron de brotes cultivados en medio selectivo (500 mg/l de carbenicilina, 40 mg/l de paromomicina) y se analizaron posteriormente según se describe en el Ejemplo 8 para el tabaco.

35 Ejemplo 10

Ensayo de actividad de fitasa

40 Se molió una cantidad de material de planta transgénica que en total contenía aproximadamente 0,25 PTU. (PTU = unidades de fitasa. Una unidad de actividad de fitasa se define como la cantidad de enzima que libera fósforo inorgánico de fitato de sodio 1,5 mM a una velocidad de 1 μ mol/min a 37°C y a pH 2,5). Alternativamente, esta cantidad de fitasa se puede extraer del material de la planta.

45 Se incubó el material molido de la planta en un volumen total de 50 ml de un tampón de glicina/HCl 250 mM de pH 2,5 que contiene 0,86 g de fitato de sodio.11 H₂O. Aunque la fitasa del *Aspergillus* se expresa a un pH óptimo de 2,5 así como a 5,5; el pH menor se elige para excluir la actividad de fitasa de la planta.

50 La mezcla resultante se incubó durante 15 y 60 minutos a 37°C. La reacción se detiene mediante agregado de 5 ml del incubado en 5 ml de TCA al 10% (ácido tricloroacético). Posteriormente, se agregan 10 ml de reactivo indicador (3,66 g de FeSO₂.7H₂O en 50 ml de solución de molibdato de amonio (2,5 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O y 8 ml de H₂SO₄ conc., diluido hasta 250 ml con agua desmineralizada) a la solución detenida de enzima. La intensidad del colorante azul se mide espectrofotométricamente a 700 nm.

55 El contenido de fosfato inorgánico presente a T=0 sirve de blanco.

Las mediciones son indicativas de la cantidad de fosfato liberado con relación a una curva de calibración del fosfato en el rango de 0-1 mM.

60 Ejemplo 11

Incubación de material molido de planta de Nicotiana tabacum con piensos

65 En un experimento típico, 0,25 g de harina de soja extraída con solvente se incuban con una cantidad de material molido de planta de *Nicotiana tabacum* que contiene aproximadamente 0,25 PTU, como se describe antes, excepto por el agregado de fitato de sodio. En este caso, el agente de incubación agregado consiste en una mezcla de 410 ml de tampón y 90 ml de agua desmineralizada.

ES 2 267 092 T3

La liberación de fosfato del fitato de la harina de soja extraída con solvente se ilustra en la Figura 6. Sin agregado del material molido de la planta, no se observa actividad.

5 En un experimento prácticamente idéntico, se obtienen resultados similares usando los piensos de gluten de maíz como sustrato. Los resultados usando semillas transgénicas se muestran en la Figura 6.

No se observa actividad en ausencia de material molido de planta ni cuando se agrega material molido de plantas que no contienen actividad de fitasa.

10 Ejemplo 12

Pruebas in vitro de material de plantas transgénicas que contienen fitasa en condiciones que simulan el aparato digestivo de las aves de corral

15 Para evaluar la eficacia de la fitasa producida en material de plantas de tabaco transgénico, se determina la actividad de fitasa del *Aspergillus* en un modelo que simula las condiciones que se encuentran en el aparato digestivo de las aves de corral.

20 Primero se incubaba una muestra estándar de pienso para aves de corral a una relación de 1 g/15 ml de agua desmineralizada durante 60 minutos a 39°C para simular las condiciones en el buche de los animales. Posteriormente, se agregan 5 ml de una solución de pepsina (Merck: 5,28 g/l, pH 3,0 ajustado con HCl), el pH se ajusta con HCl a pH 3,0 y se continúa la incubación por otros 90 minutos a la misma temperatura para simular las condiciones del estómago.

25 Durante el período de incubación, se tomaron muestras para determinar la cantidad de fosfato liberado del fitato presente en el pienso.

La acción de la fitasa fúngica es evidente en la Figura 7. El aumento de la dosis de fitasa de 250 a 1.000 PTU/kg de pienso da como resultado una mayor liberación de fosfato de la muestra de pienso.

30 Cuando se agrega una muestra de material de planta de tabaco transgénico, o bien de semilla o bien de hoja, (líneas 413.25 y 413.32; después de molidas en un mortero), en lugar de la fitasa fúngica, se observa un aumento similar en la liberación de fosfato (Figura 8). También se analizó material de plantas de tabaco de control que no contenían fitasa. No se observó liberación de fosfato en comparación con el blanco de control.

35 La comparación de los resultados con 50 g de semillas de tabaco transgénico/kg de pienso con los obtenidos con 500 y 750 PTU/kg de pienso indica que 1 g de semilla de tabaco equivale aproximadamente a 12 PTU en este modelo de digestión avícola *in vitro*. Una comparación ilustrativa usando material de hoja indica que 1 g (peso fresco) de material de hoja de tabaco contiene aproximadamente 25 PTU.

40 Ejemplo 13

Pruebas en animales

45 Los ensayos se llevan a cabo con pollos parrilleros para mostrar la eficacia de la fitasa expresada en semillas de planta, así como la ausencia de cualquier efecto negativo de las semillas de tabaco sobre los resultados zootécnicos.

50 Se cosechan tanto la semilla de tabaco que expresa fitasa como la de tabaco de control. Las semillas se molieron en porciones de 100 g con un cedazo (Retch-mill ZM1) que tenía poros de 500 μm , teniendo cuidado de mantener las semillas enfriadas.

55 Pollitos parrilleros machos de un día de vida (Hybro) se alojan en dos hileras superpuestas de jaulas en batería (0,45 m²). La temperatura ambiente es de 32°C durante los dos primeros días y se disminuye en 4°C en la primera semana. Cada siguiente semana, la temperatura se disminuye en 2°C. Los pollitos parrilleros se crían en un régimen de una hora de luz y tres de oscuridad.

60 Las aves se vacunan contra la enfermedad de New Castle al día de vida usando la vacuna Clon 30. Durante los experimentos, los pollos parrilleros se alimentan con las dietas experimentales todo triturado y a voluntad. Durante los períodos experimentales se miden las relaciones crecimiento y pienso/ganancia. La disponibilidad aparente del fósforo total se mide en un período de tres días, durante el cual el consumo de alimento balanceado se mide como materia seca y la ingesta y la excreta se recaban cuantitativamente.

La disponibilidad aparente del fósforo se define como la diferencia entre la ingesta de fósforo y la excreción de fósforo con la excreta.

65

ES 2 267 092 T3

Se usan las dietas de control siguientes sin agregado de fitasa:

	Ca	P total	fitato P
Dietas	(%)	(%)	(%)
5 1	0,60	0,45	0,30
2	0,75	0,60	0,30
3	0,90	0,75	0,30

10 No se agrega fosfato para pienso a la dieta 1 (dieta basal). Se agregan calcio y fósforo de una mezcla de fosfato dicálcico y de fosfato monoamónico anhidros (relación 5:1) a las dietas 2 y 3. Todas las dietas experimentales se obtienen mediante agregados a la dieta basal (consulte la Tabla 1).

15 La dieta experimental 4 contiene fitasa microbiana a una concentración de 400 PTU/kg de pienso, preparada según describen Van Gorcom *et al.*, *supra*.

La dieta experimental 5 es como la dieta 4 pero con el agregado de semillas molidas de tabaco no transgénico a la mezcla de piensos para lograr una relación final de 3 kg/90 kg de pienso.

20 La dieta experimental 6 también es como la dieta 4 pero con el agregado de 3 kg de semillas molidas de tabaco transgénico (línea 413.25) a una mezcla de 90 kg de pienso para obtener una concentración final de 400 PTU/kg de pienso.

25 El experimento se lleva a cabo con 176 pollos parrilleros en 16 jaulas en batería (11 por jaula en batería) hasta los 24 días de vida. Los tratamientos (dietas) se repiten dos veces y son asignados aleatoriamente a las jaulas dentro de cada hilera superpuesta.

La disponibilidad de fósforo se mide desde los 21 a 24 días de edad.

30 Los resultados con respecto a la disponibilidad del fósforo y el crecimiento de los animales a los que se les suministraron las dietas 4, 5 y 6 mostraron cada uno el efecto positivo del agregado de fitasa (Tabla 2). Una comparación de las dietas 4, 5 y 6 también demuestra que la inclusión de las semillas de tabaco en los piensos es compatible con la acción de la fitasa microbiana en el aparato digestivo de los animales de granja como los pollos parrilleros y no muestra ningún efecto negativo sobre los resultados zootécnicos.

35 Mientras la presente invención se ha descrito con referencia a materializaciones específicas de ésta, los técnicos con experiencia en el tema deben comprender que se pueden hacer diversos cambios y que se pueden sustituir equivalentes sin apartarse del espíritu y el alcance verdaderos de la invención. Además, se pueden hacer muchas modificaciones para adaptar una situación, un material, una planta, una semilla, un proceso, un paso o pasos del proceso particulares al objeto, el espíritu y el alcance de la invención. Todas esas modificaciones están destinadas a estar incluidas en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 267 092 T3

TABLA 1

Composición de la dieta basal en los experimentos con pollos parrilleros

	Ingredientes (g/kg)	Contenido
5	Maíz amarillo	280,0
10	Sorgo (bajo en taninos)	200,0
	Harina de semilla de girasol (extr. Con solv.) 80,0	
15	Harina de poroto de soja (extr. Solv., 48,8 % de proteína) 350,0	
	Aceite de poroto de soja	58,5
20	Vitaminas*	
	5,0	
	Minerales*	15,0
25	Piedra caliza	1,0
	Metionina sint.	1,0
	Cr ₂ O ₃	0,5
		1.001,0
30	ME (MJ/kg)	
	13,1	
	Lisina	12,9
35	Metionina + cistina	9,1
	Calcio	6,0
	(6,0-6,6) **	
40	Fósforo total	4,5 (4,7-
	4,7) **	
	Fósforo fítico orgánico	3,0 (3,1-3,1) **

45 _____ * Cantidad suministrada por kg de
dieta: 12.000 UI de vitamina A; 2.000 UI de vitamina D₃;
5 UI de vitamina E; 1,5 mg de vitamina K₃; 1 mg de
50 tiamina; 5 mg de riboflavina; 1 mg de piridoxina; 30 mg
de ácido nicotínico; 7,5 mg de ácido D-pantoténico;
55 0,015 mg de vitamina B₁₂; 0,5 mg de ácido fólico; 350 mg
de cloruro de colina; 75 mg de etoxiquina; 9,5 g de
CaCO₃; 2,5 g de NaCl; 0,26 g de FeSO₄; 0,24 g de MnSO₄;
60 45 mg de CuSO₄; 60 mg de ZnSO₄; 105 mg de mezcla de KI.

** () Analizado para los experimentos 1 y 2 respectivamente.

65

Tabla 2
Efecto de la fitasa sobre la disponibilidad
aparente de P y Ca totales, el contenido de P en
el estiércol y el rendimiento de los pollos parrilleros

Dietas	Ca/P (g/kg)	Fitasa agregada (unidades/Kg)	Disponibilidad (%)		Cantidad de P en el estiércol (g) por kg de ingesta de pienso	Crecimiento 0-24 d (g)
			21-24 d	P Ca		
1	6/4,5	0	49,8	47,2	2,7	338
2	7,5/6	0	45,6	48,9	3,8	592
3	9/7,5	0	44,6	46,9	4,9	683
4	según 1	400	60,5	58,6	2,1	620
5	según 1	0	48,5	48,0	2,7	340
6	según 1	400	60,2	59,3	2,1	615

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un constructo de expresión recombinante, que se **caracteriza** porque dicho constructo de expresión recombinante comprende una secuencia de codificación de fitasa obtenida de una fuente microbiana funcionalmente ligada a las secuencias reguladoras 5' y 3' capaz de dirigir la expresión de dicha fitasa en una célula de una planta.
- 10 2. El constructo de expresión recombinante de la reivindicación 1, que se **caracteriza** porque la secuencia de codificación de la fitasa se obtiene de una fuente fúngica.
3. El constructo de expresión recombinante de la reivindicación 2, que se **caracteriza** porque la secuencia de codificación de la fitasa se obtiene del género *Aspergillus*.
- 15 4. El constructo de expresión recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se **caracteriza** porque la secuencia de codificación de una fitasa madura está funcionalmente ligada a una secuencia señal heteróloga a la proteína fitasa, funcionando dicha secuencia señal en una célula de una planta.
- 20 5. El constructo de expresión recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se **caracteriza** porque la secuencia reguladora 5' es un promotor constitutivo.
6. El constructo de expresión recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se **caracteriza** porque la secuencia reguladora 5' es un promotor específico de un tejido.
- 25 7. Un vector, que se **caracteriza** porque el vector comprende un constructo de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Una cepa bacteriana, que se **caracteriza** porque la cepa contiene un vector de acuerdo con la reivindicación 7.
- 30 9. Una célula de una planta transgénica, que se **caracteriza** porque la célula de la planta contiene un constructo de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
10. Una planta transgénica u órgano de una planta transgénica, que se **caracterizan** porque la célula de la planta contiene un constructo de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 35 11. Un método para la conversión de fitato a inositol y fosfato inorgánico, que se **caracteriza** porque una fitasa de una fuente microbiana contenida en la planta transgénica o el órgano de la planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 10 se aplica a un sustrato que contiene dicho fitato.
- 40 12. Un preparado alimentario para animales, que se **caracteriza** porque el preparado alimentario comprende la planta transgénica o el órgano de la planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 10.
13. Un método para promover el crecimiento de un animal, que se **caracteriza** porque dicho animal se alimenta con una dieta compuesta por un preparado alimentario de acuerdo con la reivindicación 12 en una cantidad eficaz para promover el crecimiento del animal que ingiere el preparado.
- 45 14. Un método para reducir el nivel de fitato en el estiércol de los animales, que se **caracteriza** porque un animal es alimentado con una dieta que está compuesta por un preparado alimentario de acuerdo con la reivindicación 12 en una cantidad eficaz para convertir el fitato contenido en dicha dieta en inositol y fosfato inorgánico.
- 50 15. El uso de una planta transgénica u órgano de planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 10 como un ingrediente en alimentos o piensos.

55

60

65

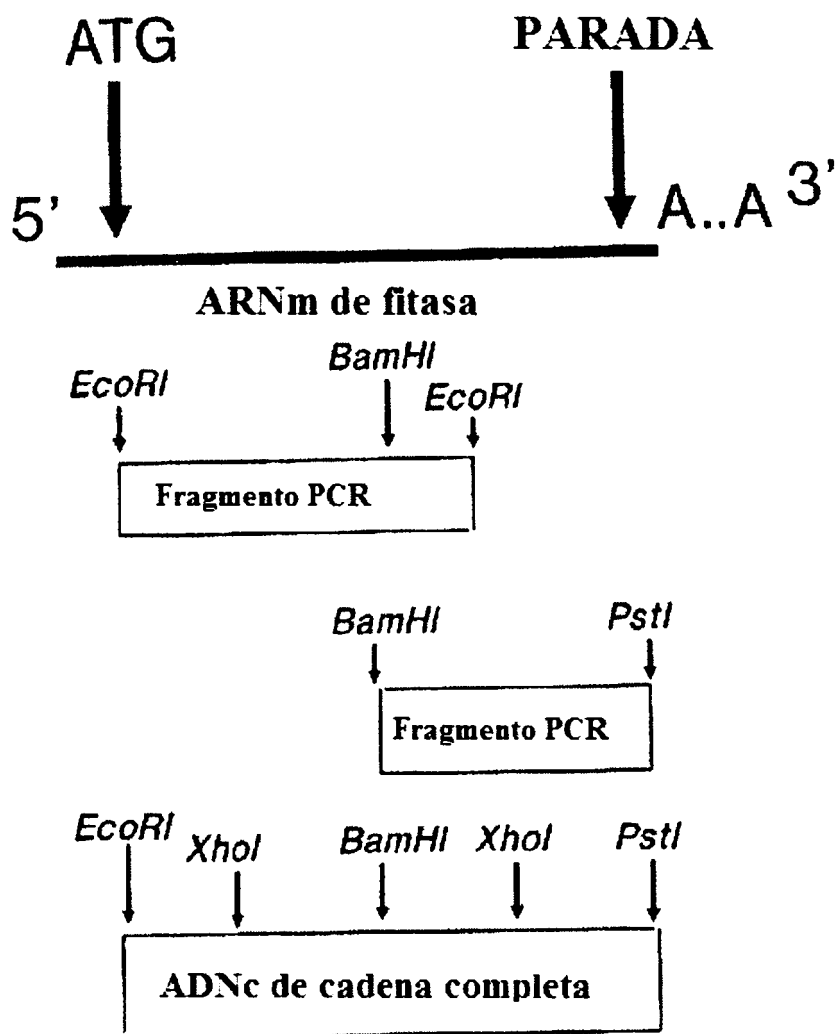


Figura 1

ES 2 267 092 T3

FIGURA 2 (hoja 1 de 2)

1 ATGGGGTCTCTGCTGTTCTACTTCTTGTATCTCTGCTGAGTCACTCCGGACTG
-23 M G V S A V L L P L Y L L S G V T S G L

61 CCACTCCCGCCCTCGAGAAATCAATCCAGTTCCGATACCGTCGATCAGGCGTATCAATGC
A V P A S R N Q S S C D T V D Q G Y Q C
-1 -1

121 TTCCTCCGAGACTTCGATCTTTGGGTCATACCCACCGTTCCTTCTCTCGCAACGAA
18 F S E T S H L W G Q Y A P F F S L A N E

181 TCGGTCACTCCCTGAGGTGCCCGCCGATGCAGAGTCACTTTCGCTCAGCTCCTCTCC
38 S V I S P E V P A G C R V T F A Q V L S

241 COTCATGGAGCCCGTATCCGACCGACTCCGAGGGCAAGAAATACTCCGCTCTCAITGAG
58 R H G A R Y P T D S K G K K Y S A L I E

301 GAGATCCAGCAGAACCCGACCACTTTGACCGAAATATCCCTTCTGAAAGACATACAAC
78 E I Q Q N A T T F D G K Y A F L K T Y N

361 TACAGCTTGGTCCAGATGACCTGACTCCCTTCGGAGAACAGGAGCTAATCAACTCCGGG
98 Y S L Q A D D L T P F C E Q E L V N S G

421 ATCAAGTCTACAGCCGTACGAATCCGCTCACAAGGAACATCCCTCCATTTCATCCGATCC
118 I K F Y Q R Y E S L T R N I V P F I R S

481 TCTGGCTCCAGCCCGGTGATCCCTCCGCCAAGAAATTCATCGAGGGCTTCCAGAGCACC
138 S G S S R V I A S G K K F I E G P Q S T

541 AAGCTGAAGATCCTCGTCCAGCCGCCCAATCGTCCGCCAAGATCCAGCGTGTGATT
158 K L R D P R A Q P Q Q S S P K I D V V I

601 TCCGAGCCAGCTCATCCAACAACACTCTCGACCCAGCCAGCTCCACTCTCTCGAAGAC
178 S E A S S S N N T L D P O T C T V F E D

661 AGCGAATTGGCCGATACCGTCCGAGCCAAATTCACCGCCACGTTGCTCCCTCCATTCTGT
198 S E L A D T V E A N F T A T F V P S I R

721 CAAAGTCTCCAGAACCCCTGTCCGCTGTGACTCTCACAGACACAGAAGTGAACCTACCTC
218 Q R L E N D L S G V T L T D T E V T Y L

781 ATCGACATGTGCTCCTTCGACACCATCTCCACCAGCACCGTCCGACCCAAGTGTCCCGC
238 M D M C S F D T I S T S T V D T R L S P

ES 2 267 092 T3

FIGURA 2 (HOJA 2 DE 2)

841 TTCGTGACCTGTTCACCCATGACGAATGATCAACTACGACTACCTCCAGTCCTTCAA
258 F C D L F T H D E W I N Y D Y L Q S L K

901 AAGTATTACGGCCATGGTCCAGTAACCCCTCGGCCCAACCCAGGCCGTCGGCTACGCT
278 K T Y G H G A C N P L G P T Q G V G Y A

961 AACGAGCTCATGCCCGTCTGACCCACTCCCTGTCCACGATGACACAGITCCAACCAC
298 N E L I A R L T H S P V H D D T S S N H

1021 ACTTTCGACTCGAGCCCGCTACCTTTCGGCTCAACTCTACTCTCTACCGGACTTTTCG
318 T L D S S P A T P P L N S T L Y A D F S

1081 CATGACAACGGCATCATCCATTCTCTTTCCTTTAGCTCTGTACAACGGCACTAAGCCG
338 H D N G I I S I L F A L G L Y N G T K P

1141 CTATCTACCACGACCGTCCGAGAAATCACCCAGACAGATGGATTCTCGTCTGCTTGGACG
358 L S T T T V E N I T Q T D G F S S A W T

1201 GTTCCGTTTCCTTCGGCTTTGTADGTCGAGATGATCCATGTCAGCGGGAGCAGGAGCCG
378 V P F A S R L Y V E M M Q C Q A E Q E P

1261 CTGGTCCGTGCTTTGGTTAATGATCGGTTGTCCCGCTGCATGGGTGTCGGTTGATGCT
398 L V R V L V N D R V V P L H G C P V D A

1321 TTGGGAGATGTAACCGGCATACCTTTCTGAGGGGCTTCACTTTGCTAGATCTGGGGT
418 L G R C T R D S F V R G L S F A R S G G

1381 GATTGGCCGAGTGTTTGCTTAG
438 D W A E C P A *

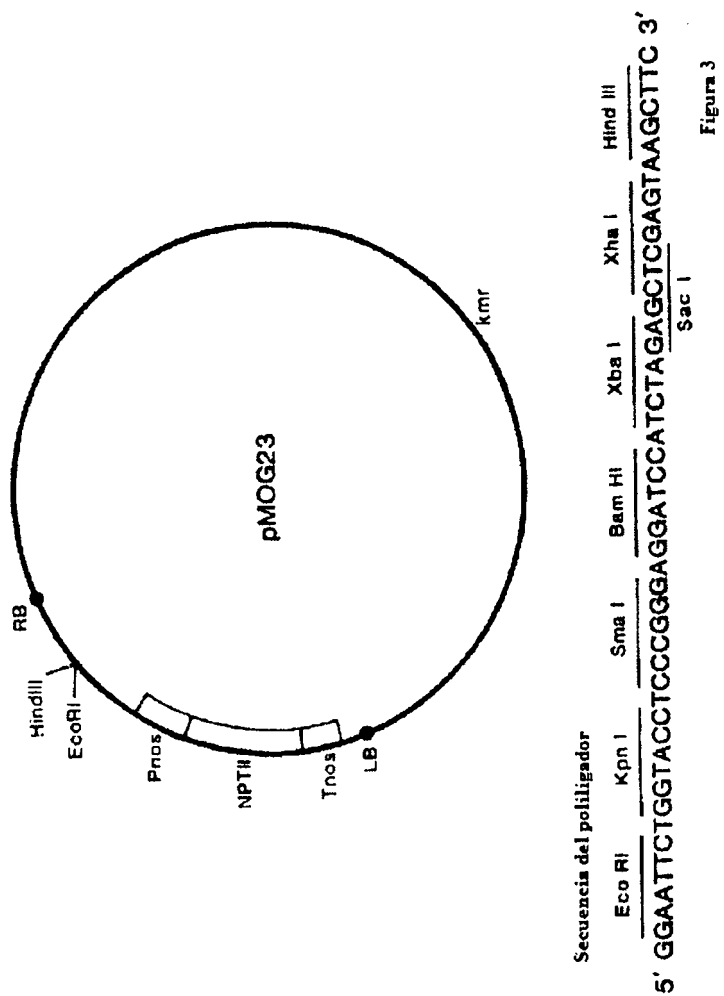


Figura 4 (hoja 1 de 2)

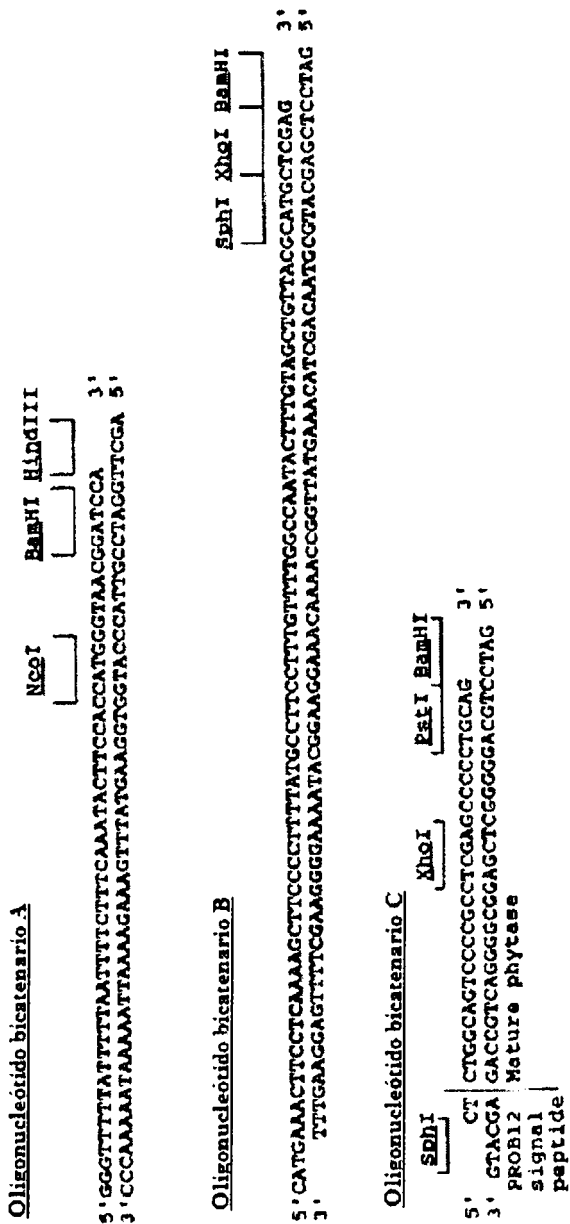


Figura 4 (hoja 2 de 2)

Oligonucleotido bicatenario D

<p><u>NCOI</u></p>	<p><u>XhoI</u></p>	<p><u>ECORV</u></p>	<p><u>BclI</u></p>	<p><u>HindIII</u></p>
<p>HisGlySerThrPala</p>	<p>LeuAlaValProAlaSer</p>			
<p>5' CATGGCTCTACAGCT</p>	<p>CTGGCAGTCCCCTCGAGGATTCCTGCAGATCTCCCA</p>			
<p>3' CGAGATGTCCA</p>	<p>GACCGTCAGGGGGCGAGCTCCTATAGCAGCTTAGAGGGGTTCGA</p>			
<p>crUA signal peptide</p>	<p>Matura phytase</p>			

Oligonucleotido bicatenario E

<p>5' AATTCAGATCTCCATGGATCGAGCT</p>	<p>3'</p>
<p>3' GTCAGAGGTACCTAGCTAC</p>	<p>5'</p>

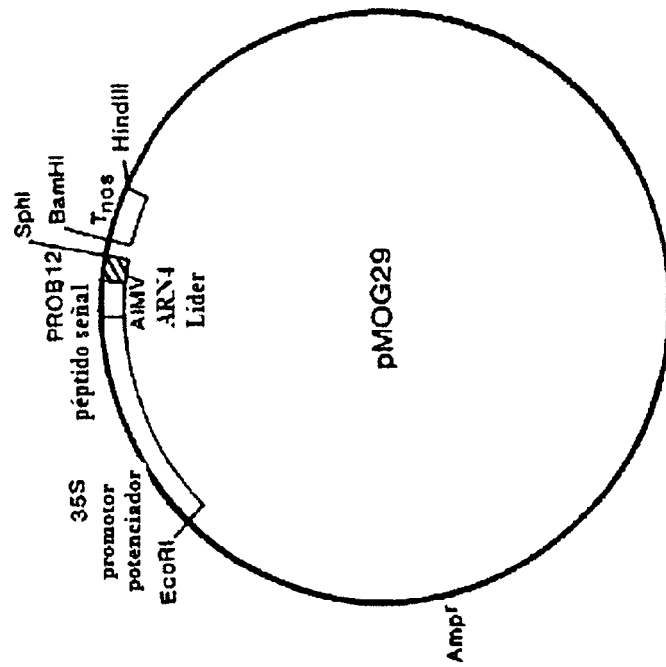


Figura 5

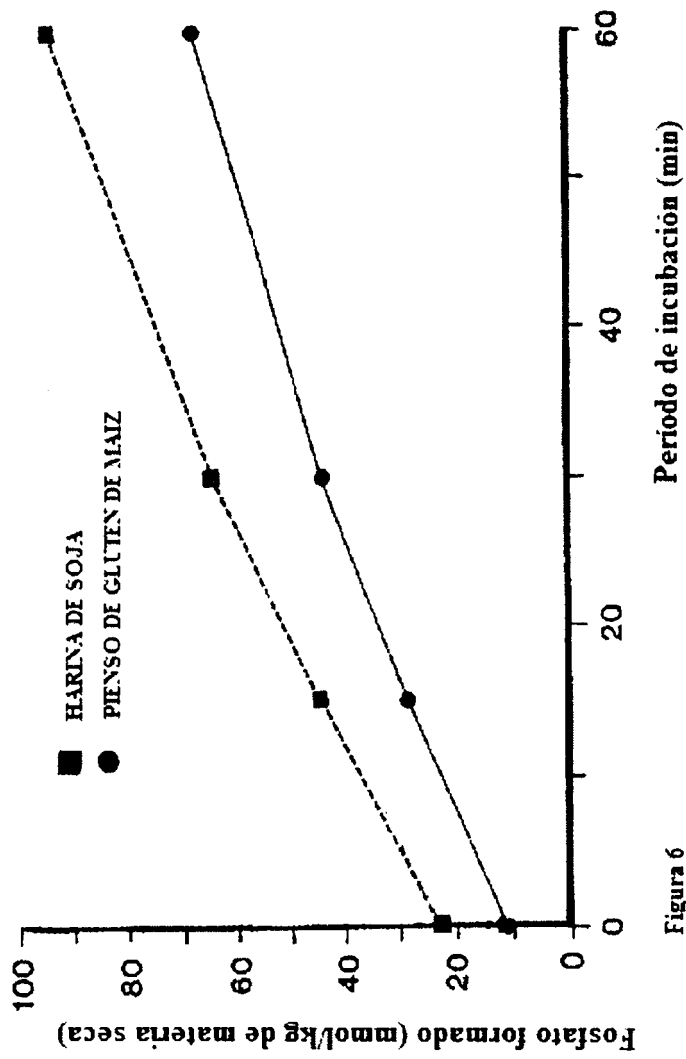


Figura 6

MODELO DE DIGESTIBILIDAD IN VITRO
 RELACION DOSIS-RESPUESTA FITASA DE ASPERGILLUS

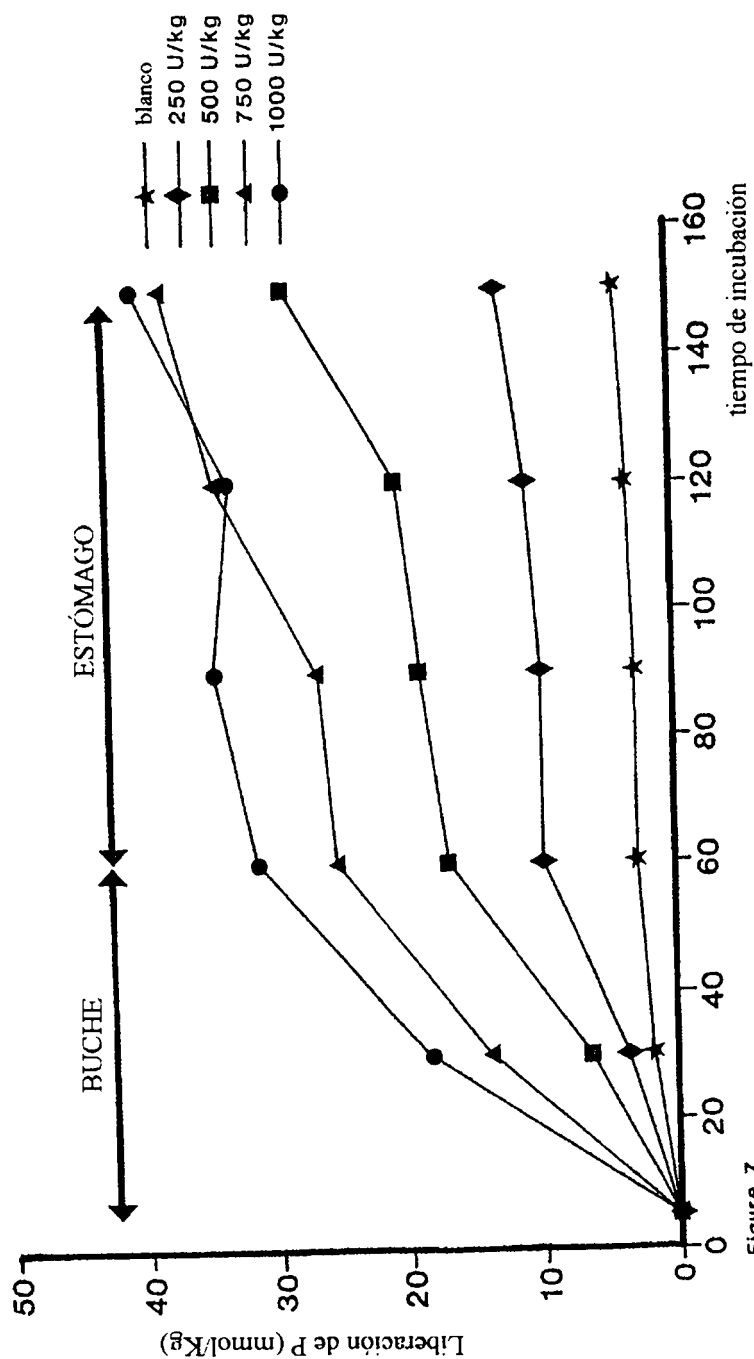


Figure 7

MODELO DE DIGESTIBILIDAD IN VITRO
FITASA DE ASPERGILLUS Y SEMILLA DE TABACO

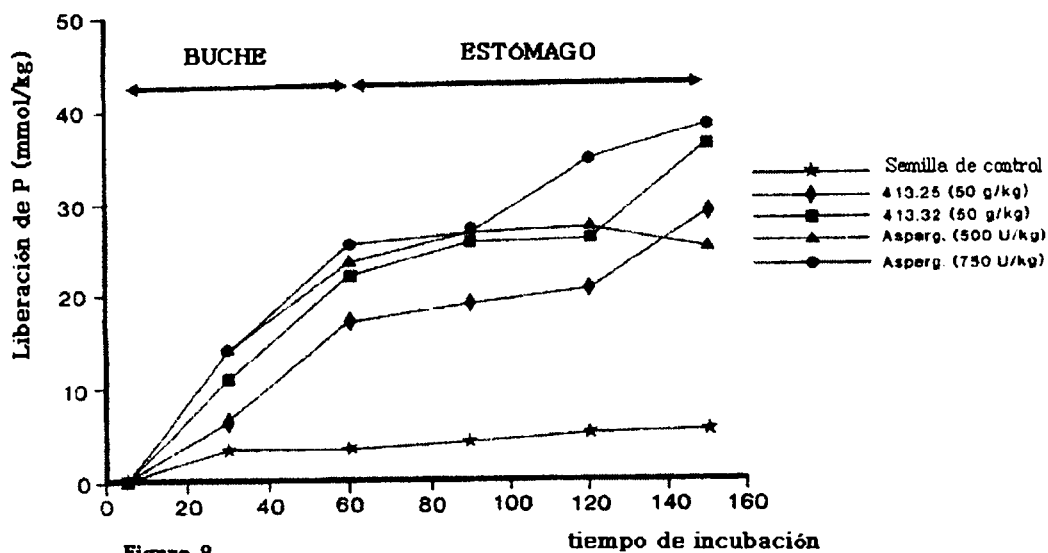


Figura 8