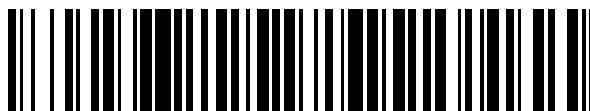


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 723 050**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

A01H 5/00 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2011 PCT/EP2011/054639**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO11117396**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2011 E 11709966 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2553090**

54 Título: **Variantes de fitasa termoestables**

30 Prioridad:

26.03.2010 EP 10158027

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

21.08.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SKOV, LARS KOBBEROEE;
DE MARIA, LEONARDO y
MATSUI, TOMOKO**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 723 050 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de fitasa termoestables

Referencia a un listado de secuencias

5 [0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en forma legible por ordenador. La forma legible por ordenador se incorpora en la presente por referencia.

Campo de la invención

10 [0002] La presente invención se refiere a variantes de fitasa que tienen al menos un 80% de identidad con una fitasa derivada de *Citrobacter braakii* ATCC 51113 y comprende el establecimiento de al menos dos puentes disulfuro que no están entre los cuatro puentes disulfuro de origen natural en comparación con esta y fitasas estrechamente relacionadas (es decir, es una variante de la misma), donde al menos dos puentes disulfuro se seleccionan del grupo que consiste en los pares de posiciones: A) 52/99 y B) 31/177 y donde la variante de fitasa tiene una termoestabilidad mejorada en comparación con la fitasa de SEQ ID NO: 2. La invención también se refiere al ADN que codifica estas fitasas, las variantes producidas, así como su uso, por ejemplo, en alimento para animales y aditivos alimentarios para animales. La parte madura de la fitasa de *Citrobacter braakii* ATCC 51113 se incluye en el listado de secuencias como SEQ ID NO: 2.

15

Antecedentes de la invención

Estado de la técnica

20 [0003] Las fitasas son enzimas bien conocidas, como lo son las ventajas de añadirlas a productos alimenticios para animales, incluidos los seres humanos. Las fitasas se han aislado de varias fuentes, incluidas varias cepas fúngicas y bacterianas.

25 [0004] Es un objeto de la presente invención proporcionar polipéptidos alternativos que tienen actividad de fitasa (fitasas) y polinucleótidos que codifican los polipéptidos. Las variantes de fitasa de la invención presentan propiedades modificadas o alteradas preferiblemente mejoradas en comparación con la fitasa parental. Ejemplos no limitativos de tales propiedades son: la estabilidad (tal como la estabilidad al ácido, la estabilidad térmica, la estabilidad al vapor, la estabilidad a la granulación y/o la estabilidad frente a proteasas, en particular la estabilidad frente a la pepsina), el perfil de temperatura, el perfil de pH, la actividad específica, la especificidad de sustrato, el rendimiento en alimento para animales (tal como una liberación y/o degradación mejoradas del fitato), la susceptibilidad a la glicación y/o el patrón de glicosilación.

30 [0005] Como se describe en la presente, la mutagénesis de un polinucleótido parental que codifica una fitasa se emplea para preparar ADN variantes (sintéticos) que codifican una fitasa que tiene propiedades mejoradas en relación con la fitasa codificada por el polinucleótido parental.

35 [0006] Se conocen una serie de estructuras tridimensionales de fitasas del tipo de los fosfatos ácidos de histidina (HAP) (por ejemplo, Lim et al. Nature struct. biol. 7, 108-113 (2000)). A partir de estos se ha encontrado que todos tienen cuatro puentes disulfuro localizados en los pares de posiciones 77/108 133/407 178/187 381/390 (según la numeración usada aquí). Típicamente estos ocupan todas las cisteínas presentes en la molécula.

Citrobacter

40 [0007] La secuencia del gen *phyA* de una cepa de *Citrobacter freundii* ha sido presentada por Zinin et al. en las bases de datos EMBL/GenBank/DDBJ con el n.º de acceso AY390262. La secuencia de aminoácidos de la fitasa correspondiente se encuentra en las bases de datos UniProt/TrEMBL con el n.º de acceso Q676V7. La parte madura esperada de Q676V7 se incluye en el presente listado de secuencias como SEQ ID NO: 4. La fitasa de *Citrobacter freundii* Q676V7 comprende los cuatro puentes disulfuro indicados anteriormente y no hay más cisteínas presentes.

45 [0008] WO-2004/085638 (Republic of National Fisheries Research and Development Institute of Korea) revela, como SEQ ID NO: 7, la secuencia de aminoácidos de una fitasa de *Citrobacter braakii* YH-15, depositada como KCCM 10427. La parte madura de esta secuencia de aminoácidos se incluye en la presente como SEQ ID NO: 3. Esta secuencia se encuentra también en la base de datos Geneseqp con el n.º de acceso ADU50737. La fitasa de

Citrobacter braakii YH-15 comprende los cuatro puentes disulfuro indicados anteriormente y no hay más cisteínas presentes.

5 [0009] WO 2006/037328 (Novozymes A/S) revela la fitasa de tipo salvaje de *Citrobacter braakii* ATCC 51113 (es decir, la SEQ ID NO: 2 en la presente), así como una variante de la misma, que se incluye también en el presente listado de secuencias, es decir, como SEQ ID NO: 6. La fitasa de *Citrobacter braakii* ATCC 51113 comprende los cuatro puentes disulfuro indicados anteriormente y no hay más cisteínas presentes.

10 [0010] WO 2006/038062 y WO 2006/038128 (Danisco A/S) revelan ambas la secuencia de aminoácidos del gen de la fitasa de *Citrobacter freundii* P3-42, depositada con el número de acceso NCIMB 41247, y un número de variantes de las mismas. Esta secuencia de aminoácidos se incluye en la presente como SEQ ID NO: 9. Estas solicitudes revelan solo una sustitución en la posición 233 por una cisteína (S233C), según la numeración usada en la presente esto sería S211C. La fitasa *Citrobacter freundii* P3-42 comprende los cuatro puentes disulfuro indicados anteriormente y no hay más cisteínas presentes. Los textos de WO 2006/038062 y WO 2006/038128 parecen ser idénticos.

15 [0011] WO 2007/112739 (Novozymes A/S) revela un gran número de variantes de fitasa con ejemplificación usando la fitasa de *Citrobacter braakii* ATCC 51113 como progenitor. WO 2007/112739 indica entre otras cosas la creación de puentes disulfuro.

Breve descripción de los dibujos y listado de secuencias

[0012] La figura 1 es un alineamiento de las fitasas de SEQ ID NO: 2 y 9.

[0013] En el listado de secuencias, las secuencias se aplican de la siguiente manera:

SEQ ID NO: 1	<i>Citrobacter braakii</i> ATCC 51113 (WO 2006/037328)
SEQ ID NO: 2	<i>Citrobacter braakii</i> ATCC 51113 (WO 2006/037328)
SEQ ID NO: 3	<i>Citrobacter braakii</i> YH-15 (WO-2004/085638)
SEQ ID NO: 4	<i>Citrobacter freundii</i> (n.º de acceso de UniProt/TrEMBL Q676V7)
SEQ ID NO: 5	Variante de la SEQ ID NO:2 (18 es Xaa y 323 son Xaa)
SEQ ID NO: 6	Variante de la SEQ ID NO: 2 (18 es Gly y 323 es Pro)
SEQ ID NO: 7	Péptido señal de <i>Citrobacter braakii</i> ATCC 51113
SEQ ID NO: 8	Propéptido de <i>Citrobacter braakii</i> ATCC 51113
SEQ ID NO: 9	<i>Citrobacter freundii</i> NCIMB 41247 (WO 2006/038062 y WO 2006/038128)

20 **Resumen de los ejemplos**

[0014] En la especificación se proporcionan los ejemplos siguientes:

Ejemplo 1: preparación de variantes y determinación de la actividad

Ejemplo 2: actividad específica

Ejemplo 3: cribado para la estabilidad a la temperatura

25 Ejemplo 4: termoestabilidad por DSC

Ejemplo 5: perfil de temperatura

Ejemplo 6: perfil de pH

Ejemplo 7: estabilidad al vapor

Ejemplo 8: pruebas de estabilidad a la granulación

Ejemplo 9: rendimiento en alimento para animales en un modelo *in vitro* para pollos de engorde

Ejemplo 10: rendimiento en una prueba *in vivo* en cerdos

Ejemplo 11: cálculo del porcentaje de identidad e identificación de las posiciones correspondientes

Descripción de la invención

5 [0015] La presente invención está definida por las reivindicaciones.

[0016] La presente descripción se refiere a un método para producir una fitasa variante que tiene al menos un 74% de identidad con la SEQ ID NO: 2 y que comprende el establecimiento de al menos dos puentes disulfuro en comparación con la SEQ ID NO: 2, donde dichos dos puentes disulfuro no están entre los cuatro de origen natural en las posiciones 77/108, 133/407, 178/187 y 381/390 con la numeración que se proporciona en la SEQ ID NO: 2.

10 [0017] El porcentaje de identidad se determina como se describe en la sección "Polipéptidos de fitasa, porcentaje de identidad".

[0018] Los números de posición se refieren a la numeración de las posiciones de la SEQ ID NO: 2, como se describe en la sección "Numeración de las posiciones". Las posiciones correspondientes a estos números de posición de la SEQ ID NO: 2 en otras fitasas se determinan como se describe en la sección "Identificación de los números de posición correspondientes".

15

[0019] Al menos dos puentes disulfuro se establecen en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en los pares de posiciones: A) 52/99; B) 31/177; C) 46/91; D) 141/199; E) 31/176; F) 59/100; y G) 162/247.

[0020] Se prefiere que el primer puente disulfuro se establezca en el par de posiciones A entre los residuos de las posiciones 52 y 99, y el segundo puente disulfuro se establezca en el par de posiciones B entre los residuos de las posiciones 31 y 177.

20

[0021] El método de la divulgación se refiere a variantes de fitasa donde el número de puentes disulfuro establecidos es 2, 3, 4, 5, 6 y/o 7.

[0022] Cuando el número de puentes disulfuro establecidos es dos, se pueden crear las siguientes combinaciones de pares de posiciones: A+B, A+C, A+D, A+E, A+F, A+G, B+C, B+D, B+E, B+F, B+G, C+D, C+E, C+F, C+G, D+E, D+F, D+G, E+F, E+G, y F+G, donde A significa 52/99; B significa 31/177; C significa 46/91; D significa 141/199; E significa 31/176, F significa 59/100; y G significa 162/247.

25

[0023] Si el número de puentes disulfuro establecidos es tres, se pueden crear las siguientes combinaciones de pares de posiciones: A+B+C, A+B+D, A+B+E, A+B+F, A+B+G, A+C+D, A+C+E, A+C+F, A+C+G, A+D+E, A+D+F, A+D+G, A+E+F, A+E+G, A+F+G, B+C+D, B+C+E, B+C+F, B+C+G, B+D+E, B+D+F, B+D+G, B+E+F, B+E+G, B+F+G, C+D+E, C+D+F, C+D+G, C+E+F, C+E+G, C+F+G, D+E+F, D+E+G, D+F+G y E+F+G.

30

[0024] También está previsto que se utilicen las siguientes combinaciones de pares de posiciones: A+B+C+D, A+B+C+E, A+B+C+F, A+B+C+G, A+B+D+E, A+B+D+F, A+B+D+G, A+B+E+F, A+B+E+G, A+B+F+G, A+C+D+E, A+C+D+F, A+C+D+G, A+C+E+F, A+C+E+G, A+C+E+H, A+C+F+G, A+D+E+F, A+D+E+G, A+D+F+G, A+E+F+G, B+C+D+E, B+C+D+F, B+C+D+G, B+C+E+F, B+C+E+G, B+C+F+G, B+D+E+F, B+D+E+G, B+D+F+G, B+E+F+G, C+D+E+F, C+D+E+G, C+D+F+G, C+E+F+G, C+E+F+H y D+E+F+G para establecer cuatro puentes disulfuro.

35

[0025] Cuando el número de puentes disulfuro establecidos es cinco, las combinaciones se seleccionan de los siguientes pares de posiciones: A+B+C+D+E, A+B+C+D+F, A+B+C+D+G, A+B+C+E+F, A+B+C+E+G, A+B+C+F+G, A+B+D+E+F, A+B+D+E+G, A+B+D+F+G, A+B+E+F+G, A+B+F+G+H, A+C+D+E+F, A+C+D+E+G, A+C+D+F+G, A+C+E+F+G, A+D+E+F+G, B+C+D+E+F, B+C+D+E+G, B+C+D+F+G, B+C+E+F+G, B+D+E+F+G y C+D+E+F+G.

40

[0026] Si el número de puentes disulfuro establecidos es seis, las combinaciones se seleccionan de los siguientes pares de posiciones: A+B+C+D+E+F, A+B+C+D+E+G, A+B+C+D+F+G, A+B+C+E+F+G, A+B+D+E+F+G, A+C+D+E+F+G y B+C+D+E+F+G.

[0027] Finalmente, para el establecimiento de siete puentes disulfuro, puede usarse la siguiente combinación de pares de posiciones: A+B+C+D+E+F+G.

[0028] En todas las combinaciones anteriores A significa 52/99; B significa 31/177; C significa 46/91; D significa 141/199; E significa 31/176, F significa 59/100; y G significa 162/247.

5 [0029] Según el método de la invención, la variante de fitasa puede comprender además al menos una modificación en al menos una posición seleccionada de las siguientes: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 31, 35, 41, 45, 46, 52, 53, 55, 56, 57, 59, 60, 64, 66, 73, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 87, 90, 91, 94, 100, 104, 105, 106, 107, 109, 111, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 126, 129, 130, 132, 134, 136, 137, 138, 139, 142, 146, 148, 154, 155, 157, 161, 162, 164, 167, 171, 173, 175, 176, 177, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 188, 190, 193, 196, 200, 202, 203, 205, 207, 211, 213, 215, 217, 218, 223, 231, 239, 240, 241, 247, 252, 254, 257, 266, 273, 276, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 289, 294, 299, 300, 308, 314, 316, 321, 324, 330, 331, 336, 338, 339, 340, 344, 345, 348, 351, 355, 361, 362, 363, 364, 369, 371, 372, 373, 375, 379, 385, 386, 392, 406, 409, 410 y 411.

15 [0030] La divulgación proporciona además que las modificaciones anteriores se eligen específicamente de las siguientes: 1*, 1H,K,R,Q, 2D, 2*, 3*, 4P, 5P, 6L, 24R,E, 31T,K,N, 35Y, 41P, 45R, 46D,E, 52E,R 53V,Q,K, 53V 55D,I, 56T, 57Y,V, 60P,H,K,R, 66Y, 73D,P, 74P,S,Y,A, 75T, 76G,P, 79F, 80L, 81E, 82E, 83I, 84Y, 87T, 90V,Y, 91P, 100Y, 104I,A, 105F,E, 106A,G, 107D,E,G, 109A,G, 111P, 114H,N,T, 115Q, 116A,E,P,T,Q, 117D,E,K, 118V,I,L,M,T, 119G,K,R,S, 120K,S,T,Q,R 121A,D,M,P,T,V 1211, 122D, 123P,S, 124L,T,V, N126D, K129G 129I,R,P,Q, 130K,V, 1321, 134T 136P, 137P, 138F, 139N, 142D, 146D, 148T 154P,Q,V 155F, 157F, 161P, 164D,E, 167Q, 171T, 173P,T 175L, 177I 179G,I,K,N,Q, 180A,E,G,T, 181D,G,I,K,L,S,W 182G,N,R,V,H,K,S,Q, 183RA,L,P,S,V,Q, 184RT, 184*, 20 185A,S, 185*, 186*, 188P, 193F, 196Q, 200K,R, 202N,H, 203D,E,T,L, 205P, 207G,S, 211C, 213A, 215M, 218Q, 223E, 231P, 239Q, 240P, 241Q, 252H,L, 254Y, 257E, 266M, 273L,Q, 276K,R, 279S, 280P, 281H, 282P, 283P, 284P, 285G,N,R, E285Y, 286D,T,K,Q, 289P, 294T, 299L, 300V, 308A, 314G,N, 316D, 321A, 324N, 330D, 331K, 336R, 338N, 339D, 340A,I, 343D, 344S, 345N, 348H, 351Y, 355P, 361V, 362K,R, I362F, I362L, 362M, 363R, 364Q, 369N, 371P, 373T, 375N, 379K,R, 385D 386I, 392I, 406A, 409D,E, 410D,E y/o 411R,K.

25 [0031] En otra divulgación, adicionalmente, los ocho aminoácidos en la posición 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185 y 186 se han sustituido por QADKP, GEDKP, NGISA, IAGKS, KEKHQ, KEKQQ, KEKKV o KTDKL.

[0032] Según la invención, las variantes con puentes disulfuro adicionales pueden comprender además al menos una modificación seleccionada de las siguientes: 1*, 1*/2*, 1*/2*/3*, 1K, 4P, 5P, 46E, 52E, 53V, 57Y, 76G, 82E, 107D, 107E, 107G, 109A, 111P, 119R, 119K, 121T, 121D, 137P, 161P, 164E, 167Q, 196Q, 200K, 202N, 218Q, 223E, 241Q, 273L, 276R, 276K, 285G, 285N, 286Q, 299L, 314N, 314G, 362R, 362K, 379R, 379K, 385D, 406A, 410D, 410E, 411R, 411K, o las combinaciones seleccionadas de: 55D/331K, 111P/241Q, 179K/180E/181K/182H/183Q/184*/185*/186*, 179K/180E/181K/182Q/183Q/184*/185*/186*, 179K/180E/181K/182K/183V/184*/185*/186*, 179K/180T/181D/182K/183L/184*/185*/186*, 114T/115Q/116A/117D/118T/119S/120S/121P/122D/123P/124L y 114T/115Q/116T/117D/118T/119S/120S/121P/122D/123P/124L.

[0033] En aspectos específicos de la divulgación, los puentes disulfuro adicionales se seleccionan del grupo que comprende G52C/A99C, N31C/T177C, W46C/Q91C, K141CIV199C, N31C/E176C, G59C/F100C y/o S162C/S247C.

40 [0034] En otros aspectos específicos del método de la divulgación, otras modificaciones específicas son E1K, E1Q, E2D, M6L, K24E, K24R, D31K, D31N, D35Y, G45R, G52R, E53K, E53V, V55I, S56T, E57V, Q60H, Q60K, Q60R, F66Y, N73D, N73P, N74P, N74S, N74Y, Q75T, T76G, T76P, S79F, P80L, G81E, V83I, A87T, D90V, D90Y, F100Y, L104I, Y114N, E118V, K120R, T121I, T121P, N126D, K129G, M130K, M130V, T132I, S134T, L138F, K139N, N142D, E146D, A148T, L154Q, L154V, Y155F, S173T, T177I, T181I, T181L, T181S, T181W, E182A, E182G, E182H, E182I, E182N, E182R, E182V, K183P, K183R, S184R, S184T, T185A, T185S, L193F, D202H, N203D, 45 N203E, P207S, S211C, S213A, Q252H, Q252L, Q257E, R266M, L279S, E285Y, N286D, N286T, A300V, G321A, K336R, K338N, T340A, T340I, N343D, T344S, D345N, Q348H, D361V, I362F, I362L, I362M, Q363R, P364Q, K369N, A371P, K373T, D375N, S386I y L392I o una combinación de modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en: K24E/Q60H; Q60K/V83I; N126D/T340I; K24E/L392I; F66Y/Y114N; T132I/P364Q; N73P/N74S; N73P/N74P; Q75T/T76G; D202H/N203E; Y155F/T177I; Q252L/Q348H; K24E/N74Y; N126D/L279S; E2D/R266M; E118V/A300V; K24E/S173T; E53K/N343D; T76P/S213A; L138F/L193F; Q252L/K373T; G45R/Q257E/N286T; K139N/P207S/R266M; D31N/D35Y/M130V; F100Y/S134T/P207S; T177I/S184R/T185S; E1K/K24E/Q60H; K24E/Q60H/Q363R; T181W/E182N/K183R; T181W/E182H/K183R; T181W/E182R/K183R; T181W/E182A/K183R; A0T/K129G/N286D; E1K/E53K/F66Y; M130K/N203D/L279S; S56T/Q252L/S386I; L154Q/T177I/T344S; K24E/V55I/T181S; K24R/T177I/D345N; G52R/E182G/R266M, A0T/T177I/S184T/T185A, Q60R/F66Y/L104I/I362L, 55 K24E/Q60H/E146D/Q252L, Q60K/T132I/Q257E/N284T, Q60R/D90V/Q252H/T340A, E22D/E57V/N73D/K338N, E1K/M6L/A87T/T121P/I362L, D31N/D35Y/T177I/P207S/R266M, K24E/Q60H/N126D/T132I/T340I,

5 D31N/D35Y//P207S/R266M/K336R, D31N/D35Y/T132I/P207S/R266M, Y114N/T177I/T181L/E182I/K183P,
 E1Q/S79F/Q252L/I362M/K369N, K24E/Q60H/N73D/D90V/K120R/D361V,
 D31N/D35Y/M130V/P207S/R266M/A371P, D31K/D35Y/M130V/P207S/R266M/A371P,
 D31N/D35Y/F66Y/M130V/P207S/Q257E/N286T, D31N/D35Y/M130V/E182V/P207S/R266M/A371P,
 D31N/D35Y/M130V/T132I/P207S/R266M/A371P, D31N/D35Y/Q60H/G81E/M130V/P207S/R266M/A371P,
 K24E/D31N/D35Y/T121I/M130V/L154V/P207S/R266M/A371P,
 Q60K/F66Y/N74P/Q75T/T76G/V83I/Q252H/Q257E/A371P,
 Q60K/F66Y/N73P/N74P/Q75T/Q257E/I362L/P364Q/A371P,
 D31N/D35Y/E53V/M130V/A148T/P207S/R266M/Q363R/A371P,
 10 Q60K/F66Y/N74P/T76G/Y114N/M130V/Y155F/T340I/I362F/A371P/D375N,
 D31N/D35Y/F66Y/N73P/N74P/N83I/D90VN114N/N126D/N142D/Q252H/T340I/I362L/A371P,
 D31N/D35Y/Q60K/F66Y/N73P/P80L/V83I/Y117N/N126D/Y155F/Q252H/Q257E/T340I/A371P y
 D31N/D35Y/Q60K/F66Y/N74P/T76G/V83I/D90V/Y155F/Q252L/G321A/T340I/I362L/A371P.

15 [0035] Otros aspectos específicos del método de la divulgación proporcionan variantes específicas seleccionadas
 de las siguientes: A/B/K129P, A/B/K129Q, A/B/K129I, A/B/K129R, A/B/P207G, A/B/N203L/P207G,
 A/B/K129R/N203L, A/B/K129R/N203L/P207G, A/B/K24R, A/B/K24R/K129P, A/B/K24R/K129R/N203L/P207G,
 A/B/K24R/K129R/N203L, A/B/D,
 A/D/F66L/R94V/ \sum a/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V,
 A/D/F66L/R94V/ \sum a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V,
 20 A/D/L64F/F66L/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A,
 A/D/F66L/R94V/ \sum a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V/Q252W,
 A/D/F66L/R94V/ \sum a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V/Q252Y,
 A/D/F66L/R94V/ \sum a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V/Q252F,
 A/D/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A, A/B/D/F66L/R94V/ \sum a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V
 25 A/B/D/F66L/R94V/ \sum a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V/Q252Y
 A/B/D/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A
 A/D/R94V/K116A/E118T/E119S/K120S/N121R/T188S/P190T/S213G/T217A/K336V
 A/D/R94V/K116A/E118T/E119S/K120S/N121R/T188S/P190T/S213G/T217A
 A/D/R94V/K116A/E118T/E119S/K120S/T188S/P190T/T217A B/D/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A
 30 A/D/ \sum a/E182K/K183Q/T185G/K186L/S213G/T217A/K336V,
 D/F66L/R94V/ \sum a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V,
 A/D/F66L/R94V/ \sum a/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V,
 A/D/F66L/R94V/ \sum a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V,
 D/F66L/R94V/ \sum a/K179N/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K 336V,
 35 D/F66L/R94V/ \sum a/E182N/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V,
 D/ \sum b/E182R/K183Q/T185G/K186L/S213G/T217A/K336R,
 D/F66L/ \sum b/E182R/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/S213G/T217A/K336R,
 D/F66L/ \sum b/E182R/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/E196R/S213G/T217A/K336R,
 D/ \sum b/E182R/K183Q/T185G/K186L/S213G/T217A/K336R/K393G/R397Q/K400A,
 40 D/ \sum b/E182K/K183Q/T185G/K186L/S213G/T217A/K336V, D/ \sum c/K183Q/T185G/K186L/S213G/T217A,
 D/F66L/ \sum b/E182R/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/N203L/S213G,
 D/F66L/R94V/ \sum d/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V,
 A/D/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A, A/B/D/F66L/R94V/ \sum a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V,
 D/E1*E2*/K116A/E119S/T217A, D/E1*E2*/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A,
 45 donde A significa G52C/A99C, B significa N31C/T177C, C significa W46C/Q91C, D significa K141C/V199C, E
 significa N31C/E176C, F significa G59C/F100C y G significa S162C/S247C; y donde \sum a significa la sustitución del
 fragmento TQADTSSR por el fragmento YQKDEEKN en las posiciones 114-121, \sum b significa la sustitución del
 fragmento TQADTSSP por el fragmento YQKDEEKN, \sum c significa la sustitución del fragmento TQADTSSN por el
 fragmento YQKDEEKN, \sum d significa la sustitución del fragmento TQADTSS por el fragmento YQKDEEKN.

50 [0036] El método de la divulgación se puede usar para crear una variante de cualquier fitasa de tipo salvaje o
 variante. En formas de realización particulares, produce una variante de la parte madura de una fitasa de SEQ ID
 NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, o una variante de cualquiera de las variantes
 de fitasa relacionadas con la SEQ ID NO: 9 y enumeradas en la figura 1.

55 [0037] El método de la divulgación puede proporcionar además variantes que, además de los puentes disulfuro
 adicionales, comprenden una modificación (sustitución) o una combinación de modificaciones (sustituciones)
 seleccionadas de entre las modificaciones (sustituciones) y combinaciones de modificaciones (sustituciones)
 enumeradas en cada fila de la figura 1.

60 [0038] El método de la divulgación puede proporcionar una variante de fitasa que tiene propiedades mejoradas,
 tales como termoestabilidad, estabilidad térmica, estabilidad al vapor, perfil de temperatura, estabilidad a la
 granulación, estabilidad al ácido, perfil de pH y/o estabilidad frente a proteasas, en particular estabilidad frente a la

- pepsina, actividad específica, especificidad de sustrato, rendimiento en alimento para animales (tal como una liberación y/o degradación mejoradas del fitato), susceptibilidad a la glicación y/o patrón de glicosilación. Las variantes proporcionadas por la invención presentan propiedades térmicas especialmente mejoradas, tales como termoestabilidad, estabilidad térmica, estabilidad al vapor, perfil de temperatura, estabilidad a la granulación o rendimiento mejorado en alimento para animales.
- 5 [0039] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen propiedades térmicas mejoradas, tales como termoestabilidad, estabilidad térmica, estabilidad al vapor, perfil de temperatura y/o estabilidad a la granulación.
- [0040] El método de la invención se refiere así a variantes de fitasa que tienen una termoestabilidad mejorada.
- 10 [0041] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen una estabilidad térmica mejorada.
- [0042] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen una estabilidad al vapor mejorada.
- [0043] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen un perfil de temperatura mejorado.
- [0044] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen una estabilidad a la granulación mejorada.
- 15 [0045] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen una estabilidad al ácido mejorada.
- [0046] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen un perfil de pH mejorado.
- [0047] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen una estabilidad frente a proteasas mejorada, en particular la estabilidad frente a la pepsina.
- [0048] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen una actividad específica mejorada.
- 20 [0049] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen una especificidad de sustrato mejorada.
- [0050] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen un rendimiento mejorado en alimento para animales (tal como una liberación y/o degradación mejoradas del fitato).
- 25 [0051] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen una susceptibilidad a la glicación mejorada.
- [0052] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen un patrón de glicosilación y/o mejorado.
- [0053] La divulgación se refiere además a un polinucleótido que comprende secuencias de nucleótidos que codifican las variantes de fitasa producidas por el método, constructos de ácido nucleico que comprenden los polinucleótidos unidos operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión, vectores de expresión recombinantes que comprenden tales constructos de ácido nucleico, y células huésped recombinantes que comprenden un constructo de ácido nucleico y/o un vector de expresión.
- 30 [0054] La divulgación se refiere además a métodos para producir variantes de fitasa tal como se proporcionan, que comprenden
- 35 (a) el cultivo de una célula huésped para producir un sobrenadante que comprende la fitasa; y
(b) la recuperación de la fitasa.
- [0055] La divulgación también se refiere a las variantes de fitasa como tales con las modificaciones indicadas anteriormente.

[0056] La divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen al menos un 74% de identidad con la SEQ ID NO: 2 y que comprenden al menos dos puentes disulfuro en comparación con la SEQ ID NO: 2, donde dichos dos puentes disulfuro son adicionales a los cuatro de origen natural en las posiciones 77/108, 133/407, 178/187 y 381/390 con la numeración que se proporciona en la SEQ ID NO: 2.

5 [0057] Al menos dos puentes disulfuro se seleccionan del grupo que consiste en los pares de posiciones: A) 52/99; B) 31/177; C) 46/91; D) 141/199; E) 31/176; F) 59/100; y G) 162/247.

[0058] La divulgación se refiere a variantes de fitasa donde el número de puentes disulfuro es 6, 7, 8, 9, 10 y/u 11.

10 [0059] Cuando el número de puentes disulfuro adicionales es dos, pueden estar presentes las siguientes combinaciones de pares de posiciones: A+B, A+C, A+D, A+E, A+F, A+G, B+C, B+D, B+E, B+F, B+G, C+D, C+E, C+F, C+G, D+E, D+F, D+G, E+F, E+G y F+G, donde A significa 52/99; B significa 31/177; C significa 46/91; D significa 141/199; E significa 31/176, F significa 59/100; y G significa 162/247.

15 [0060] Si el número de puentes disulfuro adicionales es tres, pueden estar presentes las siguientes combinaciones de pares de posiciones: A+B+C, A+B+D, A+B+E, A+B+F, A+B+G, A+C+D, A+C+E, A+C+F, A+C+G, A+D+E, A+D+F, A+D+G, A+E+F, A+E+G, A+F+G, B+C+D, B+C+E, B+C+F, B+C+G, B+D+E, B+D+F, B+D+G, B+E+F, B+E+G, B+F+G, C+D+E, C+D+F, C+D+G, C+E+F, C+E+G, C+F+G, D+E+F, D+E+G, D+F+G y E+F+G.

20 [0061] También está previsto que se utilicen las siguientes combinaciones de pares de posiciones: A+B+C+D, A+B+C+E, A+B+C+F, A+B+C+G, A+B+D+E, A+B+D+F, A+B+D+G, A+B+E+F, A+B+E+G, A+B+F+G, A+C+D+E, A+C+D+F, A+C+D+G, A+C+E+F, A+C+E+G, A+C+E+H, A+C+F+G, A+D+E+F, A+D+E+G, A+D+F+G, A+E+F+G, B+C+D+E, B+C+D+F, B+C+D+G, B+C+E+F, B+C+E+G, B+C+F+G, B+D+E+F, B+D+E+G, B+D+F+G, B+E+F+G, C+D+E+F, C+D+E+G, C+D+F+G, C+E+F+G, C+E+F+H y D+E+F+G para cuatro puentes disulfuro adicionales.

25 [0062] Cuando el número de puentes disulfuro adicionales es cinco, las combinaciones se seleccionan de los siguientes pares de posiciones: A+B+C+D+E, A+B+C+D+F, A+B+C+D+G, A+B+C+E+F, A+B+C+E+G, A+B+C+F+G, A+B+D+E+F, A+B+D+E+G, A+B+D+F+G, A+B+E+F+G, A+B+F+G+H, A+C+D+E+F, A+C+D+E+G, A+C+D+F+G, A+C+E+F+G, A+D+E+F+G, B+C+D+E+F, B+C+D+E+G, B+C+D+F+G, B+C+E+F+G, B+D+E+F+G y C+D+E+F+G.

[0063] Si el número de puentes disulfuro adicionales es seis, las combinaciones se seleccionan de los siguientes pares de posiciones: A+B+C+D+E+F, A+B+C+D+E+G, A+B+C+D+F+G, A+B+C+E+F+G, A+B+D+E+F+G, A+C+D+E+F+G y B+C+D+E+F+G.

30 [0064] Finalmente, para siete puentes disulfuro adicionales, puede usarse la siguiente combinación de pares de posiciones: A+B+C+D+E+F+G.

[0065] En todas las combinaciones anteriores A significa 52/99; B significa 31/177; C significa 46/91; D significa 141/199; E significa 31/176, F significa 59/100; y G significa 162/247.

35 [0066] Según la divulgación, la variante de fitasa puede comprender además al menos una modificación en al menos una posición seleccionada de las siguientes: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 31, 35, 41, 45, 46, 52, 53, 55, 56, 57, 59, 60, 64, 66, 73, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 87, 90, 91, 94, 100, 104, 105, 106, 107, 109, 111, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 126, 129, 130, 132, 134, 136, 137, 138, 139, 142, 146, 148, 154, 155, 157, 161, 162, 164, 167, 171, 173, 175, 176, 177, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 188, 190, 193, 196, 200, 202, 203, 205, 207, 211, 213, 215, 217, 218, 223, 231, 239, 240, 241, 247, 252, 254, 257, 266, 273, 276, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 289, 294, 299, 300, 308, 314, 316, 321, 324, 330, 331, 336, 338, 339, 340, 344, 345, 348, 351, 355, 361, 362, 363, 364, 369, 371, 372, 373, 375, 379, 385, 386, 392, 406, 409, 410 y 411.

40 [0067] La divulgación proporciona además que las modificaciones anteriores se eligen específicamente de las siguientes: 1*, 1H,K,R,Q, 2D, 2*, 3*, 4P, 5P, 6L, 24R,E, 31T,K,N, 35Y, 41P, 45R, 46D,E, 52E,R 53V,Q,K, 53V 55D,I, 56T, 57Y,V, 60P,H,K,R, 66Y, 73D,P, 74P,S,Y,A, 75T, 76G,P, 79F, 80L, 81E, 82E, 831, 84Y, 87T, 90V,Y, 91P, 100Y, 1041,A, 105F,E, 106A,G, 107D,E,G, 109A,G, 111P, 114H,N,T, 115Q, 116A,E,P,T,Q, 117D,E,K, 118V,I,L,M,T, 119G,K,R,S, 120K,S,T,Q,R 121A,D,M,P,T,V 1211, 122D, 123P,S, 124L,T,V, N126D, K129G 129I,R,P,Q, 130K,V, 1321, 134T 136P, 137P, 138F, 139N, 142D, 146D, 148T 154P,Q,V 155F, 157F, 161P, 164D,E, 167Q, 171T, 173P,T 175L, 1771 179G,I,K,N,Q, 180A,E,G,T, 181D,G,I,K,L,S,W 182G,N,R,V,H,K,S,Q, 183RA,L,P,S,V,Q, 184RT, 184*, 185A,S, 185*, 186*, 188P, 193F, 196Q, 200K,R, 202N,H, 203D,E,T,L, 205P, 207G,S, 211C, 213A, 215M, 218Q, 223E, 231P, 239Q, 240P, 241Q, 252H,L, 254Y, 257E, 266M, 273L,Q, 276K,R, 279S, 280P, 281H, 282P, 283P, 284P, 285G,N,R, E285Y, 286D,T,K,Q, 289P, 294T, 299L, 300V, 308A, 314G,N, 316D, 321A, 324N, 330D, 331K,

336R, 338N, 339D, 340A,I, 343D, 344S, 345N, 348H, 351Y, 355P, 361V, 362K,R, I362F, I362L, 362M, 363R, 364Q, 369N, 371P, 373T, 375N, 379K,R, 385D 386I, 392I, 406A, 409D,E, 410D,E y/o 411R,K.

[0068] En otro aspecto, adicionalmente, los ocho aminoácidos de las posiciones 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185 y 186 se han sustituido por QADKP, GEDKP, NGISA, IAGKS, KEKHQ, KEKQQ, KEKKV o KTDKL.

5 [0069] Según la divulgación, las variantes con puentes disulfuro adicionales pueden comprender además al menos una modificación seleccionada de las siguientes: 1*, 1*/2*, 1*/2*/3*, 1K, 4P, 5P, 46E, 52E, 53V, 57Y, 76G, 82E, 107D, 107E, 107G, 109A, 111P, 119R, 119K, 121T, 121D, 137P, 161P, 164E, 167Q, 196Q, 200K, 202N, 218Q, 223E, 241Q, 273L, 276R, 276K, 285G, 285N, 286Q, 299L, 314N, 314G, 362R, 362K, 379R, 379K, 385D, 406A, 410D, 410E, 411R, 411K, o las combinaciones seleccionadas de: 55D/331K, 111P/241Q,
 10 179K/180E/181K/182H/183Q/184*/185*/186*, 179K/180E/181K/182Q/183Q/184*/185*/186*,
 179K/180E/181K/182K/183V/184*/185*/186*, 179K/180T/181D/182K/183L/184*/185*/186*,
 14T/115Q/116A/117D/118T/119S/120S/121P/122D/123P/124L y 114T/115Q/116T/117D/118T/119S/120S/121P/122D/123P/124L.

15 [0070] En aspectos específicos de la divulgación, los puentes disulfuro adicionales se seleccionan del grupo que comprende G52C/A99C, N31C/T177C, W46C/Q91C, K141C/V199C, N31C/E176C, G59C/F100C y/o S162C/S247C.

[0071] En otros aspectos específicos de la divulgación, otras modificaciones específicas son E1K, E1Q, E2D, M6L, K24E, K24R, D31K, D31N, D35Y, G45R, G52R, E53K, E53V, V55I, S56T, E57V, Q60H, Q60K, Q60R, F66Y, N73D, N73P, N74P, N74S, N74Y, Q75T, T76G, T76P, S79F, P80L, G81E, V83I, A87T, D90V, D90Y, F100Y, L104I, Y114N, E118V, K120R, T121I, T121P, N126D, K129G, M130K, M130V, T132I, S134T, L138F, K139N, N142D, E146D, A148T, L154Q, L154V, Y155F, S173T, T177I, T181I, T181L, T181S, T181W, E182A, E182G, E182H, E182I, E182N, E182R, E182V, K183P, K183R, S184R, S184T, T185A, T185S, L193F, D202H, N203D, N203E, P207S, S211C, S213A, Q252H, Q252L, Q257E, R266M, L279S, E285Y, N286D, N286T, A300V, G321A, K336R, K338N, T340A, T340I, N343D, T344S, D345N, Q348H, D361V, I362F, I362L, I362M, Q363R, P364Q, K369N, A371P, K373T, D375N, S386I y L392I o una combinación de modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en: K24E/Q60H; Q60K/V83I; N126D/T340I; K24E/L392I; F66Y/Y114N; T132I/P364Q; N73P/N74S; N73P/N74P; Q75T/T76G; D202H/N203E; Y155F/T177I; Q252L/Q348H; K24E/N74Y; N126D/L279S; E2D/R266M; E118V/A300V; K24E/S173T; E53K/N343D; T76P/S213A; L138F/L193F; Q252L/K373T; G45R/Q257E/N286T; K139N/P207S/R266M; D31N/D35Y/M130V; F100Y/S134T/P207S; T177I/S184R/T185S; E1K/K24E/Q60H; K24E/Q60H/Q363R; T181W/E182N/K183R; T181W/E182H/K183R; T181W/E182R/K183R; T181W/E182A/K183R; AOT/K129G/N286D; E1K/E53K/F66Y; M130K/N203D/L279S; S56T/Q252L/S386I; L154Q/T177I/T344S; K24E/V55I/T181S; K24R/T177I/D345N; G52R/E182G/R266M, AOT/T177I/S184T/T185A, Q60R/F66Y/L104I/I362L, K24E/Q60H/E146D/Q252L, Q60K/T132I/Q257E/N284T, Q60R/D90V/Q252H/T340A, E22D/E57V/N73D/K338N, E1K/M6L/A87T/T121P/I362L, D31N/D35Y/T177I/P207S/R266M, K24E/Q60H/N126D/T132I/T340I, 35 D31N/D35Y//P207S/R266M/K336R, D31N/D35Y/T132I/P207S/R266M, Y114N/T177I/T181L/E182I/K183P, E1Q/S79F/Q252L/I362M/K369N, K24E/Q60H/N73D/D90V/K120R/D361V, D31N/D35Y/M130V/P207S/R266M/A371P, D31K/D35Y/M130V/P207S/R266M/A371P, D31N/D35Y/F66Y/M130V/P207S/Q257E/N286T, D31N/D35Y/M130V/E182V/P207S/R266M/A371P, D31N/D35Y/M130V/T132I/P207S/R266M/A371P, D31N/D35Y/Q60H/G81E/M130V/P207S/R266M/A371P, 40 K24E/D31N/D35Y/T121I/M130V/L154V/P207S/R266M/A371P, Q60K/F66Y/N74P/Q75T/T76G/V83I/Q252H/Q257E/A371P, Q60K/F66Y/N73P/N74P/Q75T/Q257E/I362L/P364Q/A371P, D31N/D35Y/E53V/M130V/A148T/P207S/R266M/Q363R/A371P, Q60K/F66Y/N74P/T76G/Y114N/M130V/Y155F/T340I/I362F/A371P/D375N, 45 D31N/D35Y/F66Y/N73P/N74P//V83I/D90V/Y114N/N126D/N142D/Q252H/T340I/I362L/A371P, D31N/D35Y/Q60K/F66Y/N73P/P80L//V83I//Y117N/N126D/Y155F/Q252H/Q257E/T340I/A371P, D31N/D35Y/Q60K/F66Y/N74P/T76G//V83I/D90V/Y155F/Q252L/G321A/T340I/I362L/A371P. y

[0072] Otros aspectos específicos de la divulgación proporcionan variantes específicas seleccionadas de las siguientes: A/B/K129P, A/B/K129Q, A/B/K129I, A/B/K129R, A/B/P207G, A/B/N203L/P207G, A/B/K129R/N203L, A/B/K129R/N203L/P207G, A/B/K24R, A/B/K24R/K129P, A/B/K24R/K129R/N203L/P207G, A/B/D, A/D/F66L/R94V/∑a/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V, A/D/F66L/R94V/∑a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V, A/D/L64F/F66L/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A, 55 A/D/F66L/R94V/∑a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V/Q252W, A/D/F66L/R94V/∑a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V/Q252Y, A/D/F66L/R94V/∑a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V/Q252F, A/D/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A, A/B/D/F66L/R94V/∑a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V A/B/D/F66L/R94V/∑a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V/Q252Y

A/B/D/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A
 A/D/R94V/K116A/E118T/E119S/K120S/N121R/T188S/P190T/S213G/T217A/K336V
 A/D/R94V/K116A/E118T/E119S/K120S/N121R/T188S/P190T/S213G/T217A
 A/D/R94V/K116A/E118T/E119S/K120S/T188S/P190T/T217A B/D/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A
 5 A/D/ Σ a/E182K/K183Q/T185G/K186L/S213G/T217A/K336V,
 D/F66L/R94V/ Σ a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V,
 A/D/F66L/R94V/ Σ a/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V,
 A/D/F66L/R94V/ Σ a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V,
 D/F66L/R94V/ Σ a/K179N/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K 336V,
 10 D/F66L/R94V/ Σ a/E182N/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V,
 D/ Σ b/E182R/K183Q/T185G/K186L/S213G/T217A/K336R,
 D/F66L/ Σ b/E182R/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/S213G/T217A/K336R,
 D/F66L/ Σ b/E182R/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/E196R/S213G/T217A/K336R,
 D/ Σ b/E182R/K183Q/T185G/K186L/S213G/T217A/K336R/K393G/R397Q/K400A,
 15 D/ Σ b/E182K/K183Q/T185G/K186L/S213G/T217A/K336V, D/ Σ c/K183Q/T185G/K186L/S213G/T217A,
 D/F66L/ Σ b/E182R/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/N203L/S213G,
 D/F66L/R94V/ Σ d/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V,
 A/D/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A, A/B/D/F66L/R94V/ Σ a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V,
 D/E1*/E2*/K116A/E119S/T217A, D/E1*/E2*/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A,

25 [0073] Las variantes de fitasa de la divulgación pueden ser variantes de cualquier fitasa de tipo salvaje o variante. En formas de realización particulares, las variantes pueden originarse de la parte madura de una fitasa de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, o una variante de cualquiera de las variantes de fitasa relacionadas con la SEQ ID NO: 9 y enumeradas en la figura 1.

30 [0074] Además, las variantes de la divulgación pueden comprender, además de los puentes disulfuro adicionales, una modificación (sustitución) o una combinación de modificaciones (sustituciones) seleccionadas de entre las modificaciones (sustituciones) y las combinaciones de modificaciones (sustituciones) enumeradas en cada fila de la figura 1.

35 [0075] La divulgación se refiere además a plantas transgénicas, o parte de una planta, capaces de expresar las variantes de fitasa, composiciones que comprenden al menos una variante de fitasa, y (a) al menos una vitamina liposoluble; (b) al menos una vitamina hidrosoluble; y/o (c) al menos un oligoelemento. Tales composiciones pueden comprender además al menos una enzima seleccionada del siguiente grupo de enzimas: amilasa, fitasa, fosfatasa, xilanas, galactanas, alfa-galactosidasa, proteasa, fosfolipasa y/o beta-gluconasa. Las composiciones pueden ser aditivos alimentarios para animales que pueden tener un contenido bruto de proteína de 50 a 800 g/kg y que comprenden una variante de fitasa de la invención.

40 [0076] La divulgación se refiere además a métodos para mejorar el valor nutricional de un alimento para animales, mediante la adición de una variante de fitasa de la invención al alimento, procesos para reducir los niveles de fitato en estiércol animal alimentando a un animal con una cantidad eficaz del alimento, métodos para el tratamiento de proteínas vegetales que comprenden el paso de añadir una variante de fitasa a al menos una proteína vegetal, y el uso de una variante de fitasa de una composición de la invención.

45 [0077] La divulgación proporciona también un método para producir un producto de fermentación tal como, por ejemplo, etanol, cerveza, vino, que comprende fermentar un material de carbohidrato en presencia de una variante de fitasa, un método para producir etanol que comprende fermentar un material de carbohidrato en presencia de una variante de fitasa y producir etanol.

Estrategia para preparar variantes

50 [0078] La estructura de la fitasa de *C. braakii* ATCC 51113 se construyó mediante modelado por homología, usando como molde la estructura de la fitasa AppA de *E. coli* (Protein Data Bank id.: 1DKO; Lim et al, Nat. Struct. Biol. (2000), vol. 2, pp. 108-113).

[0079] La estructura se sometió a simulaciones de dinámica molecular (DM) y cálculos electrostáticos. Se identificaron posiciones para prolinas y puentes disulfuro putativos, así como otras posiciones de importancia

potencial en cuanto a las varias propiedades enzimáticas deseables. Finalmente, se identificaron sitios de glicosilación (extensiones de NXT o NXS) putativos.

[0080] Todas estas sugerencias se evaluaron en el marco de la estructura modelada y los resultados de simulación, para determinar la propiedad de termoestabilidad con particular énfasis en el extremo de alta temperatura.

- 5 [0081] Las variantes de fitasa correspondientes se prepararon por métodos conocidos en la técnica y se evaluaron como se describe en la parte experimental.

Polipéptidos de fitasa, porcentaje de identidad

10 [0082] En el presente contexto, una fitasa es un polipéptido con actividad de fitasa, es decir, una enzima que cataliza la hidrólisis de fitato (mioinositol hexaquisfosfato) a (1) mioinositol y/o (2) mono-, di-, tri-, tetra- y/o pentafosfatos del mismo y (3) fosfato inorgánico.

[0083] En el presente contexto, el término un sustrato de fitasa abarca, entre otros, el ácido fítico y cualquier fitato (sal del ácido fítico), así como los fosfatos enumerados en (2) anteriormente.

15 [0084] El sitio ENZYME en internet (<http://www.expasy.ch/enzyme/>) es un repositorio de información relativa a la nomenclatura de enzimas. Se basa principalmente en las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUB-MB) y describe cada tipo de enzima caracterizada a la que se le ha proporcionado un número EC (Enzyme Commission) (Bairoch A. The ENZYME database, 2000, Nucleic Acids Res 28: 304-305). Véase también el manual Enzyme Nomenclature del NC-IUBMB, 1992).

20 [0085] Según el sitio ENZYME, se conocen tres tipos diferentes de fitasas: una denominada 3-fitasa (nombre alternativo 1-fitasa; una 3-fosfohidrolasa de mioinositol hexaquisfosfato, EC 3.1.3.8), una denominada 4-fitasa (nombre alternativo 6-fitasa, nombre basado en el sistema de numeración 1L y no la numeración 1D, EC 3.1.3.26), y una denominada 5-fitasa (EC 3.1.3.72). Para los fines de la presente invención, los tres tipos se incluyen en la definición de fitasa.

25 [0086] En un aspecto particular, las fitasas de la invención pertenecen a la familia de las fosfatasa ácidas de histidina, que incluyen la fosfatasa ácida de *Escherichia coli* a pH 2,5 (gen *appA*), así como fitasas fúngicas tales como las fitasas A y B de *Aspergillus awamorii* (EC: 3.1.3.8) (genes *phyA* y *phyB*). Las fosfatasa ácidas de histidina comparten dos regiones de similitud de secuencia, cada una centrada alrededor de un residuo conservado de histidina. Estas dos histidinas parecen estar implicadas en el mecanismo catalítico de las enzimas. La primera histidina se localiza en la sección N-terminal y forma un intermedio fosfohistidina, mientras que la segunda se localiza en la sección C-terminal y actúa posiblemente como donador de protones.

30 [0087] En otro aspecto particular, las fitasas de la invención tienen un motivo de sitio activo conservado, es decir, R-H-G-X-R-X-P, donde X designa cualquier aminoácido (véanse los aminoácidos 16 a 22 de las SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 6 y los aminoácidos 38-44 de la SEQ ID NO: 9). En un aspecto preferido, el motivo de sitio activo conservado es R-H-G-V-R-A-P, es decir, los aminoácidos 16-22 (por referencia a la SEQ ID NO: 2) son RHGVRAP.

35 [0088] Para los fines de la presente invención, la actividad de fitasa se determina en la unidad de FYT, en la que un FYT es la cantidad de enzima que libera 1 micromol de ortofosfato inorgánico por min. bajo las siguientes condiciones: pH 5,5; temperatura 37 °C; sustrato: fitato de sodio (C₆H₆O₂₄P₆Na₁₂) en una concentración de 0,0050 mol/l. Los ensayos de fitasa adecuados son los ensayos FYT y FTU descritos en el ejemplo 1 de WO 00/20569. FTU es para determinar la actividad de fitasa en el alimento y la premezcla. La actividad de fitasa también se puede determinar usando los ensayos del ejemplo 1 ("Determinación de la actividad de fosfatasa" o "Determinación de la actividad de fitasa").

40 [0089] En un aspecto particular se aísla la fitasa de la invención. El término "aislado(s)/aislada(s)/se aísla" como se utiliza en la presente se refiere a un polipéptido que es al menos 20% puro, preferiblemente al menos 40% puro, más preferiblemente al menos 60% puro, aún más preferiblemente al menos 80% puro, más preferiblemente al menos 90% puro e incluso más preferiblemente al menos 95% puro, como se determina por SDS-PAGE. En particular, se prefiere que los polipéptidos estén en "una forma esencialmente pura", es decir, que la preparación de polipéptido esté esencialmente libre de otro material polipeptídico con el cual está naturalmente asociado. Esto se puede realizar, por ejemplo, preparando el polipéptido por medio de métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación clásicos.

50 [0090] La relación entre dos secuencias de aminoácidos se describe mediante el parámetro de "identidad". Para fines de la presente invención, el alineamiento de dos secuencias de aminoácidos se determina usando el programa

Needle del paquete EMBOSS (<http://emboss.org>) versión 2.8.0. El programa Needle implementa el algoritmo de alineamiento global descrito en Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48,443-453. La matriz de sustitución usada es BLOSUM62, la penalización por apertura de espacio es 10 y la penalización por extensión de espacio es 0,5.

5 [0091] El grado de identidad entre una secuencia de aminoácidos de la presente invención ("secuencia de la invención") y la secuencia de aminoácidos a la que se hace referencia en las reivindicaciones (SEQ ID NO: 2) se calcula como el número de coincidencias exactas en un alineamiento de las dos secuencias, dividido entre la longitud de la "secuencia de la invención" o la longitud de la SEQ ID NO: 2, cualquiera que sea la más corta. El resultado se expresa en porcentaje de identidad.

10 [0092] Una coincidencia exacta ocurre cuando la "secuencia de la invención" y la SEQ ID NO: 2 tienen residuos de aminoácidos idénticos en las mismas posiciones del solapamiento (en el ejemplo de alineamiento siguiente, esto se representa por "|"). La longitud de una secuencia es el número de residuos de aminoácidos en la secuencia (por ejemplo, la longitud de los aminoácidos 1-411 de la SEQ ID NO: 2 es 411).

15 [0093] El ejemplo 11 es un ejemplo de un alineamiento de la fitasa de SEQ ID NO: 2 y la fitasa de SEQ ID NO: 9, y el ejemplo ilustra cómo calcular el porcentaje de identidad entre estos dos esqueletos.

[0094] En otro ejemplo, puramente hipotético, de alineamiento a continuación, el solapamiento es la secuencia de aminoácidos "HTWGER-NL" de la secuencia 1; o la secuencia de aminoácidos "HGWGEDANL" de la secuencia 2. En el ejemplo, un espacio se indica mediante un "-".

[0095] Ejemplo de alineamiento hipotético:

	Secuencia 1: ACMSHTWGER-NL
	I III II
20	Secuencia 2: HGWGEDANLAMNPS

25 [0096] En un aspecto particular, el porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido con, o respecto a, la SEQ ID NO: 2 se determina i) alineando las dos secuencias de aminoácidos usando el programa Needle, con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización por apertura de espacio de 10 y una penalización por extensión de espacio de 0,5; ii) contando el número de coincidencias exactas en el alineamiento; iii) dividiendo el número de coincidencias exactas entre la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos y iv) convirtiendo el resultado de la división de iii) en porcentaje.

[0097] En el ejemplo hipotético anterior, el número de coincidencias exactas es 6, la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos es 12; por consiguiente, el porcentaje de identidad es del 50%.

30 [0098] En aspectos particulares de la fitasa de la invención, el grado de identidad con la SEQ ID NO: 2 es de al menos un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o al menos de un 99%. En otros aspectos particulares más, el grado de identidad es de al menos un 98,0%, 98,2%, 98,4%, 98,6%, 98,8%, 99,0%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, o al menos de un 99,9%. En aspectos alternativos, el grado de identidad es de al menos un 70%, 71%, 72%, o de al menos un 73%.

35 [0099] En otros aspectos particulares más, la fitasa de la invención no tiene más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o no más de 10 modificaciones en comparación con la SEQ ID NO: 2 o cualquier otra fitasa parental; no más de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o no más de 20 modificaciones en comparación con la SEQ ID NO: 2 o cualquier otra fitasa parental; no más de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o no más de 30 modificaciones en comparación con la SEQ ID NO: 2 o cualquier otra fitasa parental; no más de 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o no más de 40 modificaciones en comparación con la SEQ ID NO: 2 o cualquier otra fitasa parental; no más de 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o no más de 50 modificaciones en comparación con la SEQ ID NO: 2 o cualquier otra fitasa parental; no más de 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, o no más de 60 modificaciones en comparación con la SEQ ID NO: 2 o cualquier otra fitasa parental; no más de 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, o no más de 70 modificaciones en comparación con la SEQ ID NO: 2 o cualquier otra fitasa parental; no más de 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, o no más de 80 modificaciones en comparación con la SEQ ID NO: 2 o cualquier otra fitasa parental; no más de 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o no más de 90 modificaciones en comparación con la SEQ ID NO: 2 o cualquier otra fitasa parental; no más de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o no más de 100 modificaciones en comparación con la SEQ ID NO: 2 o cualquier otra fitasa parental; no más de 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, o no más de 110

modificaciones en comparación con la SEQ ID NO: 2 o cualquier otra fitasa parental; no más de 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, o no más de 120 modificaciones en comparación con la SEQ ID NO: 2 o cualquier otra fitasa parental; o no más de 121, 122, 123 o 124 modificaciones en comparación con la SEQ ID NO: 2 o cualquier otra fitasa parental.

5 **Numeración de las posiciones**

[0100] La nomenclatura usada en la presente para definir posiciones de aminoácidos se basa en la secuencia de aminoácidos de la fitasa derivada de *Citrobacter braakii* ATCC 51113, la secuencia madura de la cual se proporciona en el listado de secuencias como SEQ ID NO: 2 (aminoácidos 1-411 de la SEQ ID NO: 2). Por consiguiente, en el presente contexto, la base para numerar posiciones es la SEQ ID NO: 2 que empieza en E1 y acaba en E411.

[0101] Cuando se usa en la presente el término parte (o secuencia) "madura" se refiere a esa parte del polipéptido que se segrega por una célula que contiene, como parte de su equipamiento genético, un polinucleótido que codifica el polipéptido. En otras palabras, la parte de polipéptido madura se refiere a esa parte del polipéptido que permanece después de que la parte de péptido señal, así como una parte de propéptido, si la hay, se haya escindido. La parte de péptido señal se puede predecir mediante programas conocidos en la técnica (por ejemplo, SignalP). La parte de péptido señal esperada de la SEQ ID NO: 2 se incluye en el presente listado de secuencias como SEQ ID NO: 8, que está codificada por la SEQ ID NO: 7. La SEQ ID NO: 2 es la parte madura esperada. Generalmente, el primer aminoácido de la parte madura de una enzima se puede determinar por secuenciación N-terminal de la enzima purificada. Cualquier diferencia entre la parte de péptido señal y la parte madura tiene que deberse entonces a la presencia de un propéptido.

Modificaciones, tales como sustituciones, deleciones, inserciones

[0102] Una variante de fitasa puede comprender varios tipos de modificaciones con respecto a un molde (es decir, una secuencia de aminoácidos de referencia o comparativa tal como la SEQ ID NO: 2): un aminoácido se puede sustituir por otro aminoácido; un aminoácido se puede eliminar; un aminoácido se puede insertar; así como cualquier combinación de cualquier número de tales modificaciones. En el presente contexto, el término "inserción" se destina a cubrir también extensiones N- y/o C-terminales.

[0103] La nomenclatura general usada en la presente para una modificación única es la siguiente: XDcY, donde "X" e "Y" designan independientemente un código de aminoácidos de una sola letra, o un "*" (delección de un aminoácido), "D" designa un número, y "c" designa un contador alfabético (a, b, c, etcétera), que solo está presente en las inserciones. Se hace referencia a la tabla 1 a continuación que describe ejemplos puramente hipotéticos de la aplicación de esta nomenclatura a varios tipos de modificaciones.

Tabla 1

Tipo	Descripción	Ejemplo
Sustitución	X = aminoácido en el molde D = posición en el molde, c vacía Y = aminoácido en la variante	G80A 80 AALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSG : AALNNSIAVLGVAPSAELYAVKVLGASGSG
Inserción	X = "*" D = posición en el molde antes de la inserción, c = "a" para la primera inserción en esta posición, "b" para la siguiente, etc.	*80aT *80BY *85aS 80 85 AALNNSIG..VLGVA.PSAELYAVKVLGASG AALNNSIGTYVLGVASPSAELYAVKVLGAS G
Delección	X = aminoácido en el molde	V81*

	D = posición en el molde, c vacía Y="**"	80 AALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSG AALNNSIG.LGVAPSAELYAVKVLGASGSG
Extensión N-terminal	Inserciones en la posición "0".	*0aA *0bT *0cG 1 ...AQSVPWGISRVQ ATGAQSVPWGISRVQ
Extensión C-terminal	Inserciones después del aminoácido N-terminal.	*275aS *275bT 270 275 ATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR.. ATSLGSTNLYGSGLVNAEAATRST

[0104] Como se ha explicado anteriormente, el número de posición ("D") se cuenta desde el primer residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 2.

5 [0105] Varias modificaciones en la misma secuencia se separan con "/" (barra), por ejemplo, la designación "1*/2*/3*" significa que los aminoácidos en el número de posición 1, 2 y 3 se han eliminado todos, y la designación "104A/105F" significa que el aminoácido en el número de posición 104 está sustituido por A y el aminoácido en el número de posición 105 está sustituido por F.

[0106] Las modificaciones alternativas se separan con "," (coma), por ejemplo, la designación "119R,K" significa que el aminoácido en la posición 119 se sustituye por R o K.

10 [0107] Las comas usadas en la presente en varias otras enumeraciones de posibilidades significan lo que hacen de manera habitual gramaticalmente, es decir, a menudo y/o. Por ejemplo, la primera coma en el listado "53V,Q, 121D y/o 167Q" denota una alternativa (V o Q), mientras que las comas siguientes deben interpretarse como opciones y/o: 53 V o Q, y/o 121D y/o 167Q.

15 [0108] En el presente contexto, "al menos un/uno/una" (por ejemplo, modificación) significa una o más, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones; o 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 25, 28 o 30 modificaciones; etcétera, hasta un número máximo de modificaciones de 125, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o de 200. Las variantes de fitasa de la invención, sin embargo, todavía tienen que ser al menos un 74% idénticas a la SEQ ID NO: 2, determinando este porcentaje como se ha descrito anteriormente.

[0109] Una sustitución o extensión sin ninguna indicación de con qué sustituir o extender se refiere a la inserción de cualquier aminoácido natural, o no natural, excepto el que ocupa esta posición en el molde.

20 [0110] El ejemplo 11 proporciona una ilustración adicional de cómo aplicar esta nomenclatura.

Identificación de los números de posición correspondientes

[0111] Como se ha explicado anteriormente, la fitasa madura de *Citrobacter braakii* ATCC 51113 (SEQ ID NO: 2) se usa como el estándar para la numeración de las posiciones y, así, también para la nomenclatura.

25 [0112] Para otra fitasa, en particular una variante de fitasa de la invención, la posición que corresponde a la posición D en la SEQ ID NO: 2 se encuentra alineando las dos secuencias como se ha especificado anteriormente en la sección titulada "Polipéptidos de fitasa, porcentaje de identidad". A partir del alineamiento, la posición en la secuencia de la invención que corresponde a la posición D de la SEQ ID NO: 2 puede identificarse claramente y sin ambigüedad (las dos posiciones una encima de la otra en el alineamiento).

[0113] El ejemplo 11 es un ejemplo de un alineamiento de la fitasa de SEQ ID NO: 2 y la fitasa de SEQ ID NO: 9, y el ejemplo ilustra cómo se identifican las posiciones correspondientes en estos dos esqueletos.

[0114] A continuación se incluyen algunos ejemplos adicionales, puramente hipotéticos, que derivan de la tabla 1 anterior que incluye en la tercera columna una serie de alineamientos de dos secuencias:

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

10 [0115] Considere ahora la tercera celda en la segunda fila de la tabla 1: la secuencia superior es de nuevo el molde, y la inferior, la variante. El número de posición 80 se refiere de nuevo al residuo de aminoácido G en el molde. La variante tiene dos inserciones, es decir, TY, después de G80 y antes de V81 en el molde. Mientras que la T y la Y tendrían por supuesto su propio número de posición "real" en la secuencia de aminoácidos variante, para los presentes fines nos referimos siempre a los números de posición del molde, y, por consiguiente, se dice que la T y la Y están en el número de posición 80a y 80b, respectivamente.

15 [0116] Finalmente, considere la tercera celda en la última fila de la tabla 1: el número de posición 275 se refiere al último aminoácido del molde. Una extensión C-terminal de ST se dice que está en el número de posición 275a y 275b, respectivamente, aunque, de nuevo, por supuesto tienen su propio número de posición "real" en la secuencia de aminoácidos variante.

Propiedades modificadas, fitasa de referencia

20 [0117] En un aspecto particular, el método de la invención para producir variantes de fitasa proporciona variantes que tienen propiedades modificadas, preferiblemente mejoradas.

[0118] Los términos "modificado(s)/modificada(s)/se modifica(n)" y "mejorado(s)/mejorada(s)/se mejoran/mejoró" implican una comparación con otra fitasa. Ejemplos de esas otras fitasas, de referencia o comparativas, son: la SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 6. Otros ejemplos más de fitasas de referencia pueden ser la SEQ ID NO: 3 y/o la SEQ ID NO: 4. Otro ejemplo más de una fitasa de referencia puede ser la SEQ ID NO: 9 y variantes de la misma.

25 [0119] Ejemplos no limitativos de propiedades que se modifican, preferiblemente se mejoran, son las siguientes: termoestabilidad, perfil de pH, actividad específica, rendimiento en alimento para animales, estabilidad a la granulación, sensibilidad a proteasas y/o patrón de glicosilación. Las variantes de fitasa producidas por el método de la divulgación presentan una termoestabilidad mejorada y también pueden tener un perfil de temperatura modificado, preferiblemente mejorado, y/o puede incorporar un cambio de un sitio potencial de escisión por proteasa.

30

Rendimiento térmico,

Estabilidad a la temperatura,

35 [0120] La estabilidad a la temperatura se puede determinar como se describe en el ejemplo 3 determinando la actividad durante 30 minutos de incubación a temperaturas de 60 °C o mayores y comparando con un experimento de referencia realizado a 37 °C.

Termoestabilidad

40 [0121] La termoestabilidad se puede determinar como se describe en el ejemplo 4, es decir, usando mediciones de DSC para determinar la temperatura de desnaturalización, Td, de la proteína de fitasa purificada. La Td es indicativa de la termoestabilidad de la proteína: cuanto mayor es la Td, mayor es la termoestabilidad. Por consiguiente, en una forma de realización preferida, la fitasa de la invención tiene una Td que es mayor que la Td de una fitasa de referencia, donde la Td se determina en muestras de fitasa purificada (preferiblemente con una pureza de al menos un 90% o un 95%, determinada por SDS-PAGE).

Estabilidad térmica,

45 [0122] La estabilidad térmica se puede determinar como se describe en el ejemplo 5 determinando el perfil de temperatura/actividad de las variantes de fitasa.

Estabilidad al vapor.

[0123] La estabilidad al vapor se puede determinar como se describe en el ejemplo 7 determinando la actividad residual de moléculas de fitasa después de un tratamiento con vapor a 85 °C o 90 °C durante un tiempo corto.

Estabilidad a la granulación.

5 [0124] La estabilidad a la granulación se puede determinar como se describe en el ejemplo 8 usando un granulado enzimático premezclado con alimento. Esta premezcla se mezcla con alimento. Del mezclador, el alimento se acondiciona con vapor a 95°C. Después del acondicionamiento, el alimento se prensa en gránulos y se determina la actividad residual.

10 [0125] En aspectos preferidos, las propiedades térmicas tales como la estabilidad térmica, la estabilidad a la temperatura, la termoestabilidad, la estabilidad al vapor y/o la estabilidad a la granulación como se proporciona por la actividad residual, la Td u otro parámetro de la fitasa de la invención es mayor que el valor correspondiente, como la actividad residual o la Td, de la fitasa de SEQ ID NO: 2, más preferiblemente al menos un 101% de la misma, o al menos un 102%, 103%, 104%, 105%, 106%, 107%, 108%, 109% o al menos un 110% de la misma. Aún más preferiblemente, el valor del parámetro, tal como la actividad residual o la Td, de la fitasa de la invención es al menos un 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180% o al menos un 190% del valor para la fitasa de SEQ ID NO: 2.

15 [0126] En otros aspectos particulares más, la fitasa termoestable de la invención tiene una temperatura de fusión, Tm (o una temperatura de desnaturalización, Td), como se determina usando la calorimetría diferencial de barrido (DSC) como se describe en los ejemplos (es decir, en 20 mM de acetato sódico, pH 4,0), de al menos 50°C. En otros aspectos particulares más, la Tm es de al menos 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 62.5, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o de al menos 100°C. Las mediciones de DSC también se pueden realizar como se describe en los ejemplos.

Perfil de temperatura/estabilidad a la temperatura.

25 [0127] Si una fitasa de la invención tiene o no un perfil de temperatura modificado en comparación con una fitasa de referencia se puede determinar como se describe en el ejemplo 5. Por consiguiente, en un aspecto particular, la fitasa de la divulgación tiene un perfil de temperatura modificado en comparación con una fitasa de referencia, donde el perfil de temperatura se determina como la actividad de fitasa en función de la temperatura sobre fitato de sodio a pH 5,5 en el rango de temperatura de 20-90°C (en pasos de 10°C). Un tampón preferido es 0,25 M de tampón de acetato de sodio a pH 5,5. La actividad a cada temperatura se indica preferiblemente como actividad relativa (en %) normalizada al valor a la temperatura óptima. La temperatura óptima es esa temperatura de entre las temperaturas evaluadas (es decir, aquellas con saltos de 5-10°C) donde la actividad es máxima.

Perfil de pH

35 [0128] Si una fitasa de la divulgación tiene o no un perfil de pH alterado en comparación con una fitasa de referencia se puede determinar como se describe en los ejemplos. Por consiguiente, en un aspecto particular, la fitasa de la invención tiene un perfil de pH alterado en comparación con una fitasa de referencia, donde el perfil de pH se determina como actividad de fitasa en función de pH sobre fitato de sodio a 37°C en el rango de pH de 2,0 a 7,5 (en pasos de 0,5 unidades de pH). Un tampón preferido es un cóctel de 50 mM de glicina, 50 mM de ácido acético y 50 mM de Bis-Tris. La actividad a cada pH se indica preferiblemente como actividad relativa (en %) normalizada al valor al pH óptimo.

40 [0129] Un ejemplo de un perfil de pH alterado es donde la curva de pH (actividad relativa en función del pH) se desplaza hacia un pH mayor, o menor. Las sustituciones preferidas proporcionan un cambio de 0,5 unidades de pH hacia un pH mayor en comparación con la fitasa de referencia de SEQ ID NO: 2. Sin embargo, para determinados fines puede preferirse proporcionar un cambio de 0,5 unidades de pH hacia un pH menor en comparación con la fitasa de referencia de SEQ ID NO: 2.

[0130] Otro ejemplo de un perfil de pH alterado es donde se cambia el pH óptimo, en sentido ascendente o descendente.

[0131] En un aspecto particular, la fitasa de la divulgación tiene un perfil de pH alterado en comparación con una fitasa de referencia. Más en particular, el perfil de pH se modifica en el rango de pH de 3,5-5,5. Aún más en

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

Actividad específica

5 [0132] En un aspecto particular, la fitasa de la divulgación tiene una actividad específica mejorada con respecto a una fitasa de referencia. Más en particular, la actividad específica de una fitasa de la invención es de al menos un 105%, con respecto a la actividad específica de una fitasa de referencia determinada por el mismo procedimiento. En otros aspectos particulares más, la actividad específica relativa es de al menos un 110, 115, 120, 125, 130, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 350 o incluso un 400%, todavía con respecto a la actividad específica de la fitasa de referencia determinada por el mismo procedimiento.

10 [0133] En la alternativa, el término actividad específica alta se refiere a una actividad específica de al menos 200 FYT/mg de proteína enzimática (PE). En formas de realización particulares, la actividad específica es de al menos 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 o 3000 FYT/mg de PE.

15 [0134] La actividad específica se mide en muestras altamente purificadas (un gel de poliacrilamida SDS debería mostrar la presencia solo de un componente). La concentración de proteína enzimática se puede determinar por análisis de aminoácidos, y la actividad de fitasa en unidades de FYT, determinarse como se describe en el ejemplo 1. La actividad específica es una característica de la variante de fitasa específica en cuestión y se calcula como la actividad de fitasa medida en unidades FYT por mg de proteína enzimática de variante de fitasa. Véanse los ejemplos para más detalles.

20 Rendimiento en alimento para animales

[0135] En un aspecto particular, la fitasa de la divulgación tiene un rendimiento mejorado en alimento para animales en comparación con una fitasa de referencia. El rendimiento en alimento para animales se puede determinar por el modelo *in vitro* indicado en los ejemplos. Por consiguiente, en un aspecto preferido, la fitasa de la invención tiene un rendimiento mejorado en alimento para animales, donde el rendimiento se determina en un modelo *in vitro* preparando muestras de alimento compuestas por un 30% de harina de soja y un 70% de harina de maíz con CaCl₂ añadido a una concentración de 5 g de calcio por kg de alimento; preincubándolas a 40°C y pH 3,0 durante 30 minutos seguido de la adición de pepsina (3000 U/g de alimento) y fitasa; incubando las muestras a 40°C y pH 3,0 durante 60 minutos seguido de pH 4,0 durante 30 minutos; parando las reacciones; extrayendo el ácido fítico y los fosfatos de inositol mediante la adición de HCl a una concentración final de 0,5 M y la incubación a 40°C durante 2 horas, seguido de un ciclo de congelación-descongelación y 1 hora de incubación a 40°C; separando el ácido fítico y los fosfatos de inositol por cromatografía iónica de alto rendimiento; determinando la cantidad de fósforo de fitato (IP6-P) residual; calculando la diferencia de IP6-P residual entre una muestra tratada con fitasa y un blanco no tratado con fitasa (esta diferencia es IP6-P degradado); y expresando el IP6-P degradado de la fitasa de la invención con respecto al IP6-P degradado de la fitasa de referencia.

35 [0136] La fitasa de la divulgación y la fitasa de referencia se dosifican por supuesto en la misma cantidad, preferiblemente en función de las unidades de actividad de fitasa (FYT). Una dosificación preferida es 125 FYT/kg de alimento. Otra dosificación preferida es 250 FYT/kg de alimento. Las fitasas se pueden dosificar en forma de fitasas purificadas o en forma de sobrenadantes de fermentación. Las fitasas purificadas tienen preferiblemente una pureza de al menos un 95%, determinada por SDS-PAGE.

40 [0137] En aspectos preferidos, el valor de IP6-P degradado de la fitasa purificada de la invención, con respecto al valor de IP6-P degradado de la fitasa de referencia, es de al menos un 101%, o de al menos un 102%, 103%, 104%, 105%, 110%, 115% o de al menos un 120%. En otras formas de realización preferidas más, el valor de IP6-P degradado de la fitasa purificada de la invención, con respecto al valor de IP6-P degradado de la fitasa de referencia, es de al menos un 125%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190% o de al menos un 200%. Preferiblemente, el valor de IP6-P degradado de la fitasa de la invención, con respecto al valor de IP6-P degradado de la fitasa de SEQ ID NO: 2, es de al menos un 105%, 110%, 113%, 115%, 120%, 125% o de al menos un 130%.

[0138] El rendimiento relativo de una fitasa de la divulgación también se puede calcular como el porcentaje del fósforo liberado por la fitasa de referencia.

50 [0139] En aún otro aspecto particular, el rendimiento relativo de la fitasa de la invención se puede calcular como el porcentaje del fósforo liberado por la fitasa de la invención, con respecto a la cantidad de fósforo liberado por la fitasa de referencia.

[0140] En otros aspectos particulares más, el rendimiento relativo de la fitasa de la invención es de al menos un 105%, preferiblemente de al menos un 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o de al menos un 200%.

Estabilidad al vapor

5 [0141] La termoestabilidad es un parámetro importante, pero asociado a que también la estabilidad al vapor es importante. En este aspecto se hace referencia al ejemplo 8 a continuación.

Variantes hipoalergénicas

10 [0142] En un aspecto específico, las variantes de fitasa producidas por el método de la presente invención son (también) variantes hipoalergénicas, diseñadas para causar una respuesta inmunitaria reducida cuando se exponen a animales, incluido el ser humano. El término respuesta inmunitaria debe entenderse como cualquier reacción del sistema inmunitario de un animal expuesto a la variante de fitasa. Un tipo de respuesta inmunitaria es una respuesta alérgica que conduce a niveles aumentados de IgE en el animal expuesto. Se pueden preparar variantes hipoalergénicas usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la variante de fitasa se puede conjugar con fracciones poliméricas que protegen partes o epítopos de la variante de fitasa implicada en una respuesta inmunitaria. La conjugación con polímeros puede implicar un acoplamiento químico de polímero *in vitro* a la variante de fitasa, por ejemplo, como se describe en WO 96/17929, WO 98/30682, WO 98/35026 y/o WO 99/00489. La conjugación puede además o alternativamente implicar un acoplamiento *in vivo* de polímeros a la variante de fitasa. Tal conjugación se puede conseguir por ingeniería genética de la secuencia de nucleótidos que codifica la variante de fitasa, insertando secuencias de consenso que codifican sitios de glicosilación adicionales en la variante de fitasa y que expresan la variante de fitasa en un huésped capaz de glicosilar la variante de fitasa, véase, por ejemplo, WO 00/26354. Otra manera de proporcionar variantes hipoalergénicas es mediante ingeniería genética de la secuencia de nucleótidos que codifica la variante de fitasa para hacer que las variantes de fitasa se autooligomericen, haciendo que los monómeros de la variante de fitasa puedan proteger los epítopos de otros monómeros de variante de fitasa y reducir así la antigenicidad de los oligómeros. Tales productos y su preparación se describen, por ejemplo, en WO 96/16177. Se pueden identificar epítopos implicados en una respuesta inmunitaria por varios métodos tales como el método de presentación en fagos descrito en WO 00/26230 y WO 01/83559 o el método aleatorio descrito en EP 561907. Una vez que se ha identificado un epítipo, su secuencia de aminoácidos se puede alterar para producir propiedades inmunológicas alteradas de la variante de fitasa por técnicas de manipulación génica conocidas tales como la mutagénesis dirigida al sitio (véase, por ejemplo, WO 00/26230, WO 00/26354 y/o WO 00/22103) y/o la conjugación de un polímero se puede realizar a una proximidad al epítipo suficiente para que el polímero proteja el epítipo.

Secuencias y constructos de ácido nucleico

[0143] La presente invención también se refiere a secuencias de ácido nucleico que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de fitasa de la invención.

35 [0144] El término "secuencia de ácido nucleico aislada" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que está esencialmente libre de otras secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, al menos aproximadamente 20% pura, preferiblemente al menos aproximadamente 40% pura, más preferiblemente al menos aproximadamente 60% pura, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 80% pura y más preferiblemente al menos aproximadamente 90% pura determinada por electroforesis de agarosa. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico aislada se puede obtener por procedimientos de clonación estándares usados en ingeniería genética para recolocar la secuencia de ácido nucleico desde su ubicación natural hasta un sitio diferente donde se reproducirá. Los procedimientos de clonación pueden implicar la escisión y el aislamiento de un fragmento de ácido nucleico deseado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido, la inserción del fragmento en una molécula de vector, y la incorporación del vector recombinante en una célula huésped donde se replicarán múltiples copias o clones de la secuencia de ácido nucleico. La secuencia de ácido nucleico puede ser de origen genómico, de ADNc, de ARN, semisintético, sintético o cualquier combinación de los mismos.

40 [0145] Las secuencias de ácido nucleico de la divulgación se pueden preparar introduciendo al menos una mutación en una secuencia molde que codifica una fitasa o una subsecuencia de la misma, donde la secuencia de ácido nucleico mutante codifica una variante de fitasa. La introducción de una mutación en la secuencia de ácido nucleico para intercambiar un nucleótido por otro nucleótido se puede realizar por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio, por mutagénesis aleatoria o por mutagénesis aleatoria localizada, dopada o enriquecida.

50 [0146] La mutagénesis aleatoria se realiza adecuadamente bien como mutagénesis aleatoria localizada o específica de la región en al menos tres partes del gen que se traduce a la secuencia de aminoácidos mostrada en cuestión, o bien en el gen entero. Cuando la mutagénesis se realiza usando un oligonucleótido, el oligonucleótido se puede

5 dopar o enriquecer con los tres nucleótidos no parentales durante la síntesis del oligonucleótido en las posiciones que se van a cambiar. El dopaje o enriquecimiento se puede realizar de modo que se eviten los codones para los aminoácidos no deseados. El oligonucleótido dopado o enriquecido se puede incorporar en el ADN que codifica la enzima fitasa por cualquier técnica, usando, por ejemplo, la PCR, la LCR o cualquier polimerasa y ligasa de ADN que se crea apropiada.

10 [0147] Preferiblemente, el dopaje se realiza usando "dopaje aleatorio constante", donde se predefine el porcentaje de tipo salvaje y de mutación en cada posición. Además, el dopaje se puede dirigir hacia una preferencia por la introducción de determinados nucleótidos y, así, una preferencia por la introducción de uno o más residuos de aminoácidos específicos. El dopaje puede realizarse, por ejemplo, para permitir la introducción de un 90% de tipo salvaje y un 10% de mutaciones en cada posición. Una consideración adicional en la elección de un esquema de dopaje se basa en limitaciones genéticas, así como de la estructura de proteínas.

[0148] La mutagénesis aleatoria se puede localizar ventajosamente en una parte de la fitasa parental en cuestión. Esto puede, por ejemplo, ser ventajoso cuando determinadas regiones de la enzima se han identificado como de particular importancia para una propiedad dada de la enzima.

15 [0149] Los métodos alternativos para proporcionar variantes de la invención incluyen la transposición génica, por ejemplo, como se describe en WO 95/22625 o en WO 96/00343, y el proceso de derivación de consenso como se describe en EP 897985.

Constructos de ácido nucleico

20 [0150] Un constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico de la presente descripción unida operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. Se entenderá que la expresión incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido que incluye, pero no se limita a, la transcripción, la modificación postranscripcional, la traducción, la modificación postraduccional y la secreción.

25 [0151] El término "constructo de ácido nucleico" como se utiliza en la presente se refiere a una molécula de ácido nucleico, mono- o bicatenario, que se aísla de un gen de origen natural o que se modifica para contener segmentos de ácido nucleico de manera que de otro modo no existiría en la naturaleza. El término constructo de ácido nucleico es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácido nucleico contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente divulgación.

30 [0152] El término "secuencias de control" se define en la presente para incluir todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o foránea a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden proporcionarse con conectores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten el ligamiento de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

40 [0153] El término "unido operativamente" denota en la presente una configuración donde una secuencia de control se coloca en una posición apropiada respecto a la secuencia codificante de la secuencia de polinucleótido de manera que la secuencia de control dirija la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

45 [0154] Cuando se usa en la presente, el término "secuencia codificante" (CDS) significa una secuencia de nucleótidos que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteico. Los límites de la secuencia codificante están determinados generalmente por un marco de lectura abierto, que empieza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG. La secuencia codificante puede ser ADN, ADNc o una secuencia de nucleótidos recombinante.

Vector de expresión

[0155] El término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido que incluye, pero no se limita a, la transcripción, la modificación postranscripcional, la traducción, la modificación postraduccional y la secreción.

[0156] El término "vector de expresión" se define en la presente como una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención y que está operativamente unida a nucleótidos adicionales que proveen a su expresión.

5 [0157] Una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de fitasa de la invención se puede expresar usando un vector de expresión que incluye típicamente secuencias de control que codifican un promotor, un operador, un sitio de unión al ribosoma, una señal de iniciación de la traducción y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores.

10 [0158] El vector de expresión recombinante que lleva la secuencia de ADN que codifica una variante de fitasa de la divulgación puede ser cualquier vector que pueda someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector a menudo dependerá de la célula huésped en la que deba introducirse. El vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el o los cromosoma(s) donde se ha integrado.

15 [0159] La variante de fitasa también se puede coexpresar con al menos otra enzima de interés para alimento para animales, tal como una fitasa, fosfatasa, xilanas, galactanasa, alfa-galactosidasa, proteasa, fosfolipasa, amilasa y/o beta-glucanasa. Las enzimas se pueden coexpresar a partir de distintos vectores, de un vector o usando una mezcla de ambas técnicas. Cuando se usan vectores diferentes, los vectores pueden tener marcadores seleccionables diferentes y diferentes orígenes de replicación. Cuando se usa solo un vector, los genes se pueden expresar a partir de uno o más promotores. Si se clonan bajo la regulación de un promotor (di- o multicistrónico), el orden con el que los genes se clonan puede afectar a los niveles de expresión de las proteínas. La variante de fitasa también se puede expresar como una proteína de fusión, es decir, que el gen que codifica la variante de fitasa se ha fusionado en el marco con el gen que codifica otra proteína. Esta proteína puede ser otra enzima o un dominio funcional de otra enzima.

20

Células huésped

25 [0160] El término "célula huésped", como se utiliza en la presente, incluye cualquier tipo celular que es susceptible a una transformación, transfección, transducción y similares con un constructo de ácido nucleico que comprende un polinucleótido de la presente descripción.

30 [0161] La presente descripción también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención, que son ventajosamente usadas en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula parental que no es idéntica a la célula parental debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

35 [0162] La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procarionta, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota.

40 [0163] Microorganismos unicelulares útiles son células bacterianas tales como bacterias grampositivas que incluyen, pero no se limitan a, una célula de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*; o una célula de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* y *Streptomyces murinus*, o bacterias gramnegativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas* sp. En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. En otro aspecto preferido, la célula de *Bacillus* es un *Bacillus* alcalófilo.

45 [0164] La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana puede, por ejemplo, realizarse mediante transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), usando células competentes (véase, por ejemplo, Young y Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751) o conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

50 [0165] La célula huésped también puede ser una eucariota, tal como una célula de mamíferos, de insectos, vegetal o fúngica.

5 [0166] En un aspecto preferido, la célula huésped es una célula fúngica. Los "hongos" como se utiliza en la presente incluyen los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota (como se definen en Hawkswort et al., In, Ainswort and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido), así como los hongos Oomycota (como se cita en Hawkswort et al., 1995, *supra*, página 171) y todos los mitospóricos (Hawkswort et al., 1995, *supra*).

10 [0167] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. La "levadura" como se utiliza en la presente incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporógena y levadura perteneciente a los *Fungi Imperfecti* (Blastomycetes). Debido a que la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, se define levadura como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M. y Davenport, R.R., eds., Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

[0168] En un aspecto aún más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

15 [0169] En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

20 [0170] En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula fúngica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como se definen en Hawkswort et al., 1995, *supra*). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo se produce por alargamiento hifal y el catabolismo del carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo de levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* se produce por gemación de un talo unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo.

25 [0171] En un aspecto aún más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

30 [0172] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de cepas de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa* o *Ceriporiopsis subvermispura*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

45 [0173] Las células fúngicas se pueden transformar mediante un proceso que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Se describen procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* en EP 238 023 y Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474. Se describen métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* en Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156 y WO 96/00787. Se puede transformar levadura utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, volumen 194, pp. 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

Métodos de producción

[0174] La presente descripción se refiere a métodos para producir una variante de fitasa que comprende (a) el cultivo de una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción de la fitasa; y (b) la recuperación de la fitasa.

5 [0175] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar mediante cultivo en matraces de agitación y fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentaciones en continuo, por lotes, por lotes alimentados o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizada en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan que el polipéptido sea expresado y/o aislado. El cultivo tiene lugar en un medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no se segrega, se puede recuperar de lisados celulares.

15 [0176] El polipéptido resultante puede recuperarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

20 [0177] Los polipéptidos de la presente descripción se pueden purificar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

Plantas transgénicas

25 [0178] La presente descripción también se refiere a una planta transgénica, parte de una planta o célula vegetal que se ha transformado con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad de fitasa de la presente descripción para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido se puede recuperar de la planta o parte de una planta. Alternativamente, la planta o parte de una planta que contiene el polipéptido recombinante se puede usar como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, mejorar el valor nutricional, la palatabilidad y las propiedades reológicas o para destruir un factor antinutritivo.

[0179] En un aspecto particular, el polipéptido se dirige a las vacuolas de almacenamiento del endospermo en semillas. Esto se puede obtener sintetizándolo como un precursor con un péptido señal adecuado, véase Horvath et al en PNAS, Feb. 15, 2000, vol. 97, nº 4, p. 1914-1919.

35 [0180] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicotiledón) o monocotiledónea (una monocotiledón) o variantes manipuladas a partir de las mismas. Ejemplos de plantas monocotiledóneas son las hierbas, tales como la poa de los prados (pasta azul, *Poa*), hierbas forrajeras tales como *Festuca*, *Lolium*, hierbas de zonas templadas, tales como *Agrostis*, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, triticale (híbrido estabilizado de trigo (*Triticum*) y centeno (*Secale*), y maíz. Ejemplos de plantas dicotiledóneas son el tabaco, las leguminosas, tales como el girasol (*Helianthus*), el algodón (*Gossypium*), los altramuces, la patata, la remolacha azucarera, el guisante, la judía y la soja, y plantas crucíferas (familia Brassicaceae), tales como la coliflor, la semilla de colza, y el organismo modelo estrechamente relacionado *Arabidopsis thaliana*. Las plantas con bajo contenido de fitato como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 5,689,054 y la patente de EE.UU. n.º 6,111,168 son ejemplos de plantas manipuladas.

45 [0181] Ejemplos de partes de plantas son el tallo, los callos, las hojas, la raíz, los frutos, las semillas y los tubérculos, así como los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo, la epidermis, el mesófilo, el parénquima, los tejidos vasculares, los meristemos. También los compartimentos específicos de las células vegetales, tales como el cloroplasto, el apoplasto, la mitocondria, la vacuola, los peroxisomas y el citoplasma se consideran parte de una planta. Además, cualquier célula vegetal, cualquiera que sea el origen del tejido, se considera una parte de una planta. Asimismo, partes de planta tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la invención también se consideran partes de plantas, por ejemplo, los embriones, los endospermos, la aleurona y los tegumentos.

[0182] También se incluyen dentro del alcance de la presente descripción la progenie de tales plantas, partes de plantas y células vegetales.

[0183] La planta o la célula vegetal transgénica que expresa un polipéptido de la presente descripción se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. Brevemente, la planta o la célula vegetal se construye incorporando uno o más constructos de expresión que codifican un polipéptido de la presente invención en el genoma de la planta huésped y propagando la planta o la célula vegetal modificada resultante en una planta o una célula vegetal transgénica.

[0184] Convenientemente, el constructo de expresión es un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención unida operativamente con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión de la secuencia de ácido nucleico en la planta o parte de una planta de elección. Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable útil para identificar células huésped en las que se ha integrado el constructo de expresión y secuencias de ADN necesarias para la introducción del constructo en la planta en cuestión (esto último depende del método para la introducción de ADN que se vaya a utilizar).

[0185] La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y terminadoras y, opcionalmente, secuencias señal o de tránsito se determinan, por ejemplo, en función de cuándo, dónde y cómo se desea que se exprese el polipéptido. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser constitutiva o inducible, o puede ser específica del desarrollo, la fase o el tejido, y el producto génico puede dirigirse a un compartimento celular, un tejido o una parte de una planta específicos tales como las semillas o las hojas. Se describen secuencias reguladoras, por ejemplo, en Tague et al., 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

[0186] Para la expresión constitutiva, se pueden usar los siguientes promotores: el promotor 35S-CaMV (Franck et al., 1980, *Cell* 21: 285-294), el de la ubiquitina-1 del maíz (Christensen AH, Sharrock RA y Quail 1992. *Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation*) o el promotor de la actina 1 del arroz (*Plant Mo. Biol.* 18, 675-689.; Zhang W, McElroy D. y Wu R 1991, *Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants.* *Plant Cell* 3, 1155-1165). Los promotores específicos de un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata y frutos (Edwards & Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos tales como los meristemas (Ito et al., 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), un promotor específico de semillas como el promotor de la glutelina, la prolamina, la globulina o la albúmina del arroz (Wu et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* de la legumina B4 y el gen desconocido de la proteína de semilla de *Vicia faba* (Conrad et al., 1998, *Journal of Plant Physiology* 152: 708-711), un promotor de una proteína del cuerpo oleoso de semillas (Chen et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 935-941), el promotor de la proteína de almacenamiento napA de *Brassica napus* o cualquier otro promotor específico de semillas conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor *rbcS* de arroz o de tomate (Kozuka et al., 1993, *Plant Physiology* 102: 991-1000), el promotor del gen de la adenina metiltransferasa del virus de *Chlorella* (Mittra y Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93), o el promotor del gen *aldP* del arroz (Kagaya et al., 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668-674), o un promotor inducible por heridas como el promotor *pin2* de la patata (Xu et al., 1993, *Plant Molecular Biology* 22: 573-588). Asimismo, el promotor puede ser inducible por tratamientos abióticos tales como la temperatura, la sequía o las modificaciones de la salinidad o inducible por sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, por ejemplo, el etanol, los estrógenos, las hormonas vegetales como el etileno, el ácido abscísico, el ácido giberélico y/o los metales pesados.

[0187] También se puede usar un elemento potenciador del promotor para conseguir una expresión más alta del polipéptido en la planta. Por ejemplo, el elemento potenciador del promotor puede ser un intrón que se coloca entre el promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, en Xu et al., 1993, *supra* se describe el uso del primer intrón del gen de la actina 1 del arroz para aumentar la expresión.

[0188] Además, el uso de codones se puede optimizar para la especie vegetal en cuestión para aumentar la expresión (véase Horvath et al referida anteriormente).

[0189] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes del constructo de expresión se pueden elegir de aquellos disponibles en la técnica.

[0190] El constructo de ácido nucleico se incorpora en el genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo la transformación mediada por *Agrobacterium*, la transformación mediada por virus, la microinyección, el bombardeo de partículas, la transformación biolística y la electroporación (Gasser et al., 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto et al., 1989, *Nature* 338: 274).

[0191] Actualmente, la transferencia génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método de elección para generar dicotiledóneas transgénicas (para una revisión, véase Hooykas y Schilperoort, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 15-38), y también se puede usar para transformar monocotiledóneas, aunque se usan con mayor

[0201] El término alimento o composición de alimento significa cualquier compuesto, preparación, mezcla o composición adecuada para o destinada a la ingesta por un animal.

[0202] En el uso según la divulgación se puede suministrar el polipéptido al animal antes de, después de o simultáneamente con la dieta. Se prefiere esto último.

5 [0203] En un aspecto particular, el polipéptido, en la forma en la que se añade al alimento, o cuando se incluye en un aditivo para el alimento, es sustancialmente puro. En un aspecto particular está bien definido. El término "bien definido/a(s)" significa que la preparación de fitasa es al menos 50% pura como se determina por cromatografía de exclusión por tamaños (véase el ejemplo 12 de WO 01/58275). En otras formas de realización particulares, la preparación de fitasa es al menos 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94 o al menos 95% pura como se determina por este método.

[0204] Una preparación de polipéptido sustancialmente pura y/o bien definida es ventajosa. Por ejemplo, es mucho más fácil dosificar correctamente en el alimento un polipéptido que está esencialmente libre de interferir o contaminar otros polipéptidos. El término dosificar correctamente se refiere en particular al objetivo de obtener resultados consistentes y constantes y a la capacidad de optimizar la dosificación en función del efecto deseado.

15 [0205] Para el uso en alimento para animales, sin embargo, el polipéptido de fitasa de la divulgación no necesita ser tan puro; puede, por ejemplo, incluir otros polipéptidos, en cuyo caso podría denominarse una preparación de fitasa.

20 [0206] La preparación de fitasa se puede (a) añadir directamente al alimento (o usarse directamente en un proceso de tratamiento de proteínas), o (b) se puede usar en la producción de una o más composiciones intermedias tales como aditivos alimentarios o premezclas que se añaden posteriormente al alimento (o se usan en un proceso de tratamiento). El grado de pureza anteriormente descrito se refiere a la pureza de la preparación de polipéptido original, ya se use según las opciones anteriores (a) o (b).

25 [0207] Preparaciones de polipéptido con purezas de este orden de magnitud son obtenibles en particular usando métodos recombinantes de producción, mientras que no se obtienen tan fácilmente y también están sujetas a una mucha mayor variación entre lotes cuando el polipéptido se produce por métodos tradicionales de fermentación.

[0208] Tal preparación de polipéptido puede por supuesto mezclarse con otros polipéptidos.

[0209] El polipéptido se puede añadir al alimento en cualquier forma, ya sea como un polipéptido relativamente puro, o mezclado con otros componentes destinados a la adición a alimento para animales, es decir, en forma de aditivos alimentarios para animales, tales como las denominadas premezclas para alimento para animales.

30 [0210] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a composiciones para usar en alimento para animales, tal como alimento para animales, y aditivos alimentarios para animales, por ejemplo, premezclas.

[0211] Aparte del polipéptido de la divulgación, los aditivos alimentarios para animales de la divulgación contienen al menos una vitamina liposoluble y/o al menos una vitamina hidrosoluble y/o al menos un oligoelemento. El aditivo alimentario también puede contener al menos un macromineral.

35 [0212] Además, ingredientes de aditivo alimentario opcionales son agentes colorantes, por ejemplo, carotenoides tales como el beta-caroteno, la astaxantina y la luteína; compuestos aromáticos; estabilizadores; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados; especies generadoras de oxígeno reactivo; y/o al menos otro polipéptido seleccionado de entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); fosfatasa (EC 3.1.3.1; EC 3.1.3.2; EC 3.1.3.39); xilanasas (EC 3.2.1.8); galactanasas (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasas (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4.-.-), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, la alfa-amilasa (EC 3.2.1.1); y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

[0213] En un aspecto particular, estos otros polipéptidos están bien definidos (como se ha definido antes para las preparaciones de fitasa).

45 [0214] La fitasa de la divulgación también se puede combinar con otras fitasas, por ejemplo, fitasas de ascomicetos tales como fitasas de *Aspergillus*, por ejemplo, derivadas de *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*; o fitasas de basidiomicetos, por ejemplo, derivadas de *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Trametes pubescens* o *Paxillus involutus*; o derivados, fragmentos o variantes de las mismas que tienen actividad de fitasa.

- [0215] Así, en aspectos preferidos del uso en alimento para animales de la divulgación y en aspectos preferidos del aditivo alimentario para animales y el alimento para animales de la divulgación, la fitasa de la divulgación se combina con tales fitasas.
- 5 [0216] Ejemplos de péptidos antimicrobianos (PAM) son CAP18, leucocina A, tritripticina, protegrina-1, tanatina, defensina, lactoferrina, lactoferricina y ovispirina tal como novispirina (Robert Lehrer, 2000), plectasinas y estatinas, incluidos los compuestos y los polipéptidos descritos en WO 03/044049 y WO 03/048148, así como las variantes o los fragmentos de los anteriores que retienen actividad antimicrobiana.
- 10 [0217] Ejemplos de polipéptidos antifúngicos (PAF) son péptidos de *Aspergillus giganteus* y *Aspergillus niger*, así como las variantes y los fragmentos de los mismos que retienen actividad antifúngica, como se describe en WO 94/01459 y WO 02/090384.
- [0218] Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son ácidos grasos C18, C20 y C22 poliinsaturados, tales como el ácido araquidónico, el ácido docosahexaenoico, el ácido eicosapentanoico y el ácido gamma-linoleico.
- [0219] Ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son productos químicos tales como el perborato, el persulfato o el percarbonato; y polipéptidos tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.
- 15 [0220] Normalmente, las vitaminas lipo- e hidrosolubles, así como los oligoelementos forman parte de una denominada premezcla destinada a la adición al alimento, mientras que los macrominerales se añaden normalmente por separado al alimento. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando se enriquecen con un polipéptido de la invención, es un aditivo alimentario para animales de la invención.
- 20 [0221] En un aspecto particular, el aditivo alimentario para animales de la divulgación está destinado a incluirse (o prescrito como que tiene que incluirse) en dietas o alimento para animales en niveles del 0,01 al 10,0%; más particularmente del 0,05 al 5,0%; o del 0,2 al 1,0% (% referido a g de aditivo por 100 g de alimento). Esto es así en particular para las premezclas.
- [0222] Las siguientes son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:
Ejemplos de vitaminas liposolubles son la vitamina A, la vitamina D3, la vitamina E y la vitamina K, por ejemplo, la
25 vitamina K3.
- [0223] Ejemplos de vitaminas hidrosolubles son la vitamina B12, la biotina y la colina, la vitamina B1, la vitamina B2, la vitamina B6, la niacina, el ácido fólico y el pantotenato, por ejemplo, el Ca-D-pantotenato.
- [0224] Ejemplos de oligoelementos son el manganeso, el zinc, el hierro, el cobre, el yodo, el selenio y el cobalto.
- [0225] Ejemplos de macrominerales son el calcio, el fósforo y el sodio.
- 30 [0226] Los requisitos nutricionales de estos componentes (ejemplificados con aves y lechones/cerdos) se enumeran en la tabla A de WO 01/58275. Requisito nutricional significa que estos componentes deben proporcionarse en la dieta en las concentraciones indicadas.
- 35 [0227] En la alternativa, el aditivo alimentario para animales de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la tabla A de WO 01/58275. Al menos un(o/a) significa cualquiera de uno o más de uno, o dos, o tres, o cuatro, etcétera hasta los trece, o hasta los quince componentes individuales. Más específicamente, este al menos un componente individual se incluye en el aditivo de la invención en una cantidad tal que proporcione una concentración en el alimento dentro del rango indicado en la columna cuatro o la columna cinco o la columna seis de la tabla A.
- 40 [0228] La presente descripción también se refiere a composiciones de alimento para animales. Las composiciones de alimento o dietas para animales tienen un contenido relativamente alto de proteína. Las dietas para aves y cerdos pueden caracterizarse como se indica en la tabla B de WO 01/58275, columnas 2-3. Las dietas para pescado pueden caracterizarse como se indica en la columna 4 de esta tabla B. Además, tales dietas para pescado tienen normalmente un contenido de grasa bruta de 200-310 g/kg.
- [0229] WO 01/58275 corresponde a US 09/779334, que se incorpora por la presente por referencia.

- [0230] Una composición de alimento para animales según la divulgación tiene un contenido de proteína bruta de 50-800 g/kg, y además comprende al menos un polipéptido como se reivindica en la presente.
- 5 [0231] Además, o en la alternativa (al contenido de proteína bruta indicado anteriormente), la composición de alimento para animales de la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.
- 10 [0232] En aspectos particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína bruta, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína y/o lisina está dentro de cualquiera de los rangos 2, 3, 4 o 5 de la tabla B de WO 01/58275 (R. 2-5).
- [0233] La proteína bruta se calcula como nitrógeno (N) multiplicado por un factor 6,25, es decir, proteína bruta (g/kg) = N (g/kg) x 6,25. El contenido de nitrógeno se determina por el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14^a ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).
- 15 [0234] La energía metabolizable se puede calcular basándose en la publicación del NRC Nutrient requirements in swine, novena edición revisada 1988, subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council. National Academy Press, Washington, D.C., pp. 2-6, y la European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, Países Bajos. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.
- 20 [0235] El contenido dietético de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en dietas para animales completas se calcula basándose en tablas de alimentación tales como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.
- 25 [0236] En un aspecto particular, la composición de alimento para animales de la divulgación contiene al menos una proteína. La proteína puede ser una proteína animal, tal como harina de carne y huesos y/o harina de pescado; o puede ser una proteína vegetal. El término proteínas vegetales como se utiliza en la presente se refiere a cualquier compuesto, composición, preparación o mezcla que incluya al menos una proteína derivada o que se origina a partir de un vegetal, incluyendo proteínas modificadas y derivados de proteínas. En aspectos particulares, el contenido de proteína de las proteínas vegetales es de al menos un 10, 20, 30, 40, 50 o 60% (p/p).
- 30 [0237] Las proteínas vegetales se pueden derivar de fuentes de proteína vegetal, tales como leguminosas y cereales, por ejemplo, materiales de plantas de las familias Fabaceae (Leguminosae), Cruciferae, Chenopodiaceae y Poaceae, tales como harina de soja, harina de altramuces y harina de colza.
- [0238] En un aspecto particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia Fabaceae, por ejemplo, soja, altramuz, guisante o judía.
- 35 [0239] En otro aspecto particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia Chenopodiaceae, por ejemplo, remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinua.
- [0240] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son la colza, las semillas de girasol, las semillas de algodón y el repollo.
- [0241] La soja es una fuente de proteína vegetal preferida.
- 40 [0242] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son los cereales tales como la cebada, el trigo, el centeno, la avena, el maíz, el arroz, el triticale y el sorgo.
- [0243] En otros aspectos particulares más, la composición de alimento para animales de la divulgación contiene 0-80% de maíz; y/o 0-80% de sorgo; y/o 0-70% de trigo; y/o 0-70% de cebada; y/o 0-30% de avena; y/o 0-40% de harina de soja; y/o 0-25% de harina de pescado; y/o 0-25% de harina de carne y huesos; y/o 0-20% de suero de leche.
- 45 [0244] Las dietas para animales pueden, por ejemplo, fabricarse como alimento triturado (no granulado) o alimento granulado. Típicamente, los alimentos para animales molidos se mezclan y se añaden cantidades suficientes de minerales y vitaminas esenciales según las especificaciones para las especies en cuestión. Los polipéptidos se

pueden añadir como formulaciones polipeptídicas sólidas o líquidas. Por ejemplo, una formulación polipeptídica sólida se añade típicamente antes o durante la etapa de mezclado; y una preparación polipeptídica líquida se añade típicamente después del paso de granulación. El polipéptido también se puede incorporar en un aditivo alimentario o una premezcla.

5 [0245] La concentración final de polipéptido en la dieta está en el rango de 0,01-200 mg de proteína polipeptídica por kg de dieta, por ejemplo, en el rango de 5-30 mg de proteína de polipéptido por kg de dieta animal.

[0246] La fitasa de la divulgación debe aplicarse por supuesto en una cantidad eficaz, es decir, en una cantidad adecuada para mejorar la solubilización y/o mejorar el valor nutricional del alimento. Actualmente se contempla que el polipéptido se administre en una o varias de las siguientes cantidades (rangos de dosificación): 0,01-200; 0,01-100; 0,5-100; 1-50; 5-100; 10-100; 0,05-50; o 0,10-10 –estando todos estos rangos en mg de proteína polipeptídica de fitasa por kg de alimento (ppm).

10

[0247] Para determinar los mg de proteína polipeptídica de fitasa por kg de alimento, la fitasa se purifica a partir de la composición de alimento, y la actividad específica de la fitasa purificada se determina usando un ensayo pertinente. La actividad de fitasa de la composición de alimento como tal también se determina usando el mismo ensayo, y basándose en estas dos determinaciones, la dosificación se calcula en mg de proteína de fitasa por kg de alimento.

15

[0248] Los mismos principios se aplican a la determinación de los mg de proteína polipeptídica de fitasa en los aditivos alimentarios. Por supuesto, si una muestra de la fitasa usada está disponible para preparar el aditivo alimentario o el alimento, la actividad específica se determina a partir de esta muestra (sin necesidad de purificar la fitasa a partir de la composición de alimento o el aditivo).

20

Métodos para producir productos de fermentación

[0249] Otro aspecto de la presente descripción se refiere a los métodos para producir un producto de fermentación, tal como, por ejemplo, etanol, cerveza, vino, residuos secos de destilería (DDG), donde la fermentación se realiza en presencia de una fitasa producida por la presente descripción. Los ejemplos de procesos de fermentación incluyen, por ejemplo, los procesos descritos en WO 01/62947. La fermentación se realiza usando un microorganismo fermentador, tal como levadura.

25

[0250] En un aspecto particular, la presente descripción proporciona métodos para producir un producto de fermentación, que comprende (a) la fermentación (usando un microorganismo fermentador, tal como levadura) de un material que contiene carbohidratos (por ejemplo, almidón) en presencia de una fitasa de la presente invención y (b) la producción del producto de fermentación a partir del material que contiene carbohidratos fermentado.

30

[0251] En un aspecto particular, la presente descripción proporciona métodos para producir etanol, que comprenden la fermentación (usando un microorganismo fermentador, tal como levadura) de un material que contiene carbohidratos (por ejemplo, almidón) en presencia de una fitasa de la presente invención y la producción o la recuperación del etanol a partir del material que contiene carbohidratos fermentado.

[0252] En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para producir etanol que comprenden a) la hidrólisis de almidón, por ejemplo, por un proceso de licuefacción y/o sacarificación, un proceso de hidrólisis de almidón crudo, b) la fermentación del almidón resultante en presencia de una fitasa de la presente invención y c) la producción de etanol.

35

[0253] La fitasa se puede añadir al proceso de fermentación en cualquier etapa adecuada y en cualquier composición adecuada, incluyendo sola o en combinación con otras enzimas, tales como una o más alfa-amilasas, glucoamilasas, proteasas y/o celulasas.

40

[0254] En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para producir etanol que comprenden la hidrólisis de biomasa y la fermentación (usando un microorganismo fermentador, tal como levadura) de la biomasa resultante en presencia de una fitasa de la presente descripción.

Ejemplos

45

[0255] Los productos químicos usados fueron productos comerciales de al menos grado reactivo.

Ejemplo 1: preparación de variantes y determinación de la actividad

Preparación de variantes de fitasa

Expresión de variantes de fitasa en *Aspergillus oryzae*

5 [0256] Los constructos que comprenden los genes de la variante de fitasa de *C. braakii* en los ejemplos se usaron para construir vectores de expresión para *Aspergillus*. Los vectores de expresión de *Aspergillus* consisten en un casete de expresión basado en el promotor de la amilasa II neutra de *Aspergillus niger* fusionado con la secuencia líder no traducida de la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* (Pna2/tpi) y el terminador de la amiloglicosidasa de *Aspergillus niger* (Tamg). También estaba presente en el plásmido el marcador selectivo de *Aspergillus pyrG* de *Aspergillus nidulans* que permite el crecimiento en un medio mínimo para un *Aspergillus* que es *pyrG* negativo. Los plásmidos de expresión para las variantes de fitasa se transformaron en *Aspergillus* como se describe en Lassen et al. (2001), Applied and Environmental Microbiology, 67, 4701-4707. Para cada uno de los 10 constructos, 4-6 cepas fueron aisladas, purificadas y cultivadas en placas de microtitulación. La expresión se determinó usando un sustrato de fosfato de p-nitrofenilo. La mejor cepa productora se fermentó en matraces de agitación.

Purificación de variantes de fitasa de *C. braakii*

15 [0257] El sobrenadante de la fermentación con la variante de fitasa se filtró a través de un filtro Fast PES para la parte superior del frasco con un 0,22 µm de corte. La solución resultante se diluyó con agua hasta el doble de volumen y el pH se ajustó a 4,5 con ácido acético. Ocasionalmente, la solución se volvió un poco turbia y esto se eliminó por filtración a través de un filtro Fast PES para la parte superior del frasco con un 0,22 µm de corte.

20 [0258] Después del pretratamiento, la variante de fitasa se purificó por cromatografía en S sefarosa, aproximadamente 30 ml en una columna XK26, usando como tampón A 50 mM de acetato sódico a pH 4,5 y como tampón B 50 mM de acetato sódico + 1 M de NaCl a pH 4,5. Se analizó la actividad de las fracciones de la columna usando el ensayo de fosfatasa (véase a continuación) y se agruparon las fracciones con actividad.

[0259] En algunos casos, la solución que contenía la variante de fitasa purificada se concentró usando un dispositivo de filtración Amicon ultra-15 con una membrana de 30 kDa de corte.

25 [0260] El peso molecular, como se estima a partir de una SDS-PAGE, fue aproximadamente de 45-50 kDa y la pureza fue >95%.

Tabla 2 Designación de variantes

S-S extras	Designación	Modificaciones
1	10	K141C/V199C = D
1	25	G52C/S162C = E
1	26	G59C/F100C = G
1	36	W46C/Q91C = C
1	37	N31 C/E176C = F
1	38	N31C/T177C = B
1	43	G52C/A99C = A
1	55	S162C/S247C = H
1	61	N31C/T177C/N203L = B/N203L
1	65	114-121 (YQKDEEKN -> TQADTSSP)/K141C/E182R/K183Q/T185G/K186L/V199C/S213G/T217A/K336R =

ES 2 723 050 T3

		$\sum b/K141C/E182R/K183Q/T185G/K186L/V199C/S213G/T217A/K336R = D/\sum b/E/82R/K/83Q/T185G/K186L/S213G/T217A/K336R = D/\sum KJ$
1	70	F66L/114-121 (YQKDEEKN -> TQADTSSP)/K141C/E182R/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/V199C/S213G/T217 A/K336R = $\sum b/F66L/K141C/E182R/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/V199C/S213G /T217A/ K336R = D/\sum b/F66L/E182R/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/S213G/T217A/K33 6R = D/\sum KJ/F66L/T188S/P190T$
1	92	F66L/R94V/114-121 (YQKDEEKN -> TQADTSS)/K141C/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/V199C/P207G/S213G/T217 A/K336V = $\sum d/F66L/R94V/K/41C/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/V199C/ P207G/ S213G/T217A/K336V = D/\sum d/F66L/R94V/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/ S213G/T217A/K336V = D/\sum KU/T188S/P190T/P207G$
1	97	F66L/R94V/114-121 (YQKDEEKN -> TQADTSSR)/K141C/T188S/P190T/V199C/P207G//S213G/T217A/K336V = $\sum a/F66L/R94V/K141C/T188S/P190T/V199C/P207G//S213G/T217A/K336V D/\sum a/F66L/R94V/T188S/P190T/P207G//S213G/T217A/K336V = D/\sum KK$
2	99	F66L/R94V/114-121 (YQKDEEKN -> TQADTSSR)/K141C/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/V199C/P207G/S213G/T217A/K336V/G52C/ A99C = $\sum a/F66L/R94V/K141C/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/V199C/ P207G/S213G/ T217A/K336V/G52C/A99C = A/D/\sum a/F66L/R94V/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/ S213G/T217A/K336V= A/D/\sum KK/E182K/K183Q/T185G/K186L$
2	100	F66L/R94V/114-121 (YQKDEEKN -> TQADTSSR)/K141C/T188S/P190T/V199C/P207G/S213G/T217A/K336V/G52C/A99C = $\sum a/F66L/R94V/K141C/T188S/P190T/V199C/P207G/S213G/T217A/K336V/ G52C/ A99C = A/D/\sum a/F66L/R94V/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V = A/D/\sum KK$
1	110	G52C/A99C/N203I = A/N203I
1	111	G52C/A99C/N203R = A/N203R
1	112	G52C/A99C/N203K = A/N203K
1	113	G52C/A99C/N203S = A/N203S
1	114	G52C/A99C/N203Q = A/N203Q
1	115	N31C/T177C/N203S = B/N203S
1	116	N31C/T177C/N203T = B/N203T
1	117	N31C/T177C/N203C = B/N203C
1	118	N31C/T177C/N203V = B/N203V
2	120	N31C/G52C/A99C/T177C = A/B
2	128	K24Q/N31C/G52C/A99C/T177C = A/B/ K24Q
2	130	K24I/N31C/G52C/A99C/T177C = A/B/ K24I
2	131	N31C/G52C/A99C/K129P/T177C = A/B/K129P
2	132	N31C/G52C/A99C/K129Q/T177C = A/B/ K129Q
2	133	N31C/G52C/A99C/K129I/T177C = A/B/K129I
3	139	N31C/G52C/A99C/K141C/T177C/V199C = A/B/D

ES 2 723 050 T3

1	141	G52C/A99C/V199C = A/V199C
1	142	G52C/A99C/P190L/V199C = A/ P190L/V199C
2	143	G52C/A99C/K141C/V199C = A/D
1	144	G52C/A99C/P207D = A/P207D
1	145	G52C/A99C/N203L = A/N203L
1	146	G52C/A99C/P207G = A/P207G
2	147	N31C/G52C/A99C/T177C/P207G = A/B/P207G
2	150	N31C/G52C/A99C/T177C/N203L/P207G = A/B/ N203L/P207G
2	151	K24R/N31C/G52C/A99C/T177C = A/B/ K24R
2	152	N31C/G52C/A99C/K129R/T177C = A/B/ K129R
2	161	K24R/N31C/G52C/A99C/K129P/T177C = A/B/K24R/K129P
2	162	K24R/N31C/G52C/A99C/K129R/T177C/N203L/P207G = A/B/K24R/ K129R/N203L/P207G
2	163	N31C/G52C/A99C/K129R/T177C/N203L/P207G = A/B/K129R/N203L/ P207G
2	164	K24R/N31C/G52C/A99C/K129R/T177C/N203L = A/B/K24R/K129R/N203L
2	165	N31C/G52C/A99C/K129R/T177C/N203L = A/B/K129R/N203L
1	200	F66L/R94V/114-121(YQKDEEKN -> TQADTSSR)/K141C/K179N/E182K/ K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/V199C/P207G/S213G/T217 A/K336V= D/Σa/F66L/R94V/K179N/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/ P 2 0 7 G / S 2 1 3 G / T 2 1 7 A / K 3 3 6 V = D/ΣKK/K179N/E182K/K183Q/T185G/K186L
1	201	F66L/R94V/114-121 (YQKDEEKN -> TQADTSSR)/K141C/E182N/ K183Q/ T185G/K186L/T188S/P190T/V199C/P207G/S213G/T217A/K336V = D/Σa/F66L/R94V/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/ S213G/T217A/ K336V = D/ΣKK/E182K/K183Q/T185G/K186L
2	212	G52C/R94V/A99C/K116A/E119S/K141C/T188S/P190T/V199C/T217A = A/D/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A
3	213	F66L/R94V/114-121 (YQKDEEKN -> TQADTSSR)/K141C/T188S/ P190T/ V199C/P207G/S213G/T217A/K336V/G52C/A99C/N31C/T177C = A/B/D/Σa/F66L/R94V/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V= A/B/D/ΣKK
1	222	E1*/E"/K116A/E119S/K141C/V199C/T217A = D/ E1*/E"/K116A/E119S/T217A
1	223	E1 */E"/R94V/K116A/E119S/K141C/K186L/T188S/P190T/V199C/T217A = D/ E1*/E"/R94V/K116A/E119S/K186L/T188S/P190T/T217A

5 [0261] Donde A significa G52C/A99C, B significa N31C/T177C, C significa W46C/Q91C, D significa K141C/V199C, E significa G52C/S162C, F significa N31C/E176C, G significa G59C/F100C y H significa S162C/S247C; y donde Σa significa la sustitución del fragmento TQADTSSR por el fragmento YQKDEEKN en las posiciones 114-121, Σb significa la sustitución del fragmento TQADTSSP por el fragmento YQKDEEKN, Σc significa la sustitución del fragmento TQADTSSN por el fragmento YQKDEEKN, Σd significa la sustitución del fragmento TQADTSS por el fragmento YQKDEEKN; y donde ΣKJ significa Σb/E182R/K183Q/T185G/K186L/S213G/T217A/K336R, ΣKU significa Σd/F66L/R94V/E182K/K183Q/T185G/K186L/S213G/T217A/K336V y ΣKK significa Σa/F66L/R94V/T188S/P190T/P207G//S213G/T217A/K336V.

Determinación de la actividad de fosfatasa

5 [0262] Se dispensan 75 microlitros de solución enzimática con fitasa en un pocillo de una placa de microtitulación, por ejemplo, NUNC 269620, y se añaden 75 microlitros de sustrato (para preparar el sustrato, se disuelven dos comprimidos de 5 mg de fosfato de p-nitrofenilo (Sigma, nº de catálogo. N-9389) en 10 ml de 0,1 M de tampón de acetato de sodio, pH 5,5). La placa se sella y se incuba 15 min., se agita a 750 r.p.m. a 37°C. Después del período de incubación, se añaden 75 microlitros de reactivo de parada (el reactivo de parada es 0,1 M de tetraborato de disodio en agua) y se mide la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro de placa de microtitulación. Una unidad de fosfatasa se define como la actividad enzimática que libera 1 micromol de fosfato/min bajo las condiciones de reacción dadas (tampón ciego sustraído). La absorbancia de 1 micromol de p-nitrofenol se determina que es de 56 UA (UA = unidades de absorbancia) bajo las condiciones de ensayo.

10 Determinación de la actividad de fitasa

15 [0263] Se dispensan 75 microlitros de solución enzimática con fitasa, diluida apropiadamente en 0,25 M de acetato sódico, Tween-20 al 0,005% (p/v), pH 5,5, en un pocillo de una placa de microtitulación, por ejemplo, NUNC 269620, y se añaden 75 microlitros de sustrato (preparados por disolución de 100 mg de fitato de sodio de arroz (Aldrich nº de catálogo 274321) en 10 ml de 0,25 M de tampón de acetato sódico, pH 5,5). La placa se sella y se incuba 15 min., se agita a 750 r.p.m. a 37°C. Tras la incubación, se añaden 75 microlitros de reactivo de parada (el reactivo de parada se prepara mezclando 10 ml de solución de molibdato (heptamolibdato de amonio al 10% (p/v) en solución amoniacal al 0,5% (p/v)), 10 ml de vanadato de amonio (0,24% de producto comercial de Bie&Berntsen, nº de catálogo. LAB17650) y 20 ml de ácido nítrico al 21,7% (p/v)), y la absorbancia a 405 nm se mide en un espectrofotómetro de placa de microtitulación. La actividad de fitasa se expresa en la unidad de FYT, siendo un FYT la cantidad de enzima que libera 1 micromol de ortofosfato inorgánico por minuto bajo las condiciones anteriores. Puede obtenerse un valor absoluto para la actividad de fitasa medida por referencia a una curva estándar preparada a partir de diluciones apropiadas de fosfato inorgánico o por referencia a una curva estándar hecha a partir de diluciones de una preparación enzimática de fitasa con actividad conocida (tal preparación enzimática estándar con una actividad conocida está disponible previa solicitud en Novozymes A/S, Krogshoejvej 36; DK-2880 Bagsvaerd).

Ejemplo 2: actividad específica

[0264] La actividad específica de una variante de fitasa se determina en muestras altamente purificadas dializadas contra 250 mM de acetato sódico, pH 5,5. La pureza se comprueba previamente en un gel de poliacrilamida SDS que muestra la presencia de solo un componente.

30 [0265] La concentración de proteína se determina por análisis de aminoácidos de la siguiente manera: una parte alícuota de la muestra se hidroliza en 6N de HCl, fenol al 0,1% durante 16 h a 110°C en un tubo de vidrio de vacío. Los aminoácidos resultantes se cuantifican usando un sistema de análisis de aminoácidos Applied Biosystems 420A manejado según las instrucciones del fabricante. De las cantidades de los aminoácidos, se puede calcular la masa total –y, por tanto, también la concentración– de proteína en la parte alícuota hidrolizada.

35 [0266] La actividad de fitasa se determina en las unidades de FYT como se ha descrito en el ejemplo 1 ("Determinación de la actividad de fitasa"), y la actividad específica se calcula como la actividad de fitasa medida en unidades FYT por mg de proteína enzimática de variante de fitasa.

Ejemplo 3: cribado de la estabilidad a la temperatura

Cepas y plásmidos

40 [0267] Se usó *E. coli* DH12S (disponible en Gibco BRL) para el rescate de plásmidos de levadura.

[0268] pJCP000 es un vector transportador de *S. cerevisiae* y *E. coli* bajo el control del promotor TPI, construido a partir de pJC039 descrito en WO 01/92502, donde se ha insertado el gen de la fitasa de *C. braakii*.

[0269] *Saccharomyces cerevisiae* YNG318: MATa Dpep4[cir+] ura3-52, leu2-D2, his 4-539 se usó para la expresión de las variantes de fitasa. Se describe en J. Biol. Chem. 272 (15), pp. 9720-9727, 1997.

45 Medios y sustratos

[0270] Solución basal 10X: 66,8 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (DIFCO), 100 g/l de succinato, 60 g/l de NaOH.

[0271] SC-glucosa: 100 ml/l de glucosa al 20% (es decir, una concentración final del 2% = 2 g/100 ml), 4 ml/l de treonina al 5%, 10 ml/l de triptófano al 1%, 25 ml/l de casaminoácidos al 20%, 100 ml/l de solución basal 10X. La solución se esteriliza usando un filtro de un tamaño de poros de 0,20 micrómetros. Se autoclavan juntos agar y H₂O (aprox. 761 ml), y la solución de SC-glucosa esterilizada por separado se añade a la solución de agar.

5 [0272] YPD: 20 g/l de Bacto peptona, 10 g/l de extracto de levadura, 100 ml/l de glucosa al 20%.

[0273] Solución de PEG/LiAc: 50 ml de PEG4000 al 40%, 1 ml de 5M de acetato de litio.

Manipulaciones del ADN

10 [0274] A menos que se indique lo contrario, las manipulaciones y transformaciones de ADN se realizaron usando métodos estándares de biología molecular como se describe en Sambrook et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab. Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. et al. (eds.) "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R. y Cutting, S. M. (eds.).

Transformación de levadura

15 [0275] La transformación de la levadura se efectuó mediante un método de acetato de litio. Mezclar 0,5 microL de vector (digerido por endonucleasas de restricción) y 1 microL de fragmentos de la PCR. Descongelar células YNG318 competentes en hielo. Mezclar 100 microL de las células, la mezcla de ADN y 10 microL de ADN portador (Clontech) en tubos de polipropileno de 12 ml (Falcon 2059). Añadir 0,6 ml de solución de PEG/LiAc y mezclar suavemente. Incubar durante 30 min a 30°C y 200 r.p.m. Incubar durante 30 min a 42°C (choque térmico). Transferir a un tubo de Eppendorf y centrifugar durante 5 s. Eliminar el sobrenadante y disolver en 3 ml de YPD. Incubar la suspensión celular durante 45 min a 200 r.p.m. a 30°C. Verter la suspensión en placas de SC-glucosa e incubar a 30°C durante 3 días para formar colonias. El ADN total de levadura se extrajo por el método de Robzyk y Kassir descrito en Nucleic acids research vol. 20; n.º 14 (1992) 3790.

Secuenciación del ADN

25 [0276] La transformación de *E. coli* para la secuenciación del ADN se efectuó por electroporación (BIO-RAD Gene Pulser). Los plásmidos de ADN se prepararon mediante un método alcalino (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor) o con el kit de plásmidos de Qiagen®. Los fragmentos de ADN se recuperaron del gel de agarosa mediante el kit de extracción de gel de Qiagen. La PCR se realizó usando un DNA Engine PTC-200. El analizador genético ABI PRISM™ 310 se utilizó para la determinación de todas las secuencias de ADN.

Construcción del vector de expresión de la fitasa

30 [0277] El gen de la fitasa de *Citrobacter* se amplificó con los pares de cebadores (CbPhyF y CbPhyR). Los fragmentos de la PCR resultantes se introdujeron en *S. cerevisiae* YNG318 con el vector pJC039 digeridos con enzimas de restricción para eliminar la parte madura del gen de la cutinasa de *Humicola insolens*.

CbPhyF (40mer) CTCCTGAACTTGTGCCCCGGAAGAGCAGAACGGAATG
CbPhyR (42mer) ATTACATGATGCGGCCCGCGCCGCTACTCTGTGACGGCAC

35 El plásmido, que se denomina pJCP000 de los transformantes de levadura en placas de SC-glucosa, se recuperó y la secuencia interna se determinó para confirmar el gen de la fitasa.

Construcción de una genoteca de levadura y variantes dirigidas al sitio

[0278] La genoteca en levadura y las variantes dirigidas al sitio se construyeron por el método de PCR SOE (Splicing by Overlap Extension, véase "PCR: A practical approach", p. 207-209, Oxford University Press, eds. McPherson, Quirke, Taylor), seguido de la recombinación *in vivo* de levadura.

40 Cebadores generales para la amplificación y la secuenciación

[0279] Los cebadores siguientes se utilizan para producir fragmentos de ADN que contienen cualquier fragmento mutado por el método SOE junto con cebadores degenerados (AM34 + cebador inverso y AM35 + cebador directo) o solo para amplificar un gen entero de asparaginasa (AM34 + AM35).

AM34 TAGGAGTTTAGTGAACCTTGC
AM35 TTCGAGCGTCCCAAACC

Sistema de reacción PCR:	Condiciones:
48,5 microL H ₂ O	1 94°C 2 min
2 microesferas puRe Taq Ready-To-Go PCR	2 94°C 30 s
Microesferas (Amersham biosciences)	3 55°C 30 s
0,5 microL X 2 100 pmol/microL	4 72°C 90 s
Cebadores	2-4 25 cycles
0,5 microL ADN molde	5 72°C 10 min

5 [0280] Los fragmentos de ADN se recuperaron de un gel de agarosa mediante el kit de extracción de gel Qiagen. Los fragmentos purificados resultantes se mezclaron con el digerido del vector. La solución mezclada se introdujo en *Saccharomyces cerevisiae* para construir genotecas o variantes dirigidas al sitio por recombinación *in vivo*.

Cribado de la genoteca (el ensayo de la membrana primario)

10 [0281] Se cultivaron genotecas de levadura en la placa de SC-glucosa con una membrana de acetato de celulosa (superior) y una membrana Biodyne C (de Pall Gelman) (inferior) a 30 °C al menos durante 3 días. Las membranas BiodyneC se transfirieron a placas preincubadas que contenían 20 mM de tampón acetato, pH 4,0 y se incubaron durante 1-2 horas a una cierta temperatura (50 °C en el caso de WT como esqueleto).

[0282] Luego, las membranas se eliminaron y se sumergieron en la solución de sustrato fresca (10 ml de 20 mM de tampón acetato, pH 4,0; 0,01 g de alfa-naftilfosfato (Sigma); 0,02 g de Fast Garnet GBC (Sigma)). Los clones de levadura correspondientes a las posiciones de color rojo desarrollado en las membranas Biodyne C fueron aislados de las membranas de acetato de celulosa.

15 Cribado de la genoteca (la selección de la actividad relativa secundaria)

[0283] Los clones de levadura en membranas de acetato de celulosa se inocularon en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se cultivaron a 28 °C durante 3 días. La actividad de fitasa se midió tanto a 37 °C como a la temperatura más alta (60, 64, 65, 70, 72 °C, etc.) para determinar la actividad relativa a una cierta temperatura. Luego se seleccionaron los clones con actividad relativa más alta y se confirmó la secuencia.

Los estándares, los controles de nivel y las muestras se pipeteen en una MTP o un tubo de tiras de 8.	10 µl
Se añade sustrato precalentado (50°C).	200 µl
El tubo de tiras de 8 o MTP se coloca en un incubador de MTP a 37, 60 y 64°C (o superior).	30 min.
Retirar 35 µl, añadirlo a 100 µl de reactivo de complejo de parada y mezclar 5-20 s.	35 + 100 µl
La muestra se mantiene en espera antes de la medición.	5-30 min
Se mide la DO a	750 nm

20 Sustrato, solución de fitato de sodio 2,0 mM (cada vez)

[0284] Ejemplo de preparación de 100 ml:

Fitato de sodio 0,1847 g
0,1 M de tampón acetato, pH 4,0 hasta 100 ml

Reactivo complejante

25 [0285] Ejemplo de preparación de 200 ml:

FeSO₄.7H₂O 14,64 g
Solución de heptamolibdato de amonio hasta 200 ml

Reactivo de complejo de parada

[0286] Ejemplo de preparación de 600 ml de reactivo de complejo de parada:
0,5 M H₂SO₄ 200 ml

Reactivo complejante 400 ml

- 5 [0287] Solución de heptamolibdato de amonio
Ejemplo de preparación de 1000 ml:

(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	10,0 g
Ácido sulfúrico	32 ml
Agua desmineralizada	hasta 1000 ml

- 10 [0288] Los resultados se proporcionan a continuación. La columna que indica la actividad relativa proporciona primero la actividad relativa de la variante y luego la actividad relativa de la fitasa de referencia usada en la determinación. La referencia es la fitasa de tipo salvaje.

Resultados

[0289]

Variante n.º	Modificaciones (sustituciones, inserciones o deleciones)	Actividad relativa (100% a 37°C)
65	D/ΣKJ	113% a 72°C (WT19%)
70	D/ΣKJ/F66L/T188S/P190T	188% a 72°C (WT19%)
92	D/ΣKU/T188S/P190T/P207G	231% a 72°C (WT19%)
99	A/D/ΣKK/E182K/K183Q/T185G/K186L	277% a 72°C (WT19%)
100	A/D/ΣKK	320% a 72°C (WT19%)
213	A/B/D/ΣKK	147% a 72°C (WT19%)

15 **Ejemplo 4. Termoestabilidad por DSC**

- [0290] Una parte alícuota de la muestra de proteína de la fitasa de *C. braakii* (purificada como se describe en el ejemplo 1) o bien se desaló y cambió de tampón a 20 mM de acetato de sodio, pH 4,0 usando una columna PD-10 preempaquetada, o bien se dializó contra 2 x 500 ml de 20 mM de acetato de sodio, pH 4,0 a 4°C en un paso de 2-3h seguido de un paso durante toda la noche. La muestra se filtró a 0,45 µm y se diluyó con tampón a aprox. 2 unidades A280. El tampón de diálisis se usó como referencia en la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las muestras se desgasificaron usando la succión al vacío y agitando durante aprox. 10 minutos.

- [0291] Se realizó un escaneado de DSC en un calorímetro MicroCal VP-DSC a una velocidad de barrido constante de 1,5 °C/min de 20-90 °C. Se realizó el manejo de los datos usando el *software* MicroCal Origin (versión 4.10), y la temperatura de desnaturalización, T_d (llamada también temperatura de fusión, T_m), se define como la temperatura en el ápice del pico en el termograma.

[0292] Los resultados de DSC para las variantes de fitasa de *C. braakii* se resumen en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Termoestabilidad comparativa de fitasas de *C. braakii*

Variante	N.º de S-S	Td 1r escaneado (°C)
<i>C. braakii</i> wt	0	62,0
10 = D	1	63,8
36 = C	1	65,4
38 = B	1	66,8
43 = A	1	69,6
115 = B/N203S	1	66,6
118 = B/N203V	1	64,6

120= A/B	2	72,2
139= A/B/D	3	74,0
65 = D/ΣKJ	1	68,3
70 = D/ΣKJ/F66L/T188S/P190T	1	69,8
92 = D/ΣKU/T188S/P190T/P207G	1	68,0
97 = D/ΣKK	1	68,8
99 = A/D/ΣKK/E182K/K183Q/T185G/K186L	2	76,4
100 = A/D/ΣKK	2	76,3
200 = D/ΣKK/K179N/E 182K/K183Q/T185G/K186 L	1	67,7
201 = D/ΣKK/E182K/K183Q/T185G/K186L	1	68,4
212 = A/D/6modificaciones véase la tabla 2	2	68,7
213 = A/B/D/ΣKK	3	79,4

Ejemplo 5. Perfil de temperatura

[0293] El perfil de temperatura (actividad de fitasa en función de la temperatura) se determinó para la fitasa de *C. braakii* y las variantes en el rango de temperatura de 20-90°C esencialmente como se ha descrito anteriormente ("Determinación de la actividad de fitasa"). Sin embargo, las reacciones enzimáticas (100 microlitros de solución enzimática que contiene fitasa + 100 microlitros de sustrato) se realizaron en tubos de PCR en vez de placas de microtitulación. Después de un periodo de reacción de 15 minutos a la temperatura deseada, los tubos se enfriaron a 20°C durante 20 segundos y 150 microlitros de cada mezcla de reacción se transfirieron a una placa de microtitulación. Se añadieron 75 microlitros de reactivo de parada y la absorbancia a 405 nm se midió en un espectrofotómetro para placas de microtitulación. Los resultados se resumen en la tabla 4 a continuación. Los números dados para cada temperatura son actividades relativas (en %) normalizadas al valor óptimo.

Tabla 4: Perfiles de temperatura relativa

Variante de fitasa		Temperatura (°C)											
	N.º de S-S	20	30	40	50	55	60	65	70	75	80	85	90
<i>C.braakii</i> wt	0	24	40	59	83	95	100	89	25	11	11	9	8
25	1	23	35	60	83	91	100	90	28	9	11	5	-6
26	1	20	35	54	83	96	100	77	22	7	7	7	4
36	1	14	28	52	79	99	100	88	59	8	8	7	5
37	1	19	32	54	79	93	100	89	51	8	8	6	6
38	1	19	33	53	75	85	100	91	88	17	11	8	5
43	1	18	30	50	74	85	91	100	97	10	10	9	6
55	1	17	31	51	71	89	100	99	43	12	9	8	6
110	1	18	30	48	68	82	94	100	94	27	13	11	9
115	1	20	33	52	72	82	94	100	89	19	13	10	9
118	1	20	32	51	71	85	96	100	73	16	12	10	8
120	2	17	30	50	69	81	93	100	100	87	18	11	9
139	3	20	33	51	73	86	98	97	100	80	63	10	5
165	2	18	26	37	57	73		100	84	78	14	9	6
222	1	25	42	55	75		100	86	53	13	10	9	9
223	1	20	38	49	73		100	85	27	9	8	5	5
10	1	22	35	53	77	86	98	100	45		10		8
65	1	26	38	55	77	95	100	91	34	12	9	4	2
70	1	23	36	56	76	85	100	87	88	60	15	12	8
92	1	18	30	49	67	81	94	100	98	74	16	12	10
97	1	18	30	48	67	83	95	100	96	68	15	11	9
99	2	19	33	46	73	85	92	91	100	97	82	15	10
100	2	20	32	52	74	84	93	89	100	96	82	15	11
200	1	17	30	50	73	81	88	96	100	50	13	7	4

ES 2 723 050 T3

201	1	16	31	48	71	80	87	96	100	60	13	7	4
212	2	18	30	48	67	77	100	92	97	59	12	6	6
213	3	15	28	44	55	76	97	91	97	100	88	27	2

Ejemplo 6. Perfil de pH

[0294] El perfil de pH se determinó a 37°C en el rango de pH de 2,0 a 7,5 (en pasos de 0,5 unidades de pH) como se ha descrito anteriormente en la sección "Determinación de la actividad de fitasa", excepto que se usó un cóctel de tampón (50 mM de glicina, 50 mM de ácido acético y 50 mM de Bis-Tris) en vez del tampón a pH 5,5 de 0,25 M de acetato sódico. Los resultados se resumen en la tabla 5 a continuación. Los valores dados para cada pH en el rango de 2,0-7,5 son la actividad relativa en % normalizada al valor óptimo.

Tabla 5: Perfiles de pH relativo a 37°C

Variante/pH	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5
<i>C. braakii</i> wt	30	59	88	100	99	92	80	64	33	13	0	-1
26	30	56	83	99	100	92	76	59	40	18	4	1
36	-9	9	39	73	94	100	82	57	23	-6	-7	-7
37	35	59	87	98	100	94	80	57	35	10	0	-1
38	31	61	86	100	100	91	74	58	32	8	1	0
43	26	60	81	92	100	91	78	58	39	17	3	-1
55	26	52	80	94	98	100	90	66	42	13	-1	1
110	32	61	89	95	100	95	82	60	35	13	2	0
115	50	74	95	100	100	100	97	75	52	20	2	0
118	28	63	87	97	100	94	83	54	33	9	-1	-1
120	30	52	83	96	100	90	83	59	34	13	0	-2
139	26	56	82	95	100	91	83	60	33	12	1	0
143	30	59	85	96	100	95	81	61	36	13	-1	1
165	35	55	84	94	100	91	83	61	49	24	7	1
222	22	49	81	100	100	96	80	60	35	12	1	-2
223	17	46	76	95	100	91	80	59	38	17	3	0
10	26	59	86	100	100	94	74	58	35	16	3	0
65	26	45	78	99	100	83	72	51	30	10	-1	0
70	25	47	75	86	100	80	67	51	29	9	1	1
92	34	66	92	100	99	89	65	37	19	6	0	0
97	37	65	90	100	91	88	67	41	19	7	0	0
99	39	62	96	95	100	86	63	37	18	5	-1	0
100	41	64	96	95	100	88	66	37	19	6	1	0
200	37	62	96	95	100	88	66	40	19	6	1	0
201	37	61	89	100	97	88	65	39	19	6	1	0
212	26	59	81	96	100	93	74	58	36	8	0	0
213	46	75	87	100	93	80	55	33	15	3	-2	-1

Ejemplo 7: estabilidad al vapor

Método 1

[0295] Se evaluó la actividad residual de las moléculas de fitasa después de un tratamiento con vapor usando el ensayo siguiente:

5 Se dispensan 20 µL de cada muestra de enzima purificada en un único pocillo de una placa de 96 pocillos Corning® (1 x 8 Stripwell™) (Corning, Lowell, MA, EE.UU.) y se evapora a sequedad posteriormente en una centrifuga de vacío (Genevac EZ-1 Plus, Genevac Ltd, Suffolk, UK). La incubación con vapor se realiza en un recipiente de poliestireno cerrado con las dimensiones internas 27 x 18 x 20 cm. Las muestras, en tiras abiertas, se colocan aproximadamente 10 cm sobre el fondo del recipiente en una rejilla metálica, para no estar en contacto con el agua.

10 [0296] Un litro de agua hirviendo se vierte en el recipiente, la tapa se cierra y la temperatura del vapor producido se controla usando un termómetro montado en la tapa del recipiente. La incubación procede durante 90 segundos a partir del momento en el que el agua se vierte en el recipiente. Durante este periodo, la temperatura aumenta hasta aproximadamente 85°C. Inmediatamente después de la incubación, las muestras se enfrían en hielo, se resuspenden y se evalúan respecto a la actividad de fitasa usando el ensayo colorimétrico de p-nitrofenilfosfato (pNPP) (Sigma, Brendby, DK). Cada muestra de enzima se compara con una muestra similar que no se había tratado con vapor para calcular la actividad residual.

15 [0297] Los resultados se presentan en las tablas 6 y 7 a continuación.

Tabla 6: Estabilidad al vapor determinada por el método 1. Dos o tres números representan datos de dos o tres pocillos diferentes.

Variante	N.º de S-S	Actividad residual [%]
<i>C. braakii</i> wt	0	6;11
10 = D	1	9
38 = B	1	13
43 = A	1	26;64
120 = A/B	2	57;70;66
139 =A/B/D	3	66
100 = A/D/ΣKK	2	88;77
212 = A/D/6modificaciones	2	59
213 = A/B/D/ΣKK	3	107;66

Método 2

20 [0298] En estos experimentos se usó una configuración modificada por la cual el vapor se proporciona a partir de un generador de vapor y se lleva a la caja. Las muestras colocadas en una placa se insertan en la caja a través de un cajón cuando la temperatura se ha alcanzado. Tras la inserción de las muestras, la temperatura desciende a 4 °C. La incubación se realiza durante 60 segundos mientras la temperatura se mantiene aproximadamente constante a 90 °C. Luego la placa se retira rápidamente de la caja y las muestras se colocan en hielo. Las muestras se analizan como en el método 1.

25 Tabla 7: Estabilidad al vapor determinada por el método 2. Dos o tres números representan datos de dos o tres pocillos diferentes.

Variante	N.º de S-S	Actividad residual [%]
<i>C. braakii</i> wt	0	4;5
10 = D	1	10
38 = B	1	13
43 = A	1	18;16
120 = A/B	2	25;50;28
139 =A/B/D	3	35
100 = A/D/ΣKK	2	79;56
212 = A/D/6modificaciones	2	31
213 = A/B/D/ΣKK	3	38;45

[0299] En las tablas anteriores, las variantes son las que se proporcionan en la tabla 2.

Ejemplo 8: pruebas de estabilidad a la granulación

Mediciones de estabilidad a la granulación

5 [0300] Aproximadamente 50 g de granulado enzimático se premezclaron con 10 kg de alimento durante 10 minutos en un mezclador horizontal pequeño. Esta premezcla se mezcló con 90 kg de alimento durante 10 minutos en un mezclador horizontal más grande. Del mezclador, el alimento se llevó al acondicionador (un mezclador en cascada con inyección de vapor) a una velocidad de aproximadamente 300 kg/hora. El acondicionador calentó el alimento a 95 °C (medida a la salida) inyectando vapor. El periodo de permanencia en el acondicionador fue de 30 segundos.
10 Del acondicionador, el alimento se llevó a una prensa Simon Heesen equipada con una matriz horizontal 3,0x35 mm y se prensó en gránulos con una longitud de alrededor de 15 mm. Después del prensado, los gránulos se colocaron en un refrigerador de aire y se enfriaron durante 15 minutos.

Formulación del alimento:

[0301]

15	74,0%	maíz molido
	5,0%	aceite de soja
	20,7%	sémola de soja tostada
	0,3%	premezcla de minerales y vitaminas Solivit Mikro 106
	12%	contenido de agua

Prueba 1

20 [0302] Un polvo consistente en:

	1,50	kg de celulosa fibrosa, Arbocecel BC200
	0,75	kg de aglutinante de carbohidrato, Avedex W80
	11,50	kg de sulfato de sodio finamente molido se granulan en un mezclador Lödige FM 50 con un líquido de granulación consistente en:
25	0,75	kg de aglutinante de carbohidrato, Avedex W80
	2,60	kg de concentrado de fitasa de <i>C. braakii</i> wt
	0,45	kg de agua

30 [0303] La granulación se realiza de la manera descrita en la patente de EE.UU. n.º 4,106,991, ejemplo 1. El granulado obtenido se seca en un lecho fluido hasta un contenido de agua por debajo del 1% y se tamiza para obtener un producto con el rango de partícula de 250 µm a 850 µm. Finalmente, el producto se recubre con un 9,5% de aceite de palma y un 23,5% de carbonato cálcico de la manera descrita en la patente de EE.UU. n.º 4,106,991, ejemplo 22.

Prueba 2

[0304] Un polvo consistente en:

35	1,6	kg de celulosa fibrosa, Arbocecel BC200
	0,80	kg de aglutinante de carbohidrato, Avedex W80
	12,16	kg de sulfato de sodio finamente molido se granula en un mezclador Lödige FM 50 con un líquido de granulación consistente en:
	0,80	kg de aglutinante de carbohidrato, Avedex W80
40	2,71	kg de concentrado de variante de fitasa 100
	0,8	kg de agua

45 [0305] La granulación se realiza de la manera descrita en la patente de EE.UU. n.º 4,106,991, ejemplo 1. El granulado obtenido se seca en un lecho fluido hasta un contenido de agua por debajo del 1% y se tamiza para obtener un producto con el rango de partícula de 250 µm a 850 µm. Finalmente, el producto se recubre con un 8,5% de aceite de palma y un 22% de carbonato cálcico de la manera descrita en la patente de EE.UU. n.º 4,106,991, ejemplo 22.

Prueba 3

[0306] Un polvo consistente en:

- 1,6 kg de celulosa fibrosa, Arbocecel BC200
- 0,80 kg de aglutinante de carbohidrato, Avedex W80
- 5 12,01 kg de sulfato de sodio finamente molido se granula en un mezclador Lödige FM 50 con un líquido de granulación consistente en:
 - 0,80 kg de aglutinante de carbohidrato, Avedex W80
 - 3,50 kg de concentrado de la variante de fitasa 213
 - 0,05 kg de agua

10 [0307] La granulación se realiza de la manera descrita en la patente de EE.UU. n.º 4,106,991, ejemplo 1. El granulado obtenido se seca en un lecho fluido hasta un contenido de agua por debajo del 1% y se tamiza para obtener un producto con el rango de partícula de 250 µm a 850 µm. Finalmente, el producto se recubre con un 8% de aceite de palma y un 22% de carbonato cálcico de la manera descrita en la patente de EE.UU. n.º 4,106,991, ejemplo 22.

15 [0308] Las muestras producidas en la prueba 1 a la prueba 3 se evaluaron en una prueba de granulación a 95°C, salida del acondicionador. El contenido de fitasa se midió utilizando el método analítico EB-SM 0559.02 versión 01 (disponible de Novozymes previa solicitud) antes de la granulación y en los gránulos de alimento después de la granulación. Se encontraron las siguientes actividades residuales de la fitasa:

Tabla 8: Estabilidad a la granulación

Prueba	Variante	N.º de S-S	Actividad residual de la fitasa en [%]
1	C.b. wt	0	14
2	100 = A/D/ΣKK	2	58
3	213 = A/B/D/ΣKK	3	57

20 [0309] La conclusión es que las variantes han mejorado la estabilidad a la granulación en comparación con la prueba de referencia 1.

[0310] En la tabla anterior, las variantes son las que se proporcionan en la tabla 2.

Ejemplo 9: rendimiento en alimento para animales en un modelo *in vitro*

25 [0311] El rendimiento en alimento para animales de una serie de variantes de fitasa de la invención se comparan en un modelo *in vitro* con el rendimiento de una proteína de referencia tal como la SEQ ID NO: 2. El modelo *in vitro* simula condiciones gastrointestinales de un animal monogástrico y se correlaciona bien con los resultados obtenidos en pruebas *in vivo* en animales. La versión usada en este ejemplo simula el buche y el estómago de un pollo de engorde. La comparación se realiza de la siguiente manera:
 La actividad de fitasa de la muestra de variante se determina como se describe en el ejemplo 1 bajo "Determinación de la actividad de fitasa".

30 [0312] Los gránulos de alimento de una prueba de alimentación de pollos de engorde –y con maíz, harina de soja y aceite de soja como constituyentes principales– se preincuban a 40 °C y pH 4,6 durante 5 minutos, seguido de la adición de dosificaciones adecuadas de las fitasas (se usan dosificaciones idénticas para todas las fitasas que se van a evaluar para permitir la comparación), por ejemplo, entre 125 a 1000 unidades de fitasa FYT/kg de alimento, o tampón en las muestras de control. Después de 5 minutos de incubación, la pepsina (3000 U/g de alimento) en una solución de HCl se añade y, de esta manera, el pH se reduce a 3. Las muestras se incuban entonces a 40 °C durante otros 5 minutos.

35 [0313] Las reacciones se paran y el ácido fólico y los fosfatos de inositol se extraen mediante la adición de HCl a una concentración final de 0,5 M y la incubación a 40 °C durante 2 horas, seguido de un ciclo de congelación-descongelación y una incubación de 1 hora a 40 °C.

[0314] El ácido fítico y los fosfatos de inositol se separan por cromatografía iónica de alto rendimiento como se describe por Chen et al en Journal of Chromatography A (2003) vol. 1018, pp. 41-52 y se cuantifican como se describe por Skoglund et al en J. Agric. Food Chem. (1997), vol. 45, pp. 431-436.

5 [0315] La degradación del fitato se calcula luego como la diferencia de fósforo unido a inositol-6-fosfato (IP6-P) entre las muestras tratadas y no tratadas con fitasa. El rendimiento relativo de la variante se calcula como el porcentaje de degradación del fitato por la fitasa de tipo salvaje.

10 [0316] La degradación relativa de las variantes de fitasa (tabla 9) muestra que las variantes son todas capaces de degradar inositol-6-fosfato en el sistema *in vitro* aplicado. Ciertas candidatas rindieron mejor que la de tipo salvaje (por ejemplo, la variante: 38, la variante: 99, la variante: 100 y la variante: 213), mientras que otras no fueron tan eficientes *in vitro* como la de tipo salvaje (por ejemplo, la variante: 120).

Tabla 11. Degradación *in vitro* de IP6-P a partir de una dieta basada en soja/maíz. La degradación de fitato de la variante se calcula como el porcentaje de degradación de fitato por la fitasa de tipo salvaje.

Degradación de fitato de la variante como porcentaje de degradación del fitato por la de tipo salvaje (varios números representan datos de distintas pruebas)		
Dosificación de la fitasa (FYT/kg de alimento)		
Variante de la fitasa		
38 = B	125	167
Como la anterior	250	100
Como la anterior	500	114
Como la anterior	1000	109
120 = A/B	500	67
Como la anterior	1000	85
99 = A/D/ΣKK/E182K/K183Q/T185G/K186L	500	194;188
Como la anterior	1000	133;127
100 = A/D/ΣKK	125	84;198
Como la anterior	250	238
Como la anterior	500	170;180;180
Como la anterior	1000	132;125
213 = A/B/D/ΣKK	125	189
Como la anterior	250	256

[0317] En la tabla anterior, las variantes son las que se proporcionan en la tabla 2.

Ejemplo 10: rendimiento en una prueba *in vivo* en cerdos

15 [0318] Evaluación comparativa de los efectos de cantidades graduadas de la fitasa de *C. braakii* de tipo salvaje y una variante sobre la digestibilidad fecal y la excreción de fósforo y calcio en cerdos en crecimiento.

[0319] Se usaron sesenta y cuatro cerdos Large White x cerdos de raza autóctona con un peso corporal inicial de 43,55 ± 4,35 kg.

20 [0320] Los animales se alojaron en jaulas con suelo en una habitación con ambiente controlado. Cada jaula tenía un suelo soldado recubierto de plástico y estaba equipada con dos boquillas de agua y cuatro alimentadores individualizados de acero inoxidable. La temperatura ambiente era de 21-22 °C y el porcentaje de humedad era del 50 %.

25 [0321] Los cerdos se alimentaron con una dieta básica formulada para proporcionar fósforo (P) exclusivamente de origen vegetal durante un periodo adaptativo de 14 días. Después de ese periodo se asignaron en 16 grupos iguales de 4 animales cada uno.

[0322] Se alimentaron durante 12 días con la dieta básica o esta dieta suplementada con 1000 o 2000 U/kg de fitasa de *C. braakii* de tipo salvaje o con 500, 1000 o 2000 U/kg de la variante designada 100 que tiene 2 enlaces disulfuro adicionales.

5 [0323] Un trazador no digerible (óxido de cromo) se añadió a una concentración del 0,4 % a todas las dietas, lo que permitió el cálculo de la digestibilidad de P y de calcio (Ca). El alimento se distribuyó *ad libitum* en forma de triturado, bajo control de consumo de alimento en la jaula, y los animales tenían libre acceso a agua potable. La digestibilidad del Ca no se corrigió para la ingesta de Ca con el agua potable.

10 [0324] Las concentraciones fecales de P, Ca y Cr se midieron en el 12º día del segundo periodo. Las heces se muestrearon individualmente, en aproximadamente la misma cantidad en el mismo momento del día, durante los últimos 3 días precedentes a esa fecha. Así, para cada tratamiento dietético y para cada criterio, se han realizado un total de 12 determinaciones individuales. Todos los minerales se determinaron según los métodos estándares de la Association of Official Analytical Chemists (1990) usando un espectrómetro Vista-MPX ICP-OES. La digestibilidad aparente (% de la ingesta) de los minerales se calculó para el periodo mencionado de 3 días.

15 [0325] La concentración fecal media de P de los animales suplementados con enzima fue significativamente mucho menor que la observada para los animales que ingirieron la dieta de control (a).

[0326] La digestibilidad del P fue dependiente de la dosis y muy mejorada significativamente con las dos fitasas en todos los grupos suplementados (b). La máxima digestibilidad de P se observó en el grupo suplementado con la variante 100 a 2000 U/kg.

20 [0327] La excreción fecal de P se redujo significativamente en todos los animales suplementados con fitasa y para todos los niveles de inclusión evaluados (c).

[0328] El P absorbido máximo aparente se observó en el grupo suplementado con la variante 100 a 2000 U/kg (d).

[0329] Las equivalencias de P, consideradas como P adicional digerido en comparación con el control no suplementado, fueron significativamente muy superiores al control en todas las dietas suplementadas con fitasa (e).

25 [0330] La digestibilidad del Ca mejoró con las enzimas evaluadas y en todos los niveles de inclusión (f).

[0331] Los resultados se presentan en la siguiente tabla 12

Tabla 12: Niveles residuales de los parámetros para la digestibilidad

	Dosis (U/kg)			
	0	500	1000	2000
(a) Concentración fecal de fósforo (mg/g de MS)				
Wt			14,6	12,2
Variante 100 = $A/D/\sum KK$		13,5	12,0	12,0
Control	18,3			
(b) Digestibilidad fecal aparente del fósforo (%)				
Wt			48,8	49,8
Variante 100 = $A/D/\sum KK$		42,5	54,0	55,2
Control	27,9			
(c) Excreción del fósforo (mg/g de MS)				
Wt			1,94	1,95
Variante 100 = $A/D/\sum KK$		2,17	1,72	1,73
Control	2,80			
(d) Absorción del fósforo (mg/g)				
Wt			1,85	1,94
Variante 100 = $A/D/\sum KK$		1,60	2,02	2,12
Control	1,09			
(e) Equivalencias de fósforo (mg/g)				

Wt			0,76	0,84
Variante 100 = A/D/ΣKK		0,52	0,94	1,04
Control	0,00			
(f) Digestibilidad aparente del calcio (%)				
Wt			57,5	60,9
Variante 100 = A/D/ΣKK		59,9	59,5	58,5
Control	51,0			

Ejemplo 11: Cálculo del porcentaje de la identidad e identificación de las posiciones correspondientes

[0332] La SEQ ID NO: 9 se alineó con la SEQ ID NO: 2 usando el programa Needle de la versión 2.8.0 del paquete EMBOSS. La matriz de sustitución usada fue BLOSUM62, la penalización por apertura de espacio fue de 10,0, y la penalización por extensión de espacio fue de 0,5.

5 [0333] El alineamiento resultante se muestra en la figura 1.

[0334] El grado de identidad entre la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 2 se calcula de la siguiente manera: el número de coincidencias exactas es 406 (todas aquellas con un trazo vertical). La longitud de la secuencia más corta es 411 (SEQ ID NO: 2). El porcentaje de identidad es $406/411 \times 100\% = 98,8\%$.

10 [0335] El alineamiento de la figura 1 también se usa para derivar posiciones correspondientes de la siguiente manera: los aminoácidos encima unos de otros en este alineamiento están en posiciones correspondientes. Por ejemplo, el aminoácido Q en la posición 3 de la SEQ ID NO: 2 corresponde al aminoácido P en el número de posición 25 de la SEQ ID NO: 9. Para los presentes fines nos referimos al número de posición de la SEQ ID NO: 2. Por lo tanto, la SEQ ID NO: 9 se puede considerar una variante de la SEQ ID NO: 2 que comprende la sustitución Q3P.

15 [0336] Otras diferencias en forma de sustituciones en el solapamiento del alineamiento se encuentran en las posiciones 31, 121, 132 y 139, es decir, N31D, N121T, K132T y Q139K.

[0337] Se encuentran diferencias adicionales en el extremo N-terminal, donde la SEQ ID NO: 9 tiene una extensión de 22 aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 2.

20 [0338] En general, la SEQ ID NO: 9 puede considerarse por lo tanto la siguiente variante de la SEQ ID NO: 2:
`*0aM/*0bS/*0cT/*0dF/*0eI/*0fI/*0gR/*0hL/*0iL/*0jF/*0kF/*0mS/*0nL/*0oL/*0pC/*0qG/*0rS/*0sF/*0tS/*0uI/*0vH/*0wA/Q3P/N31D/N121T/K132T/Q139K.`

LISTADO DE SECUENCIAS

[0339]

- 25 <110> Novozymes A/S
- <120> Variantes de fitasa
- <130> 11523-WO-PCT
- 30 <160> 9
- <170> Versión de PatentIn 3.4
- <210> 1
- 35 <211> 1233
- <212> ADN
- <213> Citrobacter braakii ATCC 51113

ES 2 723 050 T3

```

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(1233)

5 <220>
  <221> CDS
  <222> (1)..(1233)

<400> 1

10 gaa gag cag aat ggt atg aaa ctt gag cgg gtt gtg ata gtg agt cgt      48
   Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg Val Val Ile Val Ser Arg
   1                               5                               10                               15

15 cat gga gta aga gca cct acg aag ttc act cca ata atg aaa aat gtc      96
   His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr Pro Ile Met Lys Asn Val
                               20                               25                               30

20 aca ccc gat caa tgg cca caa tgg gat gtg ccg tta gga tgg cta acg      144
   Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val Pro Leu Gly Trp Leu Thr
                               35                               40                               45

25 cct cgt ggg gga gaa ctt gtt tct gaa tta ggt cag tat caa cgt tta      192
   Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu Gly Gln Tyr Gln Arg Leu
                               50                               55                               60

30 tgg ttc acg agc aaa ggt ctg ttg aat aat caa acg tgc cca tct cca      240
   Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn Gln Thr Cys Pro Ser Pro
   65                               70                               75                               80

35 ggg cag gtt gct gtt att gca gac acg gat caa cgc acc cgt aaa acg      288
   Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp Gln Arg Thr Arg Lys Thr
                               85                               90                               95

40 ggt gag gcg ttt ctg gct ggg tta gca cca aaa tgt caa att caa gtg      336
   Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Lys Cys Gln Ile Gln Val
                               100                              105                              110

45 cat tat cag aag gat gaa gaa aaa aat gat cct ctt ttt aat ccg gta      384
   His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Asn Asp Pro Leu Phe Asn Pro Val
                               115                              120                              125

50 aaa atg ggg aaa tgt tcg ttt aac aca ttg cag gtt aaa aac gct att      432
   Lys Met Gly Lys Cys Ser Phe Asn Thr Leu Gln Val Lys Asn Ala Ile
                               130                              135                              140

55 ctg gaa cgg gcc gga gga aat att gaa ctg tat acc caa cgc tat caa      480
   Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln
   145                              150                              155                              160

60 tct tca ttt cgg acc ctg gaa aat gtt tta aat ttc tca caa tcg gag      528
   Ser Ser Phe Arg Thr Leu Glu Asn Val Leu Asn Phe Ser Gln Ser Glu
                               165                              170                              175

65 aca tgt aag act aca gaa aag tct acg aaa tgc aca tta cca gag gct      576
   Thr Cys Lys Thr Thr Glu Lys Ser Thr Lys Cys Thr Leu Pro Glu Ala
                               180                              185                              190

```

ES 2 723 050 T3

	tta ccg tct gaa ctt aag gta act cct gac aat gta tca tta cct ggt	624
	Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Thr Pro Asp Asn Val Ser Leu Pro Gly	
	195 200 205	
5	gcc tgg agt ctt tct tcc acg ctg act gag ata ttt ctg ttg caa gag	672
	Ala Trp Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu Gln Glu	
	210 215 220	
10	gcc cag gga atg cca cag gta gcc tgg ggg cgt att acg gga gaa aaa	720
	Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly Arg Ile Thr Gly Glu Lys	
	225 230 235 240	
15	gaa tgg aga gat ttg tta agt ctg cat aac gct cag ttt gat ctt ttg	768
	Glu Trp Arg Asp Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe Asp Leu Leu	
	245 250 255	
20	caa aga act cca gaa gtt gcc cgt agt agg gcc aca cca tta ctc gat	816
	Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp	
	260 265 270	
25	atg ata gac act gca tta ttg aca aat ggt aca aca gaa aac agg tat	864
	Met Ile Asp Thr Ala Leu Leu Thr Asn Gly Thr Thr Glu Asn Arg Tyr	
	275 280 285	
30	ggc ata aaa tta ccc gta tct ctg ttg ttt att gct ggt cat gat acc	912
	Gly Ile Lys Leu Pro Val Ser Leu Leu Phe Ile Ala Gly His Asp Thr	
	290 295 300	
35	aat ctt gca aat tta agc ggg gct tta gat ctt aac tgg tcg cta ccc	960
	Asn Leu Ala Asn Leu Ser Gly Ala Leu Asp Leu Asn Trp Ser Leu Pro	
	305 310 315 320	
40	ggc cca ccc gat aat acc cct cct ggt ggg gag ctt gta ttc gaa aag	1008
	Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe Glu Lys	
	325 330 335	
45	tgg aaa aga acc agt gat aat acg gat tgg gtt cag gtt tca ttt gtt	1056
	Trp Lys Arg Thr Ser Asp Asn Thr Asp Trp Val Gln Val Ser Phe Val	
	340 345 350	
50	tat cag acg ctg aga gat atg agg gat ata caa ccg ttg tcg tta gaa	1104
	Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile Gln Pro Leu Ser Leu Glu	
	355 360 365	
55	aaa cct gct ggc aaa gtt gat tta aaa tta att gca tgt gaa gag aaa	1152
	Lys Pro Ala Gly Lys Val Asp Leu Lys Leu Ile Ala Cys Glu Glu Lys	
	370 375 380	
60	aat agt cag gga atg tgt tcg tta aaa agt ttt tcc agg ctc att aag	1200
	Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser Phe Ser Arg Leu Ile Lys	
	385 390 395 400	
65	gaa att cgc gtg cca gag tgt gca gtt acg gaa	1233
	Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr Glu	
	405 410	

ES 2 723 050 T3

<210> 2
 <211> 411
 <212> PRT
 5 <213> Citrobacter braakii ATCC 51113
 <400> 2
 10 Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg Val Val Ile Val Ser Arg
 1 5 10 15
 15 His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr Pro Ile Met Lys Asn Val
 20 25 30
 20 Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val Pro Leu Gly Trp Leu Thr
 35 40 45
 25 Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu Gly Gln Tyr Gln Arg Leu
 50 55 60
 30 Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn Gln Thr Cys Pro Ser Pro
 65 70 75 80
 35 Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp Gln Arg Thr Arg Lys Thr
 85 90 95
 40 Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Lys Cys Gln Ile Gln Val
 100 105 110
 45 His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Asn Asp Pro Leu Phe Asn Pro Val
 115 120 125
 50 Lys Met Gly Lys Cys Ser Phe Asn Thr Leu Gln Val Lys Asn Ala Ile
 130 135 140
 55 Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln
 145 150 155 160
 Ser Ser Phe Arg Thr Leu Glu Asn Val Leu Asn Phe Ser Gln Ser Glu
 165 170 175
 Thr Cys Lys Thr Thr Glu Lys Ser Thr Lys Cys Thr Leu Pro Glu Ala
 180 185 190
 60 Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Thr Pro Asp Asn Val Ser Leu Pro Gly

ES 2 723 050 T3

	195		200		205														
5	Ala	Trp	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu	Ile	Phe	Leu	Leu	Gln	Glu			
	210						215					220							
10	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Gln	Val	Ala	Trp	Gly	Arg	Ile	Thr	Gly	Glu	Lys			
	225					230					235					240			
15	Glu	Trp	Arg	Asp	Leu	Leu	Ser	Leu	His	Asn	Ala	Gln	Phe	Asp	Leu	Leu			
				245						250					255				
20	Gln	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Ala	Arg	Ser	Arg	Ala	Thr	Pro	Leu	Leu	Asp			
				260					265					270					
25	Met	Ile	Asp	Thr	Ala	Leu	Leu	Thr	Asn	Gly	Thr	Thr	Glu	Asn	Arg	Tyr			
			275					280					285						
30	Gly	Ile	Lys	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Leu	Phe	Ile	Ala	Gly	His	Asp	Thr			
	290						295					300							
35	Asn	Leu	Ala	Asn	Leu	Ser	Gly	Ala	Leu	Asp	Leu	Asn	Trp	Ser	Leu	Pro			
	305					310					315					320			
40	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Glu	Leu	Val	Phe	Glu	Lys			
					325					330					335				
45	Trp	Lys	Arg	Thr	Ser	Asp	Asn	Thr	Asp	Trp	Val	Gln	Val	Ser	Phe	Val			
				340					345					350					
50	Tyr	Gln	Thr	Leu	Arg	Asp	Met	Arg	Asp	Ile	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Glu			
			355					360					365						
55	Lys	Pro	Ala	Gly	Lys	Val	Asp	Leu	Lys	Leu	Ile	Ala	Cys	Glu	Glu	Lys			
	370						375					380							
60	Asn	Ser	Gln	Gly	Met	Cys	Ser	Leu	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Leu	Ile	Lys			
	385					390					395					400			
65	Glu	Ile	Arg	Val	Pro	Glu	Cys	Ala	Val	Thr	Glu								
					405					410									
70	<210>	3																	
	<211>	411																	

ES 2 723 050 T3

<212> PRT
 <213> Citrobacter braakii YH-15

5 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(411)

<400> 3

10 Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg Val Val Ile Val Ser Arg
 1 5 10 15

15 His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr Pro Ile Met Lys Asp Val
 20 25 30

20 Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val Pro Leu Gly Trp Leu Thr
 35 40 45

25 Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu Gly Gln Tyr Gln Arg Leu
 50 55 60

30 Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn Gln Thr Cys Pro Ser Pro
 65 70 75 80

35 Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp Gln Arg Thr Arg Lys Thr
 85 90 95

40 Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Lys Cys Gln Ile Gln Val
 100 105 110

45 His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Asn Asp Pro Leu Phe Asn Pro Val
 115 120 125

50 Lys Met Gly Lys Cys Ser Phe Asn Thr Leu Lys Val Lys Asn Ala Ile
 130 135 140

55 Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln
 145 150 155 160

60 Ser Ser Phe Arg Thr Leu Glu Asn Val Leu Asn Phe Ser Gln Ser Glu
 165 170 175

65 Thr Cys Lys Thr Thr Glu Lys Ser Thr Lys Cys Thr Leu Pro Glu Ala
 180 185 190

ES 2 723 050 T3

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

ES 2 723 050 T3

<210> 4
 <211> 411
 <212> PRT
 <213> Citrobacter freundii

5

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(411)

10

<400> 4

Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg Val Val Ile Val Ser Arg
 1 5 10 15

15

His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr Pro Ile Met Lys Asp Val
 20 25 30

20

Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val Pro Leu Gly Trp Leu Thr
 35 40 45

25

Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu Gly Gln Tyr Gln Arg Leu
 50 55 60

30

Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn Gln Thr Cys Pro Ser Pro
 65 70 75 80

35

Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp Gln Arg Thr Arg Lys Thr
 85 90 95

40

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

His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Thr Asp Pro Leu Phe Asn Pro Val
 115 120 125

45

Lys Met Gly Thr Cys Ser Phe Asn Thr Leu Lys Val Lys Asn Ala Ile
 130 135 140

50

Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln
 145 150 155 160

55

Ser Ser Phe Arg Thr Leu Glu Asn Val Leu Asn Phe Ser Gln Ser Glu
 165 170 175

Thr Cys Lys Thr Thr Glu Lys Ser Thr Lys Cys Thr Leu Pro Glu Ala

ES 2 723 050 T3

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

ES 2 723 050 T3

```

5 <210> 5
  <211> 1236
  <212> DNA
  <213> Variante de la SEQ ID NO:2

10 <220>
  <221> CDS
  <222> (1)..(1233)

15 <220>
  <221> mat_peptide
  <222> (1)..(1233)

  <400> 5

20 gaa gag cag aat ggt atg aaa ctt gag cgg gtt gtg ata gtg agt cgt      48
   Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg Val Val Ile Val Ser Arg
   1                               5                               10                               15

25 cat ggr gta aga gca cct acg aag ttc act cca ata atg aaa aat gtc      96
   His Xaa Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr Pro Ile Met Lys Asn Val
   20                               25                               30

30 aca ccc gat caa tgg cca caa tgg gat gtg ccg tta gga tgg cta acg      144
   Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val Pro Leu Gly Trp Leu Thr
   35                               40                               45

35 cct cgt ggg gga gaa ctt gtt tct gaa tta ggt cag tat caa cgt tta      192
   Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu Gly Gln Tyr Gln Arg Leu
   50                               55                               60

40 tgg ttc acg agc aaa ggt ctg ttg aat aat caa acg tgc cca tct cca      240
   Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn Gln Thr Cys Pro Ser Pro
   65                               70                               75                               80

45 ggg cag gtt gct gtt att gca gac acg gat caa cgc acc cgt aaa acg      288
   Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp Gln Arg Thr Arg Lys Thr
   85                               90                               95

50 ggt gag gcg ttt ctg gct ggg tta gca cca aaa tgt caa att caa gtg      336
   Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Lys Cys Gln Ile Gln Val
   100                               105                               110

55 cat tat cag aag gat gaa gaa aaa aat gat cct ctt ttt aat ccg gta      384
   His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Asn Asp Pro Leu Phe Asn Pro Val
   115                               120                               125

60 aaa atg ggg aaa tgt tcg ttt aac aca ttg cag gtt aaa aac gct att      432
   Lys Met Gly Lys Cys Ser Phe Asn Thr Leu Gln Val Lys Asn Ala Ile
   130                               135                               140

65 ctg gaa cgg gcc gga gga aat att gaa ctg tat acc caa cgc tat caa      480
   Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln
   145                               150                               155                               160

```

ES 2 723 050 T3

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

ES 2 723 050 T3

```

aat agt cag gga atg tgt tcg tta aaa agt ttt tcc agg ctc att aag      1200
Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser Phe Ser Arg Leu Ile Lys
385                               390                               395                               400

5   gaa att cgc gtg cca gag tgt gca gtt acg gaa taa      1236
Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr Glu
                               405                               410

10  <210> 6
    <211> 411
    <212> PRT
    <213> Variante de la SEQ ID NO:2

15  <220>
    <221> misc_feature
    <222> (18)..(18)
    <223> El 'Xaa' en la posición 18 representa una Gly.

20  <220>
    <221> misc_feature
    <222> (323)..(323)
    <223> El 'Xaa' en la posición 323 representa una Pro.

25  <400> 6

Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg Val Val Ile Val Ser Arg
1                               5                               10                               15

30  His Xaa Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr Pro Ile Met Lys Asn Val
                               20                               25                               30

35  Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val Pro Leu Gly Trp Leu Thr
                               35                               40                               45

40  Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu Gly Gln Tyr Gln Arg Leu
                               50                               55                               60

45  Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn Gln Thr Cys Pro Ser Pro
65                               70                               75                               80

50  Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp Gln Arg Thr Arg Lys Thr
                               85                               90                               95

55  Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Lys Cys Gln Ile Gln Val
                               100                              105                              110

55  His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Asn Asp Pro Leu Phe Asn Pro Val
                               115                              120                              125

```

ES 2 723 050 T3

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

ES 2 723 050 T3

```

Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile Gln Pro Leu Ser Leu Glu
      355                               360                               365

5  Lys Pro Ala Gly Lys Val Asp Leu Lys Leu Ile Ala Cys Glu Glu Lys
      370                               375                               380

10 Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser Phe Ser Arg Leu Ile Lys
     385                               390                               395                               400

Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr Glu
      405                               410

15

<210> 7
<211> 66
<212> DNA
20 <213> Citrobacter braakii ATCC 51113

<220>
<221> sig_peptide
25 <222> (1)..(66)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(66)
30

<400> 7
atg agt aca ttc atc att cgt tta tta ttt ttt tct ctc tta tgc ggt          48
Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly
1           5           10           15

35 tct ttc tca ata cat gct          66
Ser Phe Ser Ile His Ala
      20

40

<210> 8
<211> 22
<212> PRT
<213> Citrobacter braakii ATCC 51113
45

<400> 8

Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly
1           5           10           15

50

Ser Phe Ser Ile His Ala
      20

55

<210> 9
<211> 433

```

ES 2 723 050 T3

<212> PRT
 <213> Citrobacter freundii NCIMB 41247

5 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(433)
 <400> 9

10 Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

15 Ser Phe Ser Ile His Ala Glu Glu Pro Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg
 20 25 30

20 Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr
 35 40 45

25 Pro Ile Met Lys Asp Val Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val
 50 55 60

30 Pro Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu
 65 70 75 80

35 Gly Gln Tyr Gln Arg Leu Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn
 85 90 95

40 Gln Thr Cys Pro Ser Pro Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp
 100 105 110

45 Gln Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro
 115 120 125

50 Lys Cys Gln Ile Gln Val His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Thr Asp
 130 135 140

55 Pro Leu Phe Asn Pro Val Lys Met Gly Thr Cys Ser Phe Asn Thr Leu
 145 150 155 160

60 Lys Val Lys Asn Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu
 165 170 175

65 Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln Ser Ser Phe Arg Thr Leu Glu Asn Val Leu
 180 185 190

ES 2 723 050 T3

Asn Phe Ser Gln Ser Glu Thr Cys Lys Thr Thr Glu Lys Ser Thr Lys
 195 200 205

5
 Cys Thr Leu Pro Glu Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Thr Pro Asp
 210 215 220

10
 Asn Val Ser Leu Pro Gly Ala Trp Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Glu
 225 230 235 240

15
 Ile Phe Leu Leu Gln Glu Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly
 245 250 255

20
 Arg Ile Thr Gly Glu Lys Glu Trp Arg Asp Leu Leu Ser Leu His Asn
 260 265 270

25
 Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg
 275 280 285

30
 Ala Thr Pro Leu Leu Asp Met Ile Asp Thr Ala Leu Leu Thr Asn Gly
 290 295 300

35
 Thr Thr Glu Asn Arg Tyr Gly Ile Lys Leu Pro Val Ser Leu Leu Phe
 305 310 315 320

40
 Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Ser Gly Ala Leu Asp
 325 330 335

45
 Leu Asn Trp Ser Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly
 340 345 350

50
 Glu Leu Val Phe Glu Lys Trp Lys Arg Thr Ser Asp Asn Thr Asp Trp
 355 360 365

55
 Val Gln Val Ser Phe Val Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile
 370 375 380

60
 Gln Pro Leu Ser Leu Glu Lys Pro Ala Gly Lys Val Asp Leu Lys Leu
 385 390 395 400

65
 Ile Ala Cys Glu Glu Lys Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser
 405 410 415

ES 2 723 050 T3

Phe Ser Arg Leu Ile Lys Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr
420 425 430

5 Glu

REIVINDICACIONES

1. Variante de fitasa que tiene al menos un 80% de identidad con la SEQ ID NO: 2 y que comprende al menos dos puentes disulfuro en comparación con la SEQ ID NO: 2, donde dichos dos puentes disulfuro son adicionales a los cuatro de origen natural en las posiciones 77/108, 133/407, 178/187 y 381/390 con la numeración que se proporciona en la SEQ ID NO: 2, donde los al menos dos puentes disulfuro se seleccionan del grupo que consiste en los pares de posiciones: A) 52/99 y B) 31/177 y donde la variante de fitasa tiene una termoestabilidad mejorada en comparación con la fitasa de SEQ ID NO: 2.
- 5
2. Variante de fitasa según la reivindicación 1, donde el número de puentes disulfuro establecidos es tres usando las combinaciones de pares de posiciones siguientes:
- 10 A+B+C, A+B+D, A+B+F y A+B+G, donde A significa 52/99; B significa 31/177; C significa 46/91; D significa 141/199; F significa 59/100; y G significa 162/247.
3. Variante de fitasa según la reivindicación 1, donde el número de puentes disulfuro establecidos es cuatro usando las combinaciones de pares de posiciones siguientes:
- 15 A+B+C+D, A+B+C+F, A+B+C+G, A+B+D+F, A+B+D+G y A+B+F+G, donde A significa 52/99; B significa 31/177; C significa 46/91; D significa 141/199; E significa 31/176, F significa 59/100; y G significa 162/247.
4. Variante de fitasa según las reivindicaciones 1 a 3 que comprende además una modificación en al menos una posición seleccionada de las siguientes: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 35, 41, 45, 46, 53, 55, 56, 57, 59, 60, 64, 66, 73, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 87, 90, 91, 94, 100, 104,105, 106, 107, 109, 111, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 126, 129, 130, 132, 134, 136, 137, 138, 139, 142, 146, 148, 154, 155, 157, 161, 162, 164, 167, 171, 173, 175, 176, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 188, 190, 193, 196, 200, 202, 203, 205, 207, 211, 213, 215, 217, 218, 223, 231, 239, 240, 241, 247, 252, 254, 257, 266, 273, 276, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 289, 294, 299, 300, 308, 314, 316, 321, 324, 330, 331, 336, 338, 339, 340, 344, 345, 348, 351, 355, 361, 362, 363, 364, 369, 371, 372, 373, 375, 379, 385, 386, 392, 406, 409, 410 y 411.
- 20
5. Variante de fitasa según la reivindicación 4, que comprende al menos una de las siguientes modificaciones: 1*, 1H,K,R,Q, 2D, 2*, 3*, 4P, 5P, 6L, 24R,E, 35Y, 41P, 45R, 46D,E, 53V,Q,K, 53V, 55D,I, 56T, 57Y,V, 60P,H,K,R, 66Y, 73D,P, 74P,S,Y,A, 75T, 76G,P, 79F, 80L, 81E, 82E, 83I, 84Y, 87T, 90V,Y, 91P, 100Y, 104I,A, 105F,E, 106A,G, 107D,E,G, 109A,G, 111P, 114H,N,T, 115Q, 116A,E,P,T,Q, 117D,E,K, 118V,I,L,M,T, 119G,K,R,S, 120K,S,T,Q,R 121A,D,M,P,T,V 1211, 122D, 123P,S, 124L,T,V, N126D, K129G 129I,R,P,Q, 130K,V, 1321, 134T 136P, 137P, 138F, 139N, 142D, 146D, 148T 154P,Q,V 155F, 157F, 161P, 164D,E, 167Q, 171T, 173P,T 175L, 179G,I,K,N,Q, 180A,E,G,T, 181D,G,I,K,L,S,W 182G,N,R,V,H,K,S,Q, 183RA,L,P,S,V,Q, 184RT, 184*, 185A,S, 185*, 186*, 188P, 193F, 196Q, 200K,R, 202N,H, 203D,E,T,L, 205P, 207G,S, 211C, 213A, 215M, 218Q, 223E, 231P, 239Q, 240P, 241Q, 252H,L, 254Y, 257E, 266M, 273L,Q, 276K,R, 279S, 280P, 281H, 282P, 283P, 284P, 285G,N,R, E285Y, 286D,T,K,Q, 289P, 294T, 299L, 300V, 308A, 314G,N, 316D, 321A, 324N, 330D, 331K, 336R, 338N, 339D, 340A,I, 343D, 344S, 345N, 348H, 351Y, 355P, 361V, 362K,R, I362F, I362L, 362M, 363R, 364Q, 369N, 371P, 373T, 375N, 379K,R, 385D, 386I, 392I, 406A, 409D,E, 410D,E y/o 411R,K.
- 25
- 30
- 35
6. Variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde los aminoácidos en la posición 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185 y 186 se han sustituido por QADKP, GEDKP, NGISA, IAGKS, KEKHQ, KEKQQ, KEKKV o KTDKL.
7. Variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende una combinación de modificaciones seleccionadas de las siguientes: 1*/2*, 1*/2*/3*, 55D/331K, 111P/241Q, 179K/180E/181K/182H/183Q/184*/185*/186*, 179K/180E/181K/182Q/183Q/184*/185*/186*, 179K/180E/181K/182K/183V/184*/185*/186*, 179K/180T/181D/182K/183L/184*/185*/186*, 114T/115Q/116A/117D/118T/119S/120S/121P/122D/123P/124L y 114T/115Q/116T/117D/118T/119S/120S/121P/122D/123P/124L.
- 40
- 45
8. Variante de fitasa según las reivindicaciones 1-7, donde las sustituciones para establecer los puentes disulfuro son:
- 50 A'. G52C/A99C,
B'. N31C/T177C,
C'. W46C/Q91C,
D'. K141C/V199C,
F'. G59C/F100C y/o

G'. S162C/S247C

9. Variante de fitasa según la reivindicación 8, que comprende una modificación adicional seleccionada de las siguientes:

5 E1K, E1Q, E2D, M6L, K24E, K24R, D35Y, G45R, E53K, E53V, V55I, S56T, E57V, Q60H, Q60K, Q60R, F66Y, N73D, N73P, N74P, N74S, N74Y, Q75T, T76G, T76P, S79F, P80L, G81E, V83I, A87T, D90V, D90Y, F100Y, L104I, Y114N, E118V, K120R, T121I, T121P, N126D, K129G, M130K, M130V, T132I, S134T, L138F, K139N, N142D, E146D, A148T, L154Q, L154V, Y155F, S173T, T181I, T181L, T181S, T181W, E182A, E182G, E182H, E182I, E182N, E182R, E182V, K183P, K183R, S184R, S184T, T185A, T185S, L193F, D202H, N203D, N203E, N203F, N203G, S211C, S213A, Q252H, Q252L, Q257E, R266M, L279S, E285Y, N286D, N286T, A300V, G321A, K336R, K338N, T340A, T340I, N343D, T344S, D345N, Q348H, D361V, I362F, I362L, I362M, Q363R, P364Q, K369N, A371P, K373T, D375N, S386I y L392I o una combinación de modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en: K24E/Q60H; Q60K/V83I; N126D/T340I; K24E/L392I; F66Y/Y114N; T132I/P364Q; N73P/N74S; N73P/N74P; Q75T/T76G; D202H/N203E; Q252L/Q348H; K24E/N74Y; N126D/L279S; E2D/R266M; E118V/A300V; K24E/S173T; E53K/N343D; T76P/S213A; L138F/L193F; Q252L/K373T; G45R/Q257E/N286T; K139N/P207S/R266M; F100Y/S134T/P207S; E1K/K24E/Q60H; K24E/Q60H/Q363R; T181W/E182N/K183R; T181W/E182H/K183R; T181W/E182R/K183R; T181W/E182A/K183R; A0T/K129G/N286D; E1K/E53K/F66Y; M130K/N203D/L279S; S56T/Q252L/S386I; K24E/V55I/T181S; Q60R/F66Y/L104I/I362L, K24E/Q60H/E146D/Q252L, Q60K/T132I/Q257E/N284T, Q60R/D90V/Q252H/T340A, E22D/E57V/N73D/K338N, E1K/M6L/A87T/T121P/I362L, K24E/Q60H/N126D/T132I/T340I, E1Q/S79F/Q252L/I362M/K369N, K24E/Q60H/N73D/D90V/K120R/D361V, Q60K/F66Y/N74P/Q75T/T76G/V83I/Q252H/Q257E/A371P, Q60K/F66Y/N73P/N74P/Q75T/Q257E/I362L/P364Q/A371P, Q60K/F66Y/N74P/T76G/Y114N/M130V/Y155F/T340I/I362F/A371P/D375N, A/B/K129P, A/B/K129Q, A/B/K129I, A/B/K129R, A/B/P207G/A/B/N203L/P207G, A/B/K129R/N203L, A/B/K129R/N203L/P207G, A/B/K24R, A/B/K24R/K129P, A/B/K24R/K129R/N203L/P207G, A/B/K24R/K129R/N203L, A/B/D, A/D/F66L/R94V/ \sum a/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336 V, A/D/F66L/R94V/ \sum a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V, A/D/L64F/F66L/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A, A/D/F66L/R94V/ \sum a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V/Q252W, A/D/F66L/R94V/ \sum a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V/Q252Y, A/D/F66L/R94V/ \sum a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V/Q252F, A/D/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A, A/B/D/F66L/R94V/ \sum a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V, A/B/D/F66L/R94V/ \sum a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V/Q252Y, A/B/D/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A, A/D/R94V/K116A/E118T/E119S/K120S/N121R/T188S/P190T/S213G/T217A/K336V, A/D/R94V/K116A/E118T/E119S/K120S/N121R/T188S/P190T/S213G/T217A, A/D/R94V/K116A/E118T/E119S/K120S/T188S/P190T/T217A, A/D/ \sum a/E182K/K183Q/T185G/K186L/S213G/T217A/K336V, A/O/F66L/R94V/ \sum a/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/ K336V, A/D/F66L/R94V/ \sum a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V, D/F66L/R94V/ \sum a/K179N/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V, D/F66L/R94V/ \sum a/E182N/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V, A/D/ \sum b/E182R/K183Q/T185G/K186L/S213G/T217A/K336R, D/F66L/ \sum b/E182R/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/S213G/T217A/K336R, D/F66L/ \sum b/E182R/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/E196R/S213G/T217A/K336R, D/ \sum b/E182R/K183Q/T185G/K186L/S213G/T217A/K336R/K393G/R397Q/K400A, D/ \sum b/E182K/K183Q/T185G/K186L/S213G/T217A/K336V, D/ \sum c/K183Q/T185G/K186L/S213G/T217A, A/D/F66L/R94V/ \sum d/E182K/K183Q/T185G/K186L/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V, A/D/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A, A/B/D/F66L/R94V/ \sum a/T188S/P190T/P207G/S213G/T217A/K336V, D/K116A/E119S/T217A, D/E1*E2*/R94V/K116A/E119S/T188S/P190T/T217A, donde A significa G52C/A99C, B significa N31C/T177C, C significa W46C/Q91C, D significa K141C/V199C, E significa N31C/E176C, F significa G59C/F100C y G significa S162C/S247C; y donde \sum a significa la sustitución del fragmento TQADTSSR por el fragmento YQKDEEKN en las posiciones 114-121, \sum b significa la sustitución del fragmento TQADTSSP por el fragmento YQKDEEKN, \sum c significa la sustitución del fragmento TQADTSSN por el fragmento YQKDEEKN, \sum d significa la sustitución del fragmento TQADTSS por el fragmento YQKDEEKN.

55

60

10. Método para producir la variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende el establecimiento de al menos dos puentes disulfuro en comparación con la SEQ ID NO: 2, donde dichos dos puentes

disulfuro no están entre los cuatro de origen natural en las posiciones 77/108, 133/407, 178/187 y 381/390 con la numeración que se proporciona en la SEQ ID NO: 2, y donde al menos dos puentes disulfuro se establecen en los pares de posiciones A+B, donde A significa 52/99 y B significa 31/177.

5 11. Método según la reivindicación 10, donde la parte madura de la fitasa de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 9 se usa como un progenitor/esqueleto para producir una variante de fitasa.

12. Secuencia de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

10 13. Constructo de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 12 operativamente unida a una o más secuencias de control que dirigen la producción de la fitasa en un huésped de expresión adecuado.

14. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácido nucleico según la reivindicación 13.

15. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácido nucleico según la reivindicación 13 y/o el vector de expresión según la reivindicación 14.

16. Método para la producción de la variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende

15 (a) el cultivo de la célula huésped según la reivindicación 15 para producir un sobrenadante que comprende la fitasa; y
(b) la recuperación de la fitasa.

20 17. Planta transgénica, o parte de una planta, donde la planta o parte de una planta se construye por incorporación de uno o más constructos de expresión según la reivindicación 13 capaces de expresar una variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

18. Composición que comprende al menos una variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

19. Composición según la reivindicación 18 que comprende además

25 (a) al menos una vitamina liposoluble;
(b) al menos una vitamina hidrosoluble; y/o
(c) al menos un oligoelemento.

20. Composición según la reivindicación 19 que comprende además al menos una enzima seleccionada del grupo de enzimas siguiente: amilasa, fitasa, fosfatasa, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasas, fosfolipasas y/o beta-glucanasas.

21. Composición de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, que es un aditivo alimentario para animales.

30 22. Método para mejorar el valor nutricional de un alimento para animales, donde la variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21 se añade al alimento.

35 23. Uso de la variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 19-21 en alimento para animales; en la preparación de alimento para animales; para mejorar el valor nutricional del alimento para animales; para reducir los niveles de fitato en el estiércol animal; para el tratamiento de proteínas vegetales; o para liberar fósforo a partir de un sustrato de fitasa.

40 24. Método para la producción de un producto de fermentación, que comprende (a) la fermentación usando un microorganismo fermentador un material que contiene carbohidratos en presencia de una variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y (b) la producción del producto de fermentación o el coproducto de fermentación a partir del material que contiene carbohidratos fermentado.

25. Método según la reivindicación 24, donde el producto de fermentación es etanol, cerveza, vino o residuos secos de destilería (DDG).

ES 2 723 050 T3

SEQ2	1	EEQNGMKLERVVIVSRHGVRAPTKFTPI	28
		.	
SEQ9	1	MSTFIIRLLFFSLLCGSFSIHAEEPNGMKLERVVIVSRHGVRAPTKFTPI	50
SEQ2	29	MKNVTPDQWPQWDVPLGWLTPRGGELVSELGQYQRLWFTSKGLLNNQTCP	78
		:	
SEQ9	51	MKDVTDPDQWPQWDVPLGWLTPRGGELVSELGQYQRLWFTSKGLLNNQTCP	100
SEQ2	79	SPGQVAVIADTDQRTKTRKTEAFLAGLAPKCQIQVHYQKDEEKNDPLFNPV	128
		. . .	
SEQ9	101	SPGQVAVIADTDQRTKTRKTEAFLAGLAPKCQIQVHYQKDEEKNDPLFNPV	150
SEQ2	129	KMGKCSFNTLQVKNAILERAGGNIELYTQRYQSSFRLENVNLNFSQSETC	178
		. . :	
SEQ9	151	KMGKCSFNTLQVKNAILERAGGNIELYTQRYQSSFRLENVNLNFSQSETC	200
SEQ2	179	KTTEKSTKCTLPEALPSELKVTDPDNVSLPGAWLSSTLTEIFLLQEAQGM	228
		. .	
SEQ9	201	KTTEKSTKCTLPEALPSELKVTDPDNVSLPGAWLSSTLTEIFLLQEAQGM	250
SEQ2	229	PQVAWGKITGEKEWRDLSLHNAQFDLLQRTPEVARSRATPLLDMIDTAL	278
		. .	
SEQ9	251	PQVAWGKITGEKEWRDLSLHNAQFDLLQRTPEVARSRATPLLDMIDTAL	300
SEQ2	279	LTNGTTENRYGIKLPVSLFFIAGHDTNLANLSGALDLNWSLPGQPDNTPP	328
		. .	
SEQ9	301	LTNGTTENRYGIKLPVSLFFIAGHDTNLANLSGALDLNWSLPGQPDNTPP	350
SEQ2	329	GGELVFEKWKRTSDNTDQVSVFYQTLRDMRDIQPLSLEKPAQKVDLKL	378
		. .	
SEQ9	351	GGELVFEKWKRTSDNTDQVSVFYQTLRDMRDIQPLSLEKPAQKVDLKL	400
SEQ2	379	IACEEKNSQGMCSLKSFSRLIKEIRVPECAVTE	411
		. .	
SEQ9	401	IACEEKNSQGMCSLKSFSRLIKEIRVPECAVTE	433

Fig. 1