

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/117452 A1

(43) Fecha de publicación internacional
29 de septiembre de 2011 (29.09.2011)

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 9/16 (2006.01) A23K 1/165 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01) C12P 7/18 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2011/070198

(22) Fecha de presentación internacional:
24 de marzo de 2011 (24.03.2011)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201030438 24 de marzo de 2010 (24.03.2010) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES];
Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **HAROS, Claudia Monika** [GR/ES]; Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, E-46980 PATERNA (Valencia) (ES). **MONEDERO GARCÍA, Vicente** [ES/ES]; Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, E-46980 PATERNA (Valencia) (ES). **YEBRA YEBRA,**

María Jesús [ES/ES]; Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, E-46980 PATERNA (Valencia) (ES). **TAMAYO RAMOS, Juan Antonio** [ES/ES]; Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, E-46980 PATERNA (Valencia) (ES).

(74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

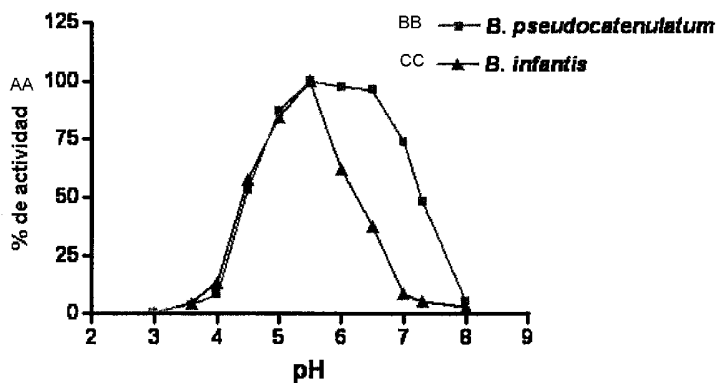
(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: TRUNCATED PHYTASES OF BIFIDOBACTERIA AND USES THEREOF

(54) Título : FITASAS TRUNCADAS DE BIFIDOBACTERIAS Y SUS USOS



AA % activity
BB B. pseudocatenulatum
CC B. infantis

FIG. 1A

(57) Abstract: The invention relates to an isolated polynucleotide consisting of a nucleotide sequence coding for an amino acid sequence of Bifidobacterium having at least 55% identity with amino acid sequence SEQ ID NO: 1, in which said amino acid sequence lacks a sequence coding for the transmembrane helix, located at the carboxy-terminal end of the original sequence, and in which said amino acid sequence is a protein of which the main activity is phytase. Preferably, the polynucleotide originates from strains of Bifidobacterium pseudocatenulatum (B. pseudocatenulatum) ATCC27919 or Bifidobacterium longum subsp. infantis (B. longum subsp. infantis) ATCC15697. The invention also relates to the use of the polynucleotide, or to any of the products described in the invention, in order to reduce the phytate content of a food or to produce myo-inositol triphosphate (InsP₃).

(57) Resumen:

[Continúa en la página siguiente]



WO 2011/117452 A1



CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

Publicada:

— *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

La presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que consiste en una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica de *Bifidobacterium* que tiene al menos un 55% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, donde dicha secuencia aminoacídica carece de la secuencia que codifica para la hélice transmembrana, situada en el extremo carboxi-terminal de la secuencia original, y dicha secuencia aminoacídica es una proteína cuya actividad mayoritaria es fitasa. Dicho polinucleótido procede preferiblemente de las cepas *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (en adelante *B. pseudocatenulatum*) ATCC27919 o de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (*B. longum* subsp. *infantis*) ATCC15697. Además, la presente invención se refiere al uso del polinucleótido, o a cualquiera de los productos descritos en la invención, para reducir el contenido de fitatos de un alimento o para producir *mio*-inositol trifosfato (InsP_3).

Fitosas truncadas de Bifidobacterias y sus usos

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología y de la alimentación, en concreto, la presente invención se refiere a fitosas truncadas de *Bifidobacterias*, solubles y fácilmente purificables, que pueden aplicarse a todos los alimentos que comprendan productos vegetales que posean alto contenido de fitatos, como por ejemplo, que comprendan cereales y legumbres, tanto para consumo humano como para consumo animal.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

Los productos a base de cereales, oleaginosas y legumbres pueden contener sustancias antinutritivas tales como el ácido fítico (hexakisfosfato de *mi*-inositol, InsP_6 o $\text{Ins}(1,2,3,4,5,6)\text{P}_6$) y sus sales (fitatos), la mayor forma de almacenamiento de fósforo en semillas y polen (Fretzdorff y Brümmer, 1992. *Cereal Chem*, 69: 266-270).

El fitato se encuentra como poli-anión en un amplio intervalo de pH y por consiguiente posee una alta afinidad por componentes de los alimentos con cargas positivas, tales como los minerales, elementos traza y proteínas (Cheryan, 1980. *Crit. Rev Food Sci Nutr*, 13: 297-335). La mayor preocupación sobre la presencia de fitatos en la dieta humana y animal es el efecto negativo sobre la absorción de minerales. Estas sustancias son capaces de formar complejos insolubles con metales al pH del tracto gastrointestinal lo que produce la disminución de la biodisponibilidad de minerales (Erdman, 1979. *J Am Oil Chem Soc*, 56: 736-741; Zemel y Shelef, 1982. *J Food Sci*, 47: 535-537). Muchas investigaciones han demostrado que una dieta rica en fitatos causa deficiencia en zinc, calcio, hierro, magnesio, manganeso y cobre, particularmente en dietas desequilibradas, en poblaciones de riesgo y en alimentación animal (Sandberg *et al.*, 1982. *J Nut*, 48: 185-189; Weaver *et al.*, 1991. *J Nut*, 121: 1769-1775; Sandberg *et al.*, 1999. *Am J Clin Nut*, 70: 240-246). Estudios *in vitro* e *in vivo* indicaron que una desfosforilación parcial del

ácido fítico o fitatos disminuye el efecto negativo en la absorción de minerales (Sandberg *et al.*, 1989. *J Food Sci*, 54: 159-161; Larsson y Sandberg, 1991. *J Cereal Sci*, 14: 141-149). Los alimentos contienen mezclas de diferentes fosfatos de *mio*-inositol con diferentes formas isoméricas, las cuales pueden interactuar con otros componentes de los alimentos y en ciertas condiciones el tetrafosfato (InsP_4) o el trifosfato de *mio*-inositol (InsP_3) podrían disminuir o incrementar la absorción de minerales (Shen *et al.*, 1998. *J Nutr Biochem*, 9: 298-301; Sandberg *et al.*, 1999. *Am J Clin Nutr*, 70: 240-246).

La hidrólisis completa o avanzada del InsP_6 en productos alimenticios a base de cereales y leguminosas disminuye el efecto negativo en la absorción de minerales y se generan productos de hidrólisis intermedios que poseen actividad biológica específica en el organismo humano, lo que podría afectar positivamente la salud. Se ha demostrado que algunos isómeros de InsP_3 e InsP_4 tienen efectos farmacológicos importantes como anti-inflamatorio, en prevención de complicaciones diabéticas, implicados en el crecimiento y diferenciación celular, o la regulación del calcio intracelular (Shears, 1998, *Biochim Biophys Acta*, 1436: 49-67; Shi *et al.*, 2006. *Subcell Biochem*, 39: 265-292).

Generalmente el fósforo en forma de fitato no está disponible para los animales monogástricos, es decir, animales no rumiantes, ya que no disponen de la enzima digestiva fitasa, que es necesaria para separar el fósforo de la molécula de fitato. Sin embargo los animales rumiantes pueden asimilar el fósforo del fitato ya que disponen de microorganismos en el rumen que producen fitasa. La enzima fitasa tiene la capacidad de romper enlaces en los que el fósforo está unido a la molécula de fitato y de este modo produce la liberación del mismo.

Actualmente no existen fitasas para consumo humano. Están disponibles fitasas comerciales para ser administradas en la elaboración de piensos de animales monogástricos. Los productos que actualmente se comercializan son:

Natuphos (BASF), Ronozyme P (Novozymes a/S), Phzyme (Danisco A/S, Diversa), Finase (AB Enzymes), Allzyme (Alltech).

5 *Aspergillus niger* es el microorganismo que produce la fitasa extracelular más activa. En la actualidad existen fitasas comerciales disponibles obtenidas por fermentación de *Aspergillus* genéticamente modificado (Natuphos, Novo y Finase) y por extracción del medio de cultivo de *Aspergillus* no modificado genéticamente (Allzyme). El uso de fitasas comerciales podría mejorar la bioaccesibilidad de los minerales de los productos a base de cereales o
10 leguminosas mediante la eliminación del fitato, lo cual es una práctica común en alimentación animal. Normalmente para su producción se emplean cultivos de hongos de *Aspergillus* y *Trichoderma*. Sin embargo, hasta el momento, las fitasas comerciales no son utilizadas para consumo humano, ya que no son consideradas de grado alimentario. Además, muchas fitasas comerciales no
15 son específicas de fitato.

Por tanto, se identifica un problema en el estado de la técnica que consiste en la necesidad de proveer fitasas procedentes de microorganismos GRAS/QPS (*Generally Regarded as Safe/Qualified Presumption of Safety*). Este problema
20 queda parcialmente resuelto tal como indican algunas publicaciones que se refieren al uso de bifidobacterias para la degradación de fitato (Palacios *et al.*, 2008. *Eur. Food Res. Technol.*, 226: 825-831; Palacios *et al.* 2008. *Food Microbiol*, 25: 169-176, Sanz Penella *et al.*, 2009. *J Agric Food Chem*, 57: 10239-10244). Como consecuencia, queda pendiente la solución completa al
25 problema planteado, de forma eficaz, es decir, mediante el aislamiento de secuencias que codifiquen para fitasas y donde estas fitasas presenten una solubilidad aceptable que facilite su purificación.

Esta tarea supondría aportar al estado de la técnica una herramienta de gran
30 utilidad en la disponibilidad de fósforo procedente de la molécula de fitato así como el aumento de la biodisponibilidad de minerales. Para ello es necesario tener en cuenta que cambios en un sólo aminoácido en una proteína pueden

provocar alteraciones en el plegamiento de la misma que ocasionen la pérdida de actividad fitasa, por tanto, la consecución de dicha herramienta tecnológica podría no ser obvia. Hasta la fecha no se ha descrito ningún gen codificante de un enzima fitasa en cepas de *Bifidobacterium* y los genomas secuenciados de *Bifidobacterium* no portan genes que codifiquen ninguna proteína con homología a fitasas conocidas. La búsqueda de proteínas que presenten distintos dominios fosfatasa en *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 y *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC15697 da como resultado multitud de proteínas hipotéticas. Dos de estos genes (BLON_0263 y BIFPSEUDO_03792) codificaban proteínas con un dominio histidín fosfatasa ácida. Estas dos proteínas hubieran quedado en principio excluidas del análisis, ya que las características de los extractos de fitasas impuros descritos para *Bifidobacterium* en bibliografía indicaron que el pH óptimo de reacción se encontraba cercano al pH neutro, la reacción tendía a la acumulación de InsP_3 y el extracto era más específico de fitatos que *p*-nitrofenilfosfato (Haros *et al.*, 2005. *FEMS Microbiol Lett*, 247: 231-239; Haros *et al.*, 2007. *Int J Food Microbiol*, 117: 76-84; Haros *et al.*, 2009. *Int J Food Microbiol*, 135: 7-14).

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que consiste en una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica de *Bifidobacterium* que tiene al menos un 55% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, donde dicha secuencia aminoacídica carece de la secuencia que codifica para la hélice transmembrana, situada en el extremo carboxi-terminal de la secuencia original, y dicha secuencia aminoacídica es una proteína cuya actividad mayoritaria es fitasa. Dicho polinucleótido procede preferiblemente de las cepas *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (en adelante *B. pseudocatenulatum*) ATCC27919 o de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (*B. longum* subsp. *infantis*) ATCC15697. La secuencia aminoacídica para la que codifica el polinucleótido puede tener unida a su extremo amino-terminal una secuencia que codifica para un péptido

señal. Asimismo, la presente invención también se refiere al producto de expresión del polinucleótido, a la secuencia aminoacídica aislada codificada por dicho polinucleótido, al vector o a la célula que comprende el polinucleótido o a la población celular que comprende dicha célula. Además, la presente invención se refiere al uso del polinucleótido o a cualquiera de los productos descritos para reducir el contenido de fitatos de un alimento o para producir *mío*-inositol trifosfato (InsP_3), o a diversos métodos para la producción del polinucleótido.

10 La presente invención provee un polinucleótido aislado que codifica para una proteína con actividad fitasa procedente de bacterias del género *Bifidobacterium*. Dicha proteína está truncada y como consecuencia puede purificarse de forma más eficaz que la proteína original de la que procede ya que carece de una secuencia que codifica para una hélice transmembrana, situada en el extremo carboxi-terminal de la secuencia original. La proteína truncada presenta una serie de ventajas técnicas relevantes respecto al estado de la técnica, entre ellas podemos destacar:

- Presenta mayor solubilidad que la proteína original sin modificar.
- 20 - Dicha proteína truncada sigue presentando alta especificidad por el fitato a pesar de haber eliminado un fragmento de la misma. El resto de fitasas comerciales no presentan tanta especificidad.
- El polinucleótido que codifica para la proteína truncada se traduce con mayor facilidad en un sistema homólogo o heterólogo como una proteína soluble. Es decir, para un tiempo dado, al emplear un sistema de expresión determinado, se obtendrá más cantidad de proteína con actividad fitasa si se expresa un polinucleótido que codifica para la proteína truncada que si se expresa un polinucleótido que codifica para la proteína original (completa).
- 25 - A pesar de que la secuencia nucleotídica es una secuencia rica en nucleótidos G y C, se expresa adecuadamente en *E. coli*, lo cual permite su obtención de forma dirigida y controlada con vectores optimizados para este sistema de expresión heterólogo.
- 30

Tal como se ha descrito en el apartado anterior, hasta la fecha no se ha descrito ningún gen codificante de un enzima fitasa en cepas de *Bifidobacterium*. Los inventores de la presente invención llevaron a cabo la búsqueda de proteínas que presentasen distintos dominios fosfatasa en *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 y *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC15697, obteniendo multitud de proteínas hipotéticas. Se seleccionaron dos de los genes que codificaban para dichas proteínas (BLON_0263 y BIFPSEUDO_03792) y sus proteínas se caracterizaron por tener un dominio histidín fosfatasa ácida. Debido a que en el estado de la técnica se había sugerido que el pH óptimo de los extractos de fitasas impuros descritos para *Bifidobacterium* se encontraba cercano al pH neutro, las proteínas seleccionadas por los inventores podrían haber quedado excluidas por el experto en la materia para solucionar el problema técnico de la invención. Sin embargo, los resultados obtenidos por los inventores, mostrados en el apartado correspondiente, muestran que mediante la selección de dichas enzimas (por la presencia en la secuencia aminoacídica de dominios putativos de anclaje a la superficie celular y su localización celular) y gracias al truncamiento de las mismas, se obtuvieron las proteínas en forma soluble con actividad fitasa procedentes de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 y *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC15697.

Por otra parte, la proteína procede de microorganismos considerados GRAS/QPS (*Generally Regarded as Safe/Qualified Presumption of Safety*) y utilizados comúnmente como probióticos en preparados alimenticios. Esto puede facilitar su inclusión en alimentos en los que la hidrólisis de fitatos y la formación de nuevos isómeros de fosfatos de *mio*-inositol pueda suponer una ventaja a nivel nutricional y de salud.

Por tanto, en la presente invención se provee una enzima con actividad fitasa altamente específica para el fitato incluyendo las herramientas necesarias para su purificación, eliminando parte de la secuencia aminoacídica de dicha

proteína. Dicho truncamiento no supone cambios en la estructura terciaria de la proteína de modo que se conserva la actividad de la misma.

Así pues, un aspecto de la presente invención se refiere a un polinucleótido
5 aislado que consiste en una secuencia nucleotídica que codifica para una
secuencia aminoacídica de *Bifidobacterium* que tiene al menos un 55% de
identidad con respecto a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, en toda su
longitud, donde dicha secuencia aminoacídica es una proteína cuya actividad
mayoritaria es fitasa. La secuencia aminoacídica carece de una secuencia que
10 codifica para la hélice transmembrana, situada en el extremo carboxi-terminal
de la secuencia original. Preferiblemente el polinucleótido aislado consiste en
una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica de
Bifidobacterium que tiene al menos un 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 63%,
65%, 67%, 69%, 71%, 73%, 75%, 77%, 79%, 81%, 83%, 85%, 87%, 89%,
15 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con
respecto a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, en toda su longitud.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que
consiste en una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia
20 aminoacídica de *Bifidobacterium* que tiene al menos un 55% de identidad con
respecto a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3, en toda su longitud,
donde dicha secuencia aminoacídica es una proteína cuya actividad
mayoritaria es fitasa. La secuencia aminoacídica carece de una secuencia que
codifica para la hélice transmembrana, situada en el extremo carboxi-terminal
25 de la secuencia original. Preferiblemente el polinucleótido aislado consiste en
una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica de
Bifidobacterium que tiene al menos un 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 63%,
65%, 67%, 69%, 71%, 73%, 75%, 77%, 79%, 81%, 82%, 83%, 85%, 87%,
89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad
30 con respecto a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3, en toda su longitud.

La secuencia de aminoácidos puede estar codificada por cualquier secuencia nucleotídica que de lugar a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la invención por medio de la transcripción de la secuencia nucleotídica a un ARN mensajero y su posterior traducción a la secuencia de aminoácidos. Debido a
5 que el código genético es degenerado, un mismo aminoácido puede ser codificado por diferentes codones (tripletes), por ello, la misma secuencia de aminoácidos puede ser codificada por distintas secuencias de nucleótidos.

El término secuencia original se refiere a la secuencia aminoacídica de la
10 proteína, sin truncar, es decir, la secuencia que comprende el péptido que codifica para la hélice transmembrana, así como el péptido señal correspondiente.

La secuencia aminoacídica codificada por el polinucleótido de la invención
15 puede presentar variantes. Estas variantes se refieren a variaciones limitadas en la secuencia aminoacídica, que permiten el mantenimiento de la funcionalidad de la proteína. Esto quiere decir que la secuencia de referencia y la secuencia de la variante son similares en conjunto, e idénticas en muchas regiones. Estas variaciones se generan por sustituciones, deleciones o
20 adiciones. Dichas sustituciones incluyen, aunque sin limitarse, sustituciones entre ácido glutámico (Glu) y ácido aspártico (Asp), entre Lisina (Lys) y Arginina (Arg), entre asparagina (Asn) y glutamina (Gln), entre serina (Ser) y treonina (Thr), y entre los aminoácidos que componen el grupo alanina (Ala), leucina (Leu), valina (Val) e isoleucina (Ile). Las variaciones pueden ser variaciones
25 existentes en la naturaleza como por ejemplo variaciones alélicas, o generadas artificialmente como por ejemplo mediante mutagénesis o síntesis directa. Estas variaciones no provocan modificaciones esenciales en las características o propiedades esenciales de la proteína.

30 La proteína adicionalmente puede incluir secuencias secretoras, secuencias que permitan su purificación como colas de histidinas, prosequencias o secuencias que aumenten su estabilidad durante la producción de la proteína.

El género *Bifidobacterium* está integrado por bacterias Gram-positivas, anaeróbicas, saprófitas de la flora intestinal que residen en el colon, ayudando en la digestión. Algunas bifidobacterias son usadas como probióticos. En la presente invención, la secuencia nucleotídica que codifica para la fitasa se aísla de al menos una cepa seleccionada de la lista de especies que comprende, pero sin limitarse, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis*, *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. boum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. denticolens*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. globosum*, *B. indicum*, *B. infantis*, *B. inopinatum*, *B. lactis*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. subtile*, *B. suis*, *B. thermacidophilum*, *B. thermophilum*. *B. pseudocatenulatum* o *B. longum*. Preferiblemente la secuencia nucleotídica que codifica para la fitasa se aísla de al menos una cepa de la especie *B. pseudocatenulatum* (preferiblemente de la cepa ATCC27919) o *B. longum* subsp. *infantis* (preferiblemente de la cepa ATCC15697).

SEQ ID NO: 1 corresponde con la secuencia aminoacídica truncada de la proteína fitasa de *B. pseudocatenulatum* ATCC27919. Dicha secuencia carece tanto de la secuencia aminoacídica que codifica para el péptido señal del extremo amino-terminal como de la secuencia que codifica para la hélice transmembrana del extremo carboxi-terminal.

En la Tabla 1 se ofrecen los porcentajes de identidad entre diferentes secuencias aminoacídicas de fitasas de Bifidobacterias, además del género *Clavibacter* y *Rhodococcus*. La expresión "porcentaje (%) de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos, tal como se entiende en la presente invención, se refiere al número de posiciones aminoacídicas sobre la longitud total de la secuencia que se compara, donde todos los aminoácidos en esa posición son idénticos. Como puede observarse, el porcentaje de identidad de las proteínas de las bifidobacterias adquiere valores desde el 59% al 83%. La secuencia más diferente al resto de Bifidobacterias parece ser la de *B. pseudocatenulatum* ATCC27919 ya que muestra los porcentajes de identidad más bajos con

respecto a las secuencias aminoacídicas del resto de cepas del género *Bifidobacterium*. El porcentaje de identidad más bajo es el que muestran las secuencias de *B. pseudocatenulatum* ATCC27919 y *B. longum* subsp. *infantis* ATCC15697 entre sí, sin embargo, tal como se demuestra en la presente invención, las dos secuencias muestran actividad fitasa mayoritaria y las dos proteínas se encuentran más solubles que la respectiva proteína no truncada (ver el apartado de ejemplos).

Las cepas de *B. pseudocatenulatum* ATCC27919 y *B. longum* subsp. *infantis* ATCC15697 han sido depositadas en otras colecciones de cultivos además de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Así pues, la cepa de *B. pseudocatenulatum* ATCC27919 también se ha depositado en autoridades de depósito de microorganismos con los números CECT5776; cepa B1279; AS 1.2277; BCRC (antiguamente CCRC) 15476; CCUG 34989; CIP 104168; DSM 20438; HAMBI 562; JCM 1200; LMG 10505; CUETM 89-16; CCTM 3069; Scardovi B1279. Por otra parte, la cepa de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC15697 también se ha depositado en autoridades de depósito de microorganismos con los números CECT 4551; CCRC 14602; CCTM La 3067; CCUG 18368; CCUG 30512; CIP 64.67; CUETM 89-19; DSM 20088; JCM 1222; LMG 8811; LMG 10499; NCFB 2205; NCTC 11817; Reuter S12.

De esta forma el porcentaje de al menos un 55% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 está justificado, ya que microorganismos de otros géneros tienen una secuencia con identidades que van desde el 36% al 41% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, porcentaje muy alejado con respecto a los obtenidos entre cepas de bifidobacterias. Los porcentajes de identidad se han obtenido mediante el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>) del Instituto Europeo de Bioinformática del Laboratorio Europeo de Biología Molecular. (EMBL-EBI) que permite realizar un alineamiento de dichas secuencias y asigna dichos porcentajes de forma automática.

Tabla 1. Porcentaje de identidad entre varias secuencias aminoacídicas de fitasas de Bifidobacterias y de los géneros *Clavibacter* y *Rhodococcus*. Los números de acceso de las secuencias citadas en esta tabla son:

B. longum subsp. *infantis* ATCC15697 (YP_002321769), *B. pseudocatenulatum* ATCC27919 (ZP_03743199), *B. dentium* ATCC 27678 (EDT45330), *B. longum* DJO10A (YP_001955145.1), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB 382 (YP_001221200.1), *Rhodococcus erythropolis* PR4 (YP_002763531.1)

Proteína Especie 1	Proteína Especie 2	% Identidad
<i>B. pseudocatenulatum</i> ATCC27919	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC15697	59
	<i>Bifidobacterium dentium</i>	61
	<i>Bifidobacterium longum</i>	62
	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	36
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	41
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC15697	<i>Bifidobacterium dentium</i>	83
	<i>Bifidobacterium longum</i>	70
	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	40
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	42

10

El porcentaje de identidad de la secuencia aminoacídica se refiere al número de aminoácidos idénticos en las posiciones aminoacídicas equivalentes de la longitud total de la secuencia de la presente invención que se compara, es decir, en toda su longitud.

15

La "hélice transmembrana" o hélice de membrana se refiere a la secuencia aminoacídica que constituye uno o varios segmentos apolares que se encuentran embebidos en la bicapa lipídica de la membrana celular. Estos segmentos apolares están constituidos por una o varias hélices α , que
5 constituye el principal motivo de estructura secundaria de la proteína.

Dicha secuencia se caracteriza porque carece de una secuencia que codifica para la hélice transmembrana, situada en el extremo carboxi-terminal de la secuencia original sin truncar. El péptido que codifica para la hélice
10 transmembrana tiene la función de fijar la proteína fitasa original a la membrana celular, provocando su insolubilidad y por tanto la dificultad de ser purificada. Además, dicha proteína, a pesar de estar truncada, conserva su actividad enzimática fitasa y su alta especificidad por el fitato.

15 La enzima también presenta actividad fosfatasa, sin embargo, esta actividad es minoritaria. La actividad fitasa y fosfatasa de las enzimas se puede determinar por medio de la medida de la especificidad de las mismas por determinados sustratos (ver tabla 6). Para determinar la "actividad mayoritaria fitasa" de la enzima de la presente invención se puede usar cualquier técnica conocida en
20 el estado de la técnica y dicha actividad sería mayoritaria siempre que la actividad fitasa sea mayor que la actividad fosfatasa. Preferiblemente la actividad fitasa puede determinarse mediante la medida de la especificidad de la enzima por el fitato respecto de la especificidad de la misma enzima por el sustrato *p*-nitrofenilfosfato (pNPP). Por tanto, de acuerdo con los resultados
25 mostrados en la tabla 6, la "actividad mayoritaria fitasa" de dicha enzima se refiere a que la relación entre actividad fitasa/actividad fosfatasa es mayor de 50, 60, 70, 80, 90 ó 100. Preferiblemente la relación entre actividad fitasa/actividad fosfatasa es igual o mayor de 90 y más preferiblemente la relación entre actividad fitasa/actividad fosfatasa es igual o mayor de 100.

30

En este caso la actividad fitasa se define en U_{fit}/mg de proteína y la actividad fosfatasa se define en U_{fol}/mg de proteína.

U_{fit} : μ moles de fósforo inorgánico liberados por hora a 50°C y pH: 6,0; empleando como sustrato fitato de potasio.

5 U_{tot} : μ moles *p*-nitrofenol liberados por hora a 50°C y pH: 6,0; empleando como sustrato *p*-nitrofenilfosfato.

La actividad de la proteína fitasa es identificada con tres números; EC 3.1.3.8, EC.3.1.3.26 y EC.3.1.3.72. Dichos números han sido asignados por la *Enzyme Commission number* de acuerdo a las reacciones químicas que catalizan
10 (*IUBMB Enzyme Nomenclature, CAS Registry Number 9001-42-7*). La enzima con actividad EC 3.1.3.8 se denomina, pero sin limitarse, fitasa, fitato 3-fosfatasa, *mio*-inositol-hexafosfato 3-fosfohidrolasa ó 3-fitasa. La enzima con actividad EC.3.1.3.26 se denomina, pero sin limitarse, fitasa, fitato 6-fosfatasa, *mio*-inositol-hexafosfato 6-fosfohidrolasa ó 6-fitasa. La enzima con actividad
15 EC.3.1.3.72 se denomina, pero sin limitarse, fitasa o 5-fitasa.

En la presente invención, el término "proteína" o "enzima" se puede usar como equivalente al término "secuencia aminoacídica" teniendo en consideración que la proteína es la secuencia aminoacídica plegada, es decir, con estructura
20 terciaria. A su vez, el término "secuencia aminoacídica" es sinónimo del término "secuencia polipeptídica".

En este punto cabe argumentar que actualmente no existen métodos fiables capaces de predecir la estructura terciaria de una proteína a partir de su
25 secuencia aminoacídica. Se dispone de métodos capaces de predecir aspectos más sencillos de su estructura, a partir de los cuales se puede derivar cierta información sobre su posible función. La estructura terciaria de una proteína parece estar determinada fundamentalmente por la especificidad de su secuencia aminoacídica. Sin embargo, la falta de precisión en la determinación
30 de los parámetros básicos de los que se derivaría la estructura terciaria hace que los métodos de predicción más fiables sean aquellos basados en el conocimiento, combinación de métodos estadísticos y empíricos. A pesar de

esto, no es posible predecir de forma fiable la estructura terciaria de la proteína fitasa de la presente invención y con ello su actividad enzimática, a partir de secuencia aminoacídica. Por ello, la eliminación de un fragmento de la proteína podría dar lugar a una proteína cuya actividad enzimática se vería disminuida respecto de la proteína original (nativa). Sin embargo, la secuencia aminoacídica aislada, troncada respecto de la secuencia aminoacídica original, no presenta la pérdida de actividad fitasa, derivándose de ello la no obviedad de dicha secuencia troncada.

10 Una realización preferida de la invención se refiere al polinucleótido aislado que consiste en una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica de *Bifidobacterium* que tiene al menos un 55% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 en toda su longitud, donde además dicha secuencia aminoacídica tiene unida a su extremo amino-terminal una secuencia que codifica para un péptido señal. Preferiblemente el péptido señal procede de una secuencia que tiene su origen en la secuencia original de la que procede el polinucleótido aislado de la invención.

El péptido señal tiene una secuencia de aminoácidos que conduce a la proteína que la contiene a una determinada localización en la célula. De acuerdo con el sistema Sec de transporte, las proteínas, cuando todavía están en el citoplasma (pre-proteína) están dotadas de una secuencia, llamada péptido señal, en el extremo N-terminal. El péptido señal de la pre-proteína entra a través del canal Sec de la membrana celular citoplasmática), con lo que el péptido señal aparece por el lado exterior de la membrana. De esta forma, el péptido es escindido de la secuencia de la pre-proteína por medio de la acción de una peptidasa, lo que produce la liberación al exterior de proteína madura. La proteína madura puede estar anclada a su vez a la membrana citoplasmática, como es el caso de la proteína original o nativa de la presente invención.

Por tanto, la secuencia aminoacídica de la presente invención puede tener unida a su extremo amino-terminal una secuencia que codifica para un péptido señal y de esta forma la proteína es liberada al exterior de la célula, facilitando con ello la purificación de la proteína ya que no sería necesaria la lisis de las células hospedadoras para su liberación.

Otra realización preferida se refiere al polinucleótido aislado, donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 1, de *B. pseudocatenulatum* ATCC27919. Dicha secuencia aminoacídica carece de la secuencia que codifica para la hélice transmembrana, delimitada por el aminoácido 613 y 639, incluidos ambos, de la secuencia original SEQ ID NO: 2, y además, dicha secuencia aminoacídica es una proteína cuya actividad mayoritaria es fitasa. La secuencia SEQ ID NO: 2 es la secuencia aminoacídica completa (no truncada) de la enzima fitasa de *B. pseudocatenulatum* ATCC27919 (Nº de acceso ZP_03743199). Una realización más preferida de la invención se refiere al polinucleótido aislado, donde dicha secuencia aminoacídica tiene unida a su extremo amino-terminal la secuencia del péptido señal SEQ ID NO: 5. Esta secuencia SEQ ID NO: 5 está delimitada por el aminoácido 1 y el 52, incluidos ambos, de la secuencia original SEQ ID NO: 2.

Otra realización preferida se refiere al polinucleótido aislado, donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 3, de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC15697. Dicha secuencia aminoacídica carece de la secuencia que codifica para la hélice transmembrana, delimitada por el aminoácido 600 y 623, incluidos ambos, de la secuencia original SEQ ID NO: 4, y además, dicha secuencia aminoacídica es una proteína cuya actividad mayoritaria es fitasa. Una realización más preferida de la invención se refiere al polinucleótido aislado, donde dicha secuencia aminoacídica tiene unida a su extremo amino-terminal la secuencia del péptido señal SEQ ID NO: 6. Esta secuencia SEQ ID NO: 6 está delimitada por el aminoácido 1 y el 32, incluidos ambos, de la secuencia original SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO: 3 corresponde a la secuencia aminoacídica truncada de la proteína fitasa de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC15697. Dicha secuencia carece tanto de la secuencia aminoacídica que codifica para el péptido señal del extremo amino-terminal como de la secuencia que codifica para la hélice transmembrana del extremo carboxi-terminal. La secuencia SEQ ID NO: 4 es la
5 secuencia aminoacídica completa (no truncada u original) de la enzima fitasa de *B. pseudocatenulatum* ATCC27919 (Nº de acceso YP_002321769.1).

En adelante, para hacer referencia a cualquier polinucleótido descrito en el
10 aspecto anterior o en sus realizaciones preferidas se puede usar el término "polinucleótido de la invención" o "polinucleótido de la presente invención".

Otros aspectos de la presente invención son: El producto de expresión del polinucleótido de la invención; la secuencia aminoacídica aislada codificada por el polinucleótido de la invención; el producto de expresión anterior encapsulado
15 o la secuencia aminoacídica anterior encapsulada; o el vector que comprende el polinucleótido de la invención.

El término "producto de la expresión del polinucleótido" tal como se entiende en
20 la presente invención hace referencia a cualquier producto resultante de la expresión de la secuencia de nucleótidos. Así pues, como producto resultante de la expresión de la secuencia se entiende, por ejemplo, el ARN que se obtiene de la transcripción de la secuencia, el ARN procesado, la proteína resultante de la traducción del ARN en cualquiera de sus estados de
25 procesamiento o posteriores modificaciones de la secuencia nucleotídica en el interior de la célula siempre que la secuencia resultante tenga su origen en la secuencia original transferida o no pierda la característica funcional que la caracteriza, es decir, la actividad fitasa mayoritaria.

El término "vector" se refiere a un fragmento de ADN que tiene la capacidad de
30 replicarse en un determinado huésped y, como el término lo indica, puede servir de vehículo para multiplicar otro fragmento de ADN que haya sido

fusionado al mismo (inserto). Inserto se refiere a un fragmento de ADN que se fusiona al vector; en el caso de la presente invención, el vector puede comprender el polinucleótido de la invención. Los vectores pueden ser plásmidos, cósmidos, bacteriófagos o vectores virales, sin excluir otro tipo de
5 vectores que se correspondan con la definición realizada de vector. Preferiblemente el vector es un plásmido. Un ejemplo de plásmido es el de la serie pQE, tal como se muestra en los ejemplos de la presente invención.

El término "encapsulado/a" se refiere a que el producto de expresión del polinucleótido o secuencia aminoacídica codificada por el polinucleótido de la
10 invención (enzima), están recubiertos con materiales de distinta naturaleza para obtener partículas de tamaño micrométrico. El producto resultante del encapsulado se denomina micropartícula, microcápsula ó microesfera, sin excluir otros términos usados en el estado de la técnica. La aplicación industrial
15 del producto encapsulado es, por ejemplo, pero sin limitarse, conseguir una liberación sostenida o controlada del producto de expresión o de la enzima, conseguir proteger el producto de expresión o de la enzima protegerlos del pH, de la temperatura, de la degradación enzimática o de otros factores físicos que pudieran restar actividad en dicha enzima.

20 Los materiales de recubrimiento para llevar a cabo dicho microencapsulado se seleccionan de la lista que comprende: grasa (por ejemplo pero sin limitarse, cera ó alcohol estearílico), al menos una proteína (por ejemplo pero sin limitarse, gelatina o albúmina), al menos un polímero (natural; por ejemplo pero
25 sin limitarse, alginato, dextrano o quitosano / semisintético; por ejemplo pero sin limitarse, derivado de celulosa / sintético; por ejemplo pero sin limitarse, derivado acrílico o poliéster alifático), o cualquiera de sus combinaciones.

Los métodos para microencapsular son conocidos por un experto en la materia.
30 Por ejemplo, pero sin limitarse, se puede microencapsular mediante: extracción/evaporación del solvente, coacervación/separación de fases, atomización (*Spay drying*), gelificación iónica o polimerización interfacial. Otros

métodos pueden encontrarse en Gabrie M.H. Meesters (2010) (Capítulo 9, *Encapsulation of Enzymes and Peptides*, En: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Páginas 253-268).

- 5 Otro aspecto más de la presente invención es una célula aislada que comprende:
- El polinucleótido de la invención,
 - el producto de expresión del polinucleótido de la invención,
 - la secuencia aminoacídica aislada codificada por el polinucleótido de la
- 10 invención,
- el producto de expresión anterior encapsulado o la secuencia aminoacídica anterior encapsulada, o
 - el vector que comprende el polinucleótido de la invención.
- 15 El término "célula" tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una célula procariótica o eucariótica. Una realización más preferida de la presente invención se refiere a la célula descrita en el párrafo anterior, donde dicha célula es procariota. Según una realización más preferida la célula procariota es de una especie diferente de *B. pseudocatenulatum* y *B. longum*
- 20 subsp. *infantis*. La especie diferente de célula procariota puede ser *E. coli*. Los inventores demuestran que, a pesar de que la secuencia nucleotídica es rica en nucleótidos G y C, se expresa eficazmente en *E. coli*, lo cual es un resultado no esperado.
- 25 La célula transformada con un vector que comprende el polinucleótido de la invención, puede incorporar la secuencia en alguno de los ADN de la célula; nuclear, mitocondrial y/o cloroplástico, o permanecer como parte de un vector que posee su propia maquinaria para autoreplicarse. La selección de la célula que ha incorporado cualquiera de las secuencias de la invención se lleva a
- 30 cabo por medio de cualquier método conocido en el estado de la técnica, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante auxotrofías o mediante la expresión de cualquier marcador de selección.

En adelante, para hacer referencia a cualquier célula descrita en los párrafos anteriores se puede usar el término "célula de la invención" o "célula de la presente invención".

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a la población celular que comprende la célula de la invención. Dicha población celular puede estar formada por cualquier célula de la presente invención, por células de una sola cepa o línea celular, por combinación de células de la cepa de *B. pseudocatenulatum* ATCC27919 y *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 o por
10 combinación de cualquiera de ellas con otras células de cepas diferentes de la misma especie o línea celular del género *Bifidobacterium* o de otro género. Es decir, la población celular aislada puede ser un cocultivo de células de al menos una cepa ATCC27919 o ATCC15697 con células de cualquier otra cepa.

15 Un aspecto más de la presente invención se refiere al uso del polinucleótido de la invención, del producto de expresión del polinucleótido de la invención (o dicho producto de expresión encapsulado), de la secuencia aminoacídica aislada codificada por el polinucleótido de la invención (o dicha secuencia
20 aminoacídica encapsulada), del vector que comprende el polinucleótido de la invención, de la célula de la invención o de la población celular de la invención, para reducir el contenido de hexafosfato de *mio*-inositol ($InsP_6$) de un alimento. Según una realización preferida, el alimento es esencialmente vegetal. Según otra realización más preferida, el alimento vegetal comprende cualquier parte
25 de la semilla de dicho vegetal, en cualquier estado de procesamiento. La semilla puede proceder de cualquier vegetal como por ejemplo, pero sin limitarse, de una planta leguminosa, de una planta gramínea o de pseudocereales (por ejemplo, pero sin limitarse, amaranto, quinoa). Según una realización aún más preferida, las semillas proceden de al menos una planta
30 leguminosa. Según otra realización aún más preferida, las semillas proceden de al menos una planta gramínea. Según otra realización preferida, el alimento

está destinado a la alimentación de animales monogástricos. Según una realización más preferida el alimento es un pienso.

El hexafosfato de *mio*-inositol (InsP_6) es el ácido fítico. El *mio*-inositol
5 hexafosfato, hexafosfato de *mio*-inositol, hexakisfosfato de *mio*-inositol o hexafosfoinositol se puede abreviar como InsP_6 o IP_6 . La sal del ácido fítico es el fitato. En la presente invención se puede usar el término "fitato" para hacer referencia al InsP_6 o a cualquiera de sus sales. Generalmente el fósforo en forma de fitato no está disponible para los animales monogástricos, es decir, no
10 rumiantes, ya que no disponen de la enzima digestiva fitasa, que es necesaria para separar el fósforo de la molécula de fitato. Sin embargo los animales rumiantes pueden asimilar el fósforo del fitato ya que disponen de microorganismos intestinales que producen fitasa.

15 El término "esencialmente vegetal" tal como se entiende en la presente invención se refiere a que el alimento vegetal tiene compuestos alimenticios cuyo origen no es vegetal pero más del 50% de los compuestos alimenticios que integran dicho alimento tienen origen vegetal.

20 La planta gramínea de la que se usan las semillas es una planta de la subfamilia *Pooideae*, dicha planta se selecciona de la lista que comprende una planta de Tribu *Aveneae*, preferiblemente, pero sin limitarse, del género *Avena*, más preferiblemente la especie *Avena sativa* (avena); de la Tribu *Triticeae*, preferiblemente, pero sin limitarse, del género *Hordeum* (más preferiblemente
25 la especie *Hordeum vulgare* [cebada]), *Secale* (más preferiblemente la especie *Secale cereale* [centeno]) o *Triticum* (más preferiblemente la especie *Triticum aestivum*); de la Tribu *Oryzeae*, preferiblemente, pero sin limitarse, del género *Oryza*, más preferiblemente la especie *Oryza sativa* (arroz); o de la Tribu *Andropogoneae*, preferiblemente, pero sin limitarse, del género *Shorgum* o del
30 género *Zea*, más preferiblemente la especie *Zea mays* (maíz).

La planta gramínea de la que se usan las semillas es una planta de la subfamilia *Faboideae*, *Caesalpinioideae* o *Mimosoideae*. Preferiblemente la planta de la subfamilia *Faboideae* se selecciona del género de la lista que comprende *Pisum*, *Phaseolus*, *Vicia*, *Cicer*, *Medicago* o *Glycine*.

5

Un aspecto más de la presente invención se refiere al uso del polinucleótido de la invención, del producto de expresión del polinucleótido de la invención (o dicho producto de expresión encapsulado), de la secuencia aminoacídica aislada codificada por el polinucleótido de la invención (o dicha secuencia aminoacídica encapsulada), del vector que comprende el polinucleótido de la invención, de la célula de la invención o de la población celular de la invención, para producir trifosfato de *mio*-inositol (InsP_3). El trifosfato de *mio*-inositol, *mio*-inositol trifosfato o trifosfoinositol se puede abreviar como InsP_3 o IP_3 . El InsP_3 tiene una importante aplicación en salud dado que los trifosfatos de *mio*-inositol están implicados en numerosas funciones biológicas en el organismo, como por ejemplo en la desintoxicación de metales pesados (ES 2054628).

10
15

Otro aspecto de la presente invención se refiere al método para la producción del polinucleótido de la invención, que comprende:

- 20 a. amplificar mediante una técnica de PCR el fragmento de la secuencia nucleotídica que tiene al menos un 55% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, en toda su longitud, usando como molde un ADN cromosómico de *Bifidobacterium*,
- b. clonar dicho fragmento en un vector de expresión, y
- 25 c. transformar dicho vector en una célula huésped para su replicación.

La técnica de PCR del paso (a) del método se selecciona de las técnicas de PCR del estado de la técnica conocidas por el experto en la materia. La amplificación del fragmento de la secuencia nucleotídica se lleva a cabo mediante el uso de al menos dos cebadores donde uno de ellos se unirá a la hebra molde (cebador directo) y el otro a la hebra complementaria (cebador reverso), en una posición que permita obtener, mediante sucesivas

30

amplificaciones con una enzima ARN/ADN polimerasa termorresistente, el fragmento que codifica para la fitasa de la presente invención, tal como se indica en el paso (a).

- 5 El vector de expresión contiene las secuencias necesarias para la replicación y expresión de la secuencia nucleotídica que codifica para la fitasa de la presente invención en la célula huésped del paso (b) del método. Dicha célula huésped puede ser una célula procariota, por ejemplo, pero sin limitarse al menos una célula de *Escherichia. coli*.

10

Una realización preferida de la presente invención se refiere al método, donde la amplificación del paso (a) se lleva cabo mediante el cebador directo SEQ ID NO: 7 y el cebador reverso SEQ ID NO: 8, y el molde es ADN es cromosómico de *B. pseudocatenuatum* ATCC27919. Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método donde la amplificación del paso (a) se lleva cabo mediante el cebador directo SEQ ID NO: 9 y el cebador reverso SEQ ID NO: 10, y el molde es ADN es cromosómico de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC15697.

15

- 20 Otro aspecto de la presente invención se refiere al método para reducir el contenido de fitatos de un alimento, que comprende:

- a. poner en contacto el alimento con la secuencia aminoacídica aislada codificada por el polinucleótido de la invención (o con dicha secuencia aminoacídica encapsulada), con la célula de la invención, o con la población celular que comprende dicha célula de la invención, e
- 25 b. incubar la mezcla obtenida en el paso (a) a un pH de entre 3,5 y 7,5.

Las condiciones de incubación de la mezcla, según el paso (b), se seleccionan de acuerdo con los resultados mostrados en las figuras 1A y B.

30

Un aspecto más de la presente invención se refiere al método para producir InsP_3 , que comprende:

- a. poner en contacto una composición que comprende ácido fítico o al menos una sal de fitato con la secuencia aminoacídica aislada codificada por el polinucleótido de la invención, con la célula de la invención, o con la población celular que comprende dicha célula de la invención,
- 5 b. incubar la mezcla obtenida en el paso (a) a un pH de entre 3,5 y 7,5.

Es conocido que la adición de fitasas de origen fúngico disminuye el contenido de fitatos en productos de panadería durante la etapa de amasado, fermentación y primera etapa del horneado (Haros *et al.*, 2001. *Eur Food Res Technol.*, 213: 317-322; Haros *et al.*, 2001. *J Agr Food Chem*, 49: 5450-5454; 10 Sanz Penella *et al.*, 2008. *J Cereal Sci*, 48: 715-721). Durante la etapa de amasado (7 minutos) y reposo de la masa a 24°C (10 minutos) la inclusión de fitasa fúngica en la formulación de pan integral provocó una disminución de entre 17,3% y 51,9% del fitato inicial en la harina, dependiendo de la dosis 15 adicionada (Haros *et al.*, 2001. *J Agr Food Chem*, 49: 5450-5454). Türk y Sandberg (1992. *J Cereal Sci*, 15: 281-294) observaron que la inclusión de ingredientes como leche en la formulación de pan integral podría retrasar significativamente el efecto de la fitasa fúngica comercial para hidrolizar a los fitatos. Pan integral elaborado con masas precocidas adicionadas con fitasa 20 fúngica comercial conservadas en congelación por largos períodos de tiempo (3 meses) disminuyen significativamente el contenido de fitatos durante el proceso de congelación, almacenamiento, descongelación y cocción completa (Rosell *et al.*, 2009. *J Cereal Sci*, 50: 272-277).

25 Por tanto, la reducción del contenido de fitatos de un alimento o la degradación enzimática de los fitatos en los procesos de elaboración de alimentos depende de numerosos factores tales como el pH, temperatura del proceso, tiempo, contenido de agua, concentración de sales minerales, aditivos y el propio proceso (Türk y Sandberg, 1992. *J Cereal Sci*, 15: 281-294). Así pues, la 30 incubación mencionada en el paso (b) del método para reducir el contenido de fitatos de un alimento o para producir InsP_3 se lleva a cabo a un pH que se selecciona de un intervalo de entre 3,5 y 7,5, preferiblemente el pH se

selecciona de un intervalo de entre 3,75 y 7,25; de entre 4 y 7; de entre 4,25 y 7,75; de entre 4,5 y 7; de entre 4,75 y 6,75; o de entre 5,5 y 6,5. La temperatura a la que se llevan a cabo los procesos dependerá del tipo de alimento que se pretenda tratar así como del tipo de material con el que se microencapsula la enzima. Por tanto el método puede llevarse a cabo a temperaturas muy diferentes como por ejemplo aproximadamente a 4 °C, aproximadamente a 60 °C o a una temperatura que se selecciona de entre 24 °C y 60 °C, preferiblemente de entre 27 °C y 57 °C, de entre 30 °C y 55 °C ó de entre 35 °C y 50 °C. El tiempo dependerá del resto de parámetros o incluso de los alimentos que deban tratarse.

La sal de fitato del paso (a) se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, sal de magnesio o sal cálcico-magnésica.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al método para reducir el contenido de fitatos de un alimento o al método para producir InsP_3 , donde la incubación del paso (b) se lleva a cabo a un pH de entre 5,5 y 6,5.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método para reducir el contenido de fitatos de un alimento o al método para producir InsP_3 , donde la composición del paso (a) además comprende calcio o al menos una sal de calcio, en el caso de emplear la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3 de *B. longum* subsp. *infantis*, la célula de la invención que la comprende, o la población celular que comprende dicha célula.

La sal de calcio se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, carbonato de calcio, fosfato de calcio, gluconato de calcio, cloruro de calcio, pidolato de calcio, lactogluconato de calcio o docusato de calcio.

Según una realización más preferida, la sal de calcio es cloruro de calcio. Tal como se observa en la Tabla 7, el uso de cloruro de calcio aumenta la actividad

B. Muestra la cinética de la hidrólisis de fitatos y la generación de fosfatos de *mio*-inositol de menor grado de fosforilación por la fitasa purificada de *B. longum* Subsp. *infantis*.

5 **FIG. 3. Muestra el perfil proteico obtenido por cromatografía de intercambio iónico** (eje de las abcisas tiempo en minutos; eje de las ordenadas en mAU, miniunidades de absorbancia a 280 nm).

Fase móvil tampón Tris-HCl 20 mM a pH 7,2.

10 Gradiente de elución 200-300 mM de NaCl a 1 mL/min.

Detector UV/Visible

FIG. 4. Muestra el perfil proteico del extracto crudo obtenido por cromatografía de intercambio iónico en las condiciones mostradas a continuación (eje de las abcisas tiempo en minutos; eje de las ordenadas en mAU, miniunidades de absorbancia a 280 nm):

Fase móvil tampón Tris-HCl 20 mM a pH 7,2.

Gradiente de elución 0-250 mM de NaCl a 1 mL/min.

20 Detector UV/Visible

FIG. 5. Muestra el perfil proteico obtenido por cromatografía de intercambio iónico en las condiciones mostradas a continuación (eje de las abcisas tiempo en minutos; eje de las ordenadas en mAU, miniunidades de absorbancia a 280 nm):

Fase móvil tampón Tris-HCl 20 mM a pH 7,5

Gradiente de elución 0,1 M de NaCl a 1 mL/min.

Detector UV/Visible

30

FIG. 6. Muestra el perfil proteico obtenido por cromatografía de intercambio iónico-FPLC en las condiciones mostradas a continuación

(eje de las abcisas tiempo en minutos; eje de las ordenadas en mAU, miniunidades de absorbancia a 280 nm):

Fase móvil tampón Tris-HCl 25 mM a pH 7,5.

5 Gradiente de elución 0-500 mM de NaCl a 6 mL/min.

Detector UV/Visible

FIG. 7. Muestra el perfil proteico obtenido por cromatografía de intercambio iónico-FPLC en las condiciones mostradas a continuación

10 (eje de las abcisas tiempo en minutos; eje de las ordenadas en mAU, miniunidades de absorbancia a 280 nm):

Fase móvil tampón Tris-HCl 25 mM a pH 7,5.

Gradiente de elución 0-250 mM de NaCl a 1 mL/min.

15 Detector UV/Visible

FIG. 8. Muestra geles SDS-PAGE con la expresión de las fitasas de *B. pseudocatenulatum* y *B. longum* Subsp. *infantis* en *E. coli*.

20 Completa: Fitasa de longitud completa

Truncada: fitasa que carece del fragmento C-terminal

soluble: Fracción soluble.

insoluble: Fracción insoluble.

Las flechas indican la presencia de fitasa en la fracción soluble

25

FIG. 9. Muestra geles SDS-PAGE con la expresión de la fitasa de *B. longum* subsp. *infantis* en *E. coli* utilizando diferentes concentraciones de inductor (IPTG)

30 Completa: Fitasa de longitud completa

Truncada: Fitasa que carece del fragmento C-terminal

Soluble: Fracción soluble.

Insoluble: Fracción insoluble.

La flecha indica la presencia de fitasa en la fracción soluble

EJEMPLOS

5

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores. Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos no pretenden limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1. Purificación y caracterización de las propiedades bioquímicas de la fitasa de las cepas seleccionadas *B. longum* Subsp. *infantis* y *B. pseudocatenulatum* como productoras de la enzima.

Las cepas de bifidobacterias empleadas en este estudio fueron proporcionadas por la ATCC: *B. pseudocatenulatum* ATCC27919 (Scardovi *et al.*, 1979. *International Journal Systematic Bacteriology*, 29: 291-311) y *B. longum* subsp. *infantis* ATCC15697 (Reuter, 1971. *International Journal Systematic Bacteriology*, 21: 273-275), las cuales fueron originalmente aisladas de intestino humano.

En un primer ensayo sobre el análisis de la actividad fitasa en *B. longum* Subsp. *infantis* y *B. pseudocatenulatum* se observó que en ambas cepas tal actividad estaba asociada a la célula, de manera que se desechó la idea de utilizar el sobrenadante del medio de cultivo para su purificación. Se desarrolló un método eficiente para la interrupción de las células, con el fin de obtener la enzima en solución para poder comenzar con los pasos de purificación.

30

1.1. Localización de la actividad fitasa.

Utilizando dicho método de disrupción de las células se procedió a determinar la localización de la actividad enzimática en *B. longum* Subsp. *infantis* y *B. pseudocatenulatum*. Además de determinar la actividad fitasa, también se determinó actividad fosfatasa, en el sobrenadante (extracto citoplasmático) y en el *pellet* (pared celular). Los valores de actividad se presentan en la Tabla 2. En dicha tabla se observa que la actividad fitasa se encuentra tanto en el sobrenadante (compuesto por extracto citoplasmático y membranas) como en el *pellet* (correspondiente a la pared celular). Sin embargo, la actividad fitasa del sobrenadante fue más específica en ambas especies.

Tabla 2. Localización de la actividad fitasa y fosfatasa en cepas de bifidobacterias^a

<i>Cepa</i>	<i>Localización</i>	<i>Actividad Fitasa</i> U_{fit}/ml	<i>Actividad Fosfatasa</i> U_{fos}/ml
<i>B. longum</i> Subsp. <i>infantis</i>	Citoplasma+ membranas	0,224±0,007	0,089±0,025
	Pared	0,115±0,054	0,241±0,129
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Citoplasma+ membranas	0,167±0,076	0,020±0,012
	Pared	0,302±0,237	0,388±0,068

^aPromedio±Desviación Estándar (n=2)

15 ^b U_{fit} : μ moles Pi /h a 50°C a pH: 6,0

^c U_{tot} : μ moles p-nitrofenol/h a 50°C a pH: 6,0

1.2. Purificación de las fitasas de *B. longum* Subsp. *infantis* y de *B. pseudocatenulatum*.

Se decidió comenzar con la purificación de la fitasa de *B. longum* Subsp. *infantis*. Para ello se preparó un litro de cultivo de la cepa de esta especie y se empleó el método de disrupción desarrollado para la preparación del extracto citoplasmático.

- 5 Para comenzar con la puesta a punto del método de purificación se decidió emplear cromatografía de intercambio iónico (columna TSK gel DEAE-5PW), empleando como fase móvil tampón Tris-HCl 20 mM a pH 7,2, un gradiente de elución desde 200 a 300 mM de NaCl a un flujo de 1 mL/min, recogándose 25 fracciones de 1 mL cada una, con detector UV/Visible, condiciones previamente
- 10 utilizadas en purificación de fosfatasa ácida de *Lactobacillus pentosus* (Palacios *et al.*, 2005. *J Appl Microbiol*, 98: 229-237). El cromatograma resultante se muestra en la FIG. 3. El gradiente empleado no mostró una resolución de picos satisfactoria, dado que no se obtuvo separación de las proteínas del extracto crudo. Se realizó una segunda prueba modificando el gradiente de NaCl desde una concentración
- 15 de 0 a 250 mM. La separación proteica mejoró sustancialmente, tal como se muestra en la FIG. 4. La línea vertical divide el cromatograma en dos zonas, la zona de la izquierda (hasta el minuto 19) indica las proteínas que no se adhieren a la columna, mientras que la zona de la derecha corresponde a la zona de elución con NaCl, por lo tanto las que se adhieren a la columna. Se midió la actividad fitasa
- 20 en todas las fracciones recogidas, encontrándose ésta en la fracción correspondiente al primer pico del cromatograma (FIG. 4). La actividad fosfatasa se encontró en las primeras 17 fracciones. En ensayos previos, se confirmó que la actividad fosfatasa no se encuentra en fracciones posteriores. En la Tabla 3 se muestran los datos de actividad fitasa y fosfatasa en las distintas fracciones del
- 25 cromatograma de la FIG. 4.

Tabla 3. Actividad fitasa y fosfatasa en las fracciones eluidas.

Fracción	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
U_{fit}/ml	0,007	0,307	0,579	0,161	0,024	0,010	0,000	0,006	0,010	0,000
U_{fos}/ml	0,00	0,609	1,175	0,484	0,220	0,075	0,020	0,000	0,000	0,000

Fracción	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
U_{fit}/ml	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
U_{fos}/ml	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n.d.	n.d.	n.d.

Fracción	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
U_{fit}/ml	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
U_{fos}/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Fracción	31	32	33	34	35	36	37	38
U_{fit}/ml	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
U_{fos}/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

U_{fit}: μ moles Pi /h a 50°C a pH: 6,0

U_{fos}: μ moles p-nitrofenol/h a 50°C a pH: 6,0

n.d. no determinado

5 Las fracciones en las que se encontró actividad se reunieron y se volvió a analizar por HPLC acoplado a la columna de filtración en gel (TSKgel G3000 PWXL). Como fase móvil se empleó solución 20 mM Tris-HCl a pH 7,5 conteniendo 0,1 M de NaCl. En el cromatograma se observa que la resolución de los picos mejoró (FIG. 5).

10

Para progresar en la separación cromatográfica se decidió emplear otra columna de intercambio aniónico (Columna Resource Q), acoplada a FPLC (*Fast protein liquid chromatography*) (AKTA Purifier, GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Para trabajar con esta nueva columna se diseñó un nuevo método de separación siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó como fase móvil 25 mM Tris-HCl a pH 7,5, con gradiente de NaCl de 0 a 500 mM en 60 mL, a un flujo de 6 mL/min (FIG. 6). Nuevamente se obtuvo un pico que corresponde a la fracción de proteína que no se adhería a la columna (Fracción N°2) y posteriormente otro pico que correspondía a la fracción que se adhería a la columna. Se observó que no existía buena resolución de picos, de manera que se decidió cambiar las condiciones operativas. Se empleó la misma fase móvil, reduciendo el gradiente de

15

20

NaCl a un intervalo entre 0 y 250 mM, a un flujo de 1 mL/minuto (FIG. 7). Se midió actividad fitasa y actividad fosfatasa en las distintas fracciones eluidas, observándose un pico de actividad nuevamente en la fracción que no se adhirió a la columna (Tabla 4).

5

Tabla 4. Actividad fitasa y fosfatasa de las distintas fracciones eluidas del cromatógrafo.

Fracción	Actividad Fitasa	Actividad Fosfatasa
	U_{fit}/mL	U_{tot}/mL
6	0,269	0,137
7	0,589	0,307
8	0,615	0,321
9	0,420	0,190
10	0,072	0,037
11	0,009	0,005
52	0,004	0,006
53	0,090	0,070
54	0,147	0,093
55	0,004	0,010
56	0,002	0,008
57	0,004	0,008
58	0,002	0,000
59	0,004	0,000
60	0,000	0,000

U_{fit} : μ moles Pi /h a 50°C a pH: 6,0

U_{tot} : μ moles p-nitrofenol/h a 50°C a pH: 6,0

10

Este resultado junto al hecho que la fracción que no se adhería a la columna presentaba un aspecto turbio, llevó a la conclusión de la posibilidad de la existencia de restos de membrana en el sobrenadante y que la actividad fitasa se encontrara en las membranas y no en el extracto citoplasmático. De manera que se decidió ultracentrifugar (100000 g durante 1 hora, rotor 70TI - Beckman) el sobrenadante

15

obtenido tras la disrupción celular, para separar eficientemente dicha turbidez y finalmente comprobar la hipótesis planteada. Una vez que se consiguió separar eficientemente el *pellet* del sobrenadante se midió actividad fitasa y fosfatasa en las tres fracciones celulares obtenidas: pared, membranas y extracto citoplasmático (Tabla 5).

Tabla 5. Actividades en las distintas fracciones.

Fracciones	Actividad Fitasa U/mL	Actividad Fosfatasa U/mL
Pared	6,58	8,76
Membrana	2,54	0,39
Citoplasma	0,02	0,23

U_{fit} : μ moles Pi /h a 50°C a pH: 6,0

10 U_{rot} : μ moles p-nitrofenol/h a 50°C a pH: 6,0

El resultado obtenido indicó que la actividad fitasa se encontraba en las fracciones celulares de pared celular y membrana, ya que no se encontró actividad ninguna en el sobrenadante libre de restos celulares. La fracción de membranas se resuspendió en tampón Tris-HCl 20 mM a pH 6,15 en presencia de 1% Tritón X100, con el fin de liberar y solubilizar la enzima. Sin embargo, la actividad fitasa no se recuperó en el sobrenadante tras el tratamiento. El experimento se repitió nuevamente desde el principio, resuspendiéndose la nueva fracción de membranas en tampón Tris-HCl 20 mM a pH 6,15 en presencia de 15% de glicerol, pero nuevamente la actividad fitasa no se recuperó en el sobrenadante con el nuevo tratamiento.

EJEMPLO 2. Clonación de las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3 y purificación de dichas fitasas, procedentes de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC15697 y *B. pseudocatenulatum* ATCC 27919.

2.1. Purificación de las fitasas codificadas por SEQ ID NO: 1 y SEQ IDNO: 3.

Tal como se ha mostrado en el ejemplo 1, la actividad fitasa mayoritaria se encontraba localizada en la membrana. Tras el análisis de las secuencias de los genomas de *B. longum* subsp. *infantis* y *B. pseudocatenulatum* en busca de proteínas con dominios fitasa o fosfatasa se identificaron los genes BLON_0263 y BIFPSEUDO_03792 que codificaban proteínas hipotéticas (YP_002321769 y ZP_03743199) con un dominio histidín-fosfatasa ácida. Se predijo la presencia de un péptido señal de secreción (aminoácidos 1 al 32 en YP_002321769 y aminoácidos 1 al 52 en ZP_03743199). A pesar de que la actividad fitasa determinada en células de *B. longum* subsp. *infantis* y *B. pseudocatenulatum* mostraba un perfil de actividad semejante a fitasas alcalinas (pH, acumulación de InsP_3 y alta especificidad) se decidió estudiar estas histidín-fosfatasas ácidas putativas ya que en el extremo carboxi-terminal de las proteínas fue identificada una secuencia que parecía cumplir con los requisitos de hidrofobicidad de un péptido de anclaje a membrana. La purificación de dichas fitasas supuso una dificultad en un primer momento debido, tal como fue demostrado por los autores de la presente invención, a que las proteínas parecían estar asociadas a la membrana celular. En intentos preliminares no se consiguió purificar adecuadamente la proteína. Se evaluó así la posibilidad de identificar fragmentos que pudieran interferir en la recuperación de dichas proteínas. Después de diversos análisis se determinó la posibilidad de que estas secuencias pudieran estar favoreciendo el anclaje de la proteína a la membrana celular (tal y como se había determinado empíricamente para la actividad fitasa presente en las células de *Bifidobacterium*) impidiendo de esta manera su liberación y como consecuencia su correcta purificación (ejemplo 2.3). Por tanto los cebadores mencionados en el ejemplo 2.2 se diseñaron para conseguir unas proteínas que careciesen de dicho péptido que probablemente era el causante de su adhesión a la membrana celular. En el ejemplo 2.3 se muestra que la eliminación de este péptido favorece la solubilidad y por tanto la purificación de las proteínas a partir de *E. coli*. La expresión de estas proteínas y su posterior caracterización llevó a la conclusión de

que los genes BLON_0263 y BIFPSEUDO_03792 codifican las fitasas de *B. longum* subsp. *infantis* y *B. pseudocatenulatum*, respectivamente (ejemplo 3).

2.2. Clonación de las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3.

5

Los genes de ambas fitasas fueron amplificados por PCR con los oligonucleótidos: PHY1 5' GCTAGATCTATGGAGGCTGACGGCCGG (SEQ ID NO: 9) y PHY2 5'-GACAAGCTTTCAGACCGAACTTCCGGTACGTGCC (SEQ ID NO: 10) (*B. longum* subsp. *infantis* ATCC15697) y PHY4 5'-GCTAGATCTGGGGAAGGAACCGCCCGG (SEQ ID NO: 7) y PHY5 5'-CACAAAGCTTTCACGTCACGTTTGAACCGGTTTTG (SEQ ID NO: 8) (*B. pseudocatenulatum* ATCC27919) y ADN cromosómico de ambas cepas, respectivamente, usando la polimerasa "Expand High Fidelity PCR System" (Roche) bajo las siguientes condiciones: 94°C 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C 1 minuto, hibridación 55°C 1 minuto y extensión a 72°C 2 minutos, seguido de una extensión final a 72°C 12 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en agarosa y aislados mediante el GFX PCR y *Gel Band Purification Kit* (GE healthcare). Los fragmentos se digirieron con los enzimas BglII y HindIII (sitios de restricción añadidos en los oligonucleótidos subrayados) y se clonaron en el vector pQE80 (Qiagen) digerido con BamHI e HindIII, dando lugar a los plásmidos pQEPHY1 (*B. longum* subsp. *infantis* ATCC15697) y pQEPHY2 (*B. pseudocatenulatum* ATCC27919). En estos plásmidos los enzimas fitasas se expresan en forma de una fusión amino-terminal con una cola de seis histidinas (6XHis) para facilitar su purificación. La construcción excluyó los péptidos señal de secreción (amino-terminal) y una secuencia que se estimó pertenecer a la hélice transmembrana carboxi-terminal presentes en las dos proteínas. Ambos plásmidos se transformaron en la cepa de *Escherichia coli* M15.

Las células de *E. coli* M15 transformadas se crecieron en 500 mL de LB con ampicilina 100 µg/ml a 37°C en agitación hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,6.

La expresión de las enzimas fitasa se indujo añadiendo IPTG hasta 0.1 mM y continuando la incubación durante 3-4 horas. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.4 y se resuspendieron en 5 ml del mismo tampón con 1mg/ml de lisozima, 0.5 mM de PMSF y 0,5 mM de DTT incubándose 30 minutos a 37°C.

Dichas células se rompieron mediante sonicación (5 pulsos de 20 segundos). Tras centrifugar a 15.000 rpm (rotor SS34, centrífuga Beckman) 30 minutos, los sobrenadantes se filtraron en filtros de 0.45 µm y se aplicaron a columnas de Ni-NTA (Qiagen) de 1 ml. Tras diversos lavados, las proteínas de fusión portando el tag 6X(His) se eluyeron en un tampón que contenía 300 mM de imidazol. Tras su análisis por SDS-PAGE, las fracciones conteniendo las fitasas se dializaron frente a tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.4, 1mM EDTA, 10% de glicerol y 50mM de NaCl y se purificaron por FPLC (Äktapurifier, GE Healthcare) en una columna de intercambio iónico (ResourceQ), eluyendo mediante un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1 M en tampón Tris-HCl 20 mM pH 6.0. Las fracciones con fitasa se recogieron y diversas alícuotas se conservaron a -80°C.

2.3. Solubilidad de las proteínas truncadas respecto de las proteínas originales (nativas).

La FIG. 8 muestra unos geles SDS-PAGE con la expresión de las fitasas de *B. pseudocatenulatum* y *B. longum* Subsp. *infantis* en *E. coli*. Se muestra la fracción de proteínas insolubles y solubles de clones que sobreexpresan la fitasa completa o con la delección de una putativa hélice transmembrana en el extremo carboxi-terminal. Como se observa, las fitasas se expresan muy eficazmente en *E. coli*, aunque la práctica totalidad de la proteína se encuentra en forma insoluble (cuerpos de inclusión o asociada a fragmentos de membrana). Sin embargo, la delección del fragmento carboxi-terminal da lugar a unas fitasas que muestran un porcentaje de proteína soluble (indicado por flechas negras). Fueron estas proteínas solubles las que se purificaron, caracterizándose su actividad fitasa. Los geles de la FIG. 8 muestran un experimento de inducción en *E. coli* utilizando 1mM

IPTG (plásmido pQE80) a 37°C. Posteriores ensayos con menor concentración de IPTG dieron lugar a un incremento en la porción de proteína soluble. A modo de ejemplo la FIG.9 muestra la inducción de la expresión y la solubilidad de la fitasa de *B. longum* subsp. *infantis* con diferentes concentraciones de IPTG en *E. coli*. Se observa que mientras la fitasa original (completa) es totalmente insoluble, la fitasa truncada se puede obtener en forma soluble (indicada por la flecha negra). El hecho de que las fitasas se expresen en gran cantidad en *E. coli* facilitaría diversas estrategias encaminadas, bien a obtener más porcentaje de proteína soluble o a desarrollar protocolos de desnaturalización (solubilización) y purificación de la proteína seguidos de una renaturalización.

EJEMPLO 3. Determinación de la actividad fitasa y de las condiciones óptimas de reacción.

3.1. Determinación de actividad fitasa.

La actividad fitasa se determinó mediante el método descrito por Haros et al. (2005. *FEMS Microbiology Letters*, 247: 231-239). La reacción consistió en 250 µL de acetato de sodio 0,1 M a pH 5,5, conteniendo fitato potásico 1,2 mM, y 50 µL de cada uno de los extractos eluidos de la columna cromatográfica. Tras incubar durante 15 minutos a 50 °C, la reacción fue detenida añadiendo 50 µL de ácido tricloroacético al 20% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania), se dejó reposar 10 minutos a 0 °C y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf AG, Hamburg, Alemania). En el sobrenadante se determinó el fósforo liberado por determinación espectrofotométrica del complejo de color amarillo que se forma cuando el orto-fosfato reacciona con el molibdovanadato de amonio en medio ácido, según el método descrito por Tanner y Barnett (1986. *J Assoc Off Anal Chem*, 69: 777-785) adaptado a escala micro en lector de microplacas (Spectromax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) según Haros et al (2001. *Eur Food Res Technol*, 213: 317-322). A 100 µL del sobrenadante se añadieron 100 µL de reactivo de molibdovanadato (Fluka Chemie

GmbH, Burchs, Suiza) diluido (1/5). Tras reposar 10 minutos a 30 °C se midió la absorbancia a 400 nm. Las muestras fueron analizadas por duplicado.

3.2. Determinación de las condiciones óptimas de reacción.

5

- Temperatura y pH óptimos de reacción, estabilidad de los preparados enzimáticos.

El efecto de la temperatura fue determinada en un intervalo desde 27°C hasta 80°C empleando el método estándar de determinación de actividad fitasa a pH 5,5 en tampón acético/acetato.

El efecto del pH sobre la actividad fitasa fue estudiado en un intervalo de pH entre 3,0 a 8,0 incubando a temperatura óptima de reacción (50°C) según el método estándar. Los tampones se emplearon a una concentración 100 mM y fueron los siguientes: citrato/NaOH, pH 3,0; acético/acetato pH 3,6-5,5; bis/tris pH 6,0-7,3; tris/HCl, pH 8,0.

La actividad de la fitasa purificada de *B. pseudocatenulatum* presentó un pH óptimo entre 5.5 y 6.5 (FIG. 1A), siendo la temperatura óptima de reacción de 50-55°C (FIG. 1B). La fitasa de *B. longum* subsp. *infantis* mostró máxima actividad al mismo pH (5.5) y temperatura 50°C (FIG. 1A y B, respectivamente). Las enzimas también fueron activas en un amplio intervalo de pH entre 4,5 y 7,5 para la fitasa de *B. pseudocatenulatum* y entre 4,5 y 6,5 para la fitasa de *B. longum* subsp. *infantis*, conservando el 50% o más de su actividad óptima (FIG. 1A).

Ambas enzimas fueron activas en un amplio intervalo de temperaturas siendo superior al 40% de la actividad máxima entre 30 y 55°C (*B. longum* subsp. *infantis*) y entre 30 y 60°C (*B. pseudocatenulatum*). Este intervalo incluye la temperatura fisiológica lo que podría ser importante tanto en alimentación humana como en alimentación animal (FIG. 1B).

- Determinación de la especificidad de sustrato.

Fue analizada la actividad relativa de las enzimas purificadas frente a distintos ésteres fosfatos a 1,2 mM. Se determinó por medida del fósforo liberado al cabo de la incubación en condiciones óptimas de reacción según la metodología descrita anteriormente. Las actividades enzimáticas se expresaron en forma relativa frente a la obtenida empleando fitato dipotásico como sustrato. Los diferentes sustratos estudiados fueron: fosfoenolpiruvato, fructosa-6-fosfato, glucosa-6-fosfato, desoxiAMP, glucosa-1-fosfato, gliceraldehído-3P, ATP, ADP, AP, fructosa 1,6-bisfosfato, paranitrofenilfosfato (pNPP).

Las enzimas aisladas de bifidobacterias mostraron tener una alta especificidad por el fitato, mientras que la actividad frente a una amplia variedad de sustratos monofosforilados es menor al 7% (relativo al fitato) y en la mayoría de los casos la actividad es nula (Tabla 6). La alta especificidad es una de las características deseadas de una fitasa comercial.

Tabla 6. Especificidad de sustrato de las fitasas de bifidobacterias de la presente invención.

20

Sustrato (1mM)	% actividad	
	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. longum subsp. infantis</i>
Fitato	100	100
pNPP	0.9	1
Fosfoenolpiruvato	0	0
acetil-fosfato	6.7	2.3
AMP	0	0.4
ADP	0	0
ATP	0	0
gliceraldehido-3P	0	0
glucosa-1P	0	0

glucosa-6P	0	0
fructosa-1P	0	0
fructosa-1,6bisP	4.9	1.45

- Determinación del efecto de posibles activadores e inhibidores.

El posible efecto activador o inhibidor sobre la actividad fitasa fue determinado por la adición de distintas sustancias químicas en la mezcla de reacción. Los posibles sustancias activadoras o inhibidoras de la actividad enzimática estudiadas fueron: cloruro de calcio (CaCl_2), cloruro de cobalto (CoCl_2), cloruro de manganeso (MnCl_2), ácido iodoacético (IAA), fluoruro de potasio (KF), beta-mercaptoetanol, etilendiaminotetra-acético (EDTA) y fluoruro de sulfonil-fenil-metilo (PMSF).

10

La actividad fitasa fue determinada según ensayo estándar de reacción en presencia de 5 mM de las sustancias químicas anteriormente mencionadas y expresadas en forma relativa a la actividad obtenida en ausencia de los posibles compuestos inhibidores o activadores.

15

El efecto de varios compuestos químicos en la actividad fitasa se muestra en la Tabla 7. La mayoría de los compuestos estudiados, con excepción del ácido yodoacético (IAA), presentaron efectos inhibitorios en la actividad enzimática. El mecanismo de inhibición enzimática del ácido yodoacético es por bloqueo de grupos sulfidrilos, mostrando en este estudio ningún efecto inhibitorio de las fitasas de bifidobacterias en la concentración ensayada.

20

El PMSF suele ser un inhibidor de enzimas, en este estudio inhibió en mayor medida la enzima de *B. longum* Subsp. *infantis*, mientras que la fitasa de *B. pseudocatenuatum* presentó una ligera inhibición.

25

Los metales divalentes actuaron inhibiendo a las fitasa con la excepción del calcio que actuó como activador de la actividad en la enzima de *B. infantis*. Los agentes quelantes como el EDTA también pueden ejercer su acción inhibidora de la

actividad por secuestro de metales del sitio activo de la enzima, lo cual podría ser lo que ocurre con las fitasas de bifidobacterias.

Tabla 7. Efecto inhibitor y activador de la actividad fitasa de bifidobacterias.

5

Activador o Inhibitor (5 mM)	% Actividad	
	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. longum subsp. infantis</i>
-	100	100
CaCl ₂	72	124
CoCl ₂	79.8	84
MnCl ₂	71	76
EDTA	85.3	69.2
PMSF	92.1	65.1
β-mercaptoethanol	61	64.1
IAA	100	99.9
KF	70.3	79.3

EJEMPLO 4. Determinación de fosfatos de *mio*-inositol por HPLC.

La purificación y determinación de los fosfatos de *mio*-inositol se realizó según la metodología descrita por Türk y Sandberg (1992. *J Cereal Sci*, 15: 281-294) y más tarde modificada por Sanz Penella *et al.* (2008. *J Cereal Sci*, 48: 715-721).

La enzima fue incubada en solución de acetato de sodio 0,1M a pH 5,5, a 50°C durante 3 horas en presencia de fitato de potasio como sustrato (InsP₆). A distintos intervalos de tiempo se extrajeron alícuotas de 250 µL para estudiar la cinética de degradación de InsP₆ y la generación de fosfatos de *mio*-inositol con menor grado de fosforilación. La reacción enzimática fue detenida por shock término durante 5 minutos a 100 °C.

La separación y cuantificación de los fosfatos de *mio*-inositol se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. La fase móvil consistió en metanol:ácido fórmico 0,05M (51:49), conteniendo 1,5% (v/v) de hidróxido de tetrabutilamonio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), ajustado a pH 4,3 con ácido sulfúrico 9M (Sigma, St Louis, MO). El análisis cromatográfico fue llevado a cabo con un cromatógrafo líquido HP1050 (Hewlett Packard, Waldbronn, Alemania), equipado con un detector de índice de refracción HP 1047A (Hewlett Packard, Waldbronn, Alemania). Las muestras (50 μ L) fueron inyectadas en el cromatógrafo para la separación y cuantificación de fosfatos de *mio*-inositol mediante una columna Tracer Excel 120 ODS-B (5 μ m x 15cm x 0,4cm; Teknokroma, Barcelona, España). Las condiciones cromatográficas fueron: flujo 1mL fase móvil/min y temperatura de la columna 35°C. Para la identificación de fosfatos de *mio*-inositol se utilizó un hidrolizado de ácido fítico en solución acuosa al 50% (p/v) (Sigma, St Louis, MO). Como solución estándar se utilizó fitato de potasio 5mM (Sigma, St Louis, MO). Las muestras fueron analizadas por duplicado.

En las FIG. 2A y B se muestra la cinética de desaparición de fitatos o hexakisfosfato de *mio*-inositol (InsP₆) y la generación de fosfatos de *mio*-inositol con menor grado de fosforilación con el tiempo de reacción. Se observa que la desaparición de InsP₆ se produjo inmediatamente en la primera media hora de reacción con la generación y desaparición inmediata del pentakisfosfato de *mio*-inositol (IP₅ o InsP₅). Paralelamente se generó el tetrakisfosfato de *mio*-inositol (IP₄ o InsP₄) el cual también es sustrato de la enzima y desapareció con el tiempo de reacción, siendo su desaparición más lenta con la fitasa de *B. longum subsp. infantis*. La hidrólisis de los InsP₆₋₄ dio lugar a la generación del trifosfato de *mio*-inositol (IP₃ o InsP₃), cuya concentración se incrementó con el tiempo de reacción permaneciendo en concentraciones elevadas después de 3 horas de incubación. Las enzimas de bifidobacterias parecen no actuar sobre el InsP₃ y acumularlo tras actuar sobre los fitatos. Esto podría tener una importante implicación en salud dado que los trifosfatos de *mio*-inositol están implicados en numerosas funciones biológicas en nuestro organismo, de hecho algunos de ellos encuentran su destino como fármacos.

REIVINDICACIONES

1. Polinucleótido aislado que consiste en una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica de *Bifidobacterium* que tiene al menos un 55% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, en toda su longitud, donde dicha secuencia aminoacídica es una proteína cuya actividad mayoritaria es fitasa.
5
2. Polinucleótido según la reivindicación 1, donde además dicha secuencia aminoacídica tiene unida a su extremo amino-terminal una secuencia que codifica para un péptido señal.
10
3. Polinucleótido según la reivindicación 1, donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 1, de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 y dicha secuencia aminoacídica:
15
 - a. carece de la secuencia que codifica para la hélice transmembrana, delimitada por el aminoácido 613 y 639, incluidos ambos, de la secuencia original SEQ ID NO: 2, y
 - b. dicha secuencia aminoacídica es una proteína con actividad fitasa.
20
4. Polinucleótido según la reivindicación 3, donde dicha secuencia aminoacídica tiene unida a su extremo amino-terminal la secuencia del péptido señal SEQ ID NO: 5.
25
5. Polinucleótido según la reivindicación 1, donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 3, de *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC15697 y dicha secuencia aminoacídica:
30
 - a. carece de la secuencia que codifica para la hélice transmembrana, delimitada por el aminoácido 600 y 623, incluidos ambos, de la secuencia original SEQ ID NO: 4, y

b. dicha secuencia aminoacídica es una proteína con actividad fitasa.

- 5 6. Polinucleótido según la reivindicación 5, donde dicha secuencia aminoacídica tiene unida a su extremo amino-terminal la secuencia del péptido señal SEQ ID NO: 6.
7. Producto de expresión del polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 10 8. Secuencia aminoacídica aislada codificada por el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 15 9. Producto de expresión según la reivindicación 7 o secuencia aminoacídica según la reivindicación 8, donde dicho producto de expresión o dicha secuencia aminoacídica están encapsuladas.
- 20 10. Vector que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 25 11. Célula que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el producto de expresión según la reivindicación 7 ó 9, la secuencia aminoacídica según la reivindicación 8 ó 9, o el vector según la reivindicación 10.
- 30 12. Célula según la reivindicación 11, donde dicha célula es procariota.
13. Célula según la reivindicación 12, donde la especie procariota es una especie diferente de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y *Bifidobacterium longum subsp. infantis*.

14. Población celular que comprende la célula según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.
- 5 15. Uso del polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, del producto de expresión según la reivindicación 7 ó 9, de la secuencia aminoacídica según la reivindicación 8 ó 9, del vector según la reivindicación 10, de la célula según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, o de la población celular según la reivindicación 14, para reducir el contenido de hexafosfato de *mio*-inositol (InsP_6) de un alimento.
- 10 16. Uso según la reivindicación 15, donde el alimento es esencialmente vegetal.
- 15 17. Uso según la reivindicación 16, donde el alimento vegetal comprende cualquier parte de la semilla de dicho vegetal, en cualquier estado de procesamiento.
- 20 18. Uso según la reivindicación 17, donde las semillas proceden de al menos una planta leguminosa.
- 25 19. Uso según la reivindicación 17, donde las semillas proceden de al menos una planta gramínea.
20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, donde el alimento está destinado a la alimentación de animales monogástricos.
21. Uso según la reivindicación 20, donde el alimento es un pienso.
- 30 22. Uso del polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, del producto de expresión según la reivindicación 7 ó 9, de la secuencia aminoacídica según la reivindicación 8 ó 9, del vector según la reivindicación 10, de la célula según cualquiera de las reivindicaciones

11 a 13, o de la población celular según la reivindicación 14, para producir trifosfato de *mio*-inositol (InsP_3).

5 23. Método para la producción del polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende:

- 10 a. amplificar mediante una técnica de PCR el fragmento de la secuencia nucleotídica que tiene al menos un 55% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, en toda su longitud, usando como molde un ADN cromosómico de *Bifidobacterium*,
- b. clonar dicho fragmento en un vector de expresión, y
- c. transformar dicho vector en una célula huésped para su replicación.

15 24. Método según la reivindicación 23, donde la amplificación del paso (a) se lleva cabo mediante el cebador directo SEQ ID NO: 7 y el cebador reverso SEQ ID NO: 8, y el molde es ADN es cromosómico de *Bifidobacterium pseudocatenulatum*.

20 25. Método según la reivindicación 24, donde la amplificación del paso (a) se lleva cabo mediante el cebador directo SEQ ID NO: 9 y el cebador reverso SEQ ID NO: 10, y el molde es ADN es cromosómico de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*.

25 26. Método para reducir el contenido de InsP_6 de un alimento que comprende:

- 30 a. poner en contacto el alimento con la secuencia aminoacídica según la reivindicación 8 ó 9, con la célula según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, o con la población celular según la reivindicación 14, e
- b. incubar la mezcla obtenida en el paso (a) a un pH de entre 3,5 y 7,5.

27. Método para producir InsP_3 que comprende:

- 5 a. poner en contacto una composición que comprende ácido fítico o al menos una sal de fitato con la secuencia aminoacídica según la reivindicación 8 ó 9, con la célula según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, o con la población celular según la reivindicación 14,
- b. incubar la mezcla obtenida en el paso (a) a un pH de entre 3,5 y 7,5.

10

28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 26 ó 27, donde la incubación del paso (b) se lleva a cabo a un pH de entre 5,5 y 6,5.

15 29. Método según cualquiera de las reivindicaciones 27 ó 28, donde la composición del paso (a) además comprende calcio o al menos una sal de calcio, en el caso de emplear la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3 de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, la célula según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 que la comprende, o la población celular según la reivindicación 14 que comprende dicha célula.

20

30. Método según la reivindicación 29, donde la sal de calcio es cloruro de calcio.

1/9

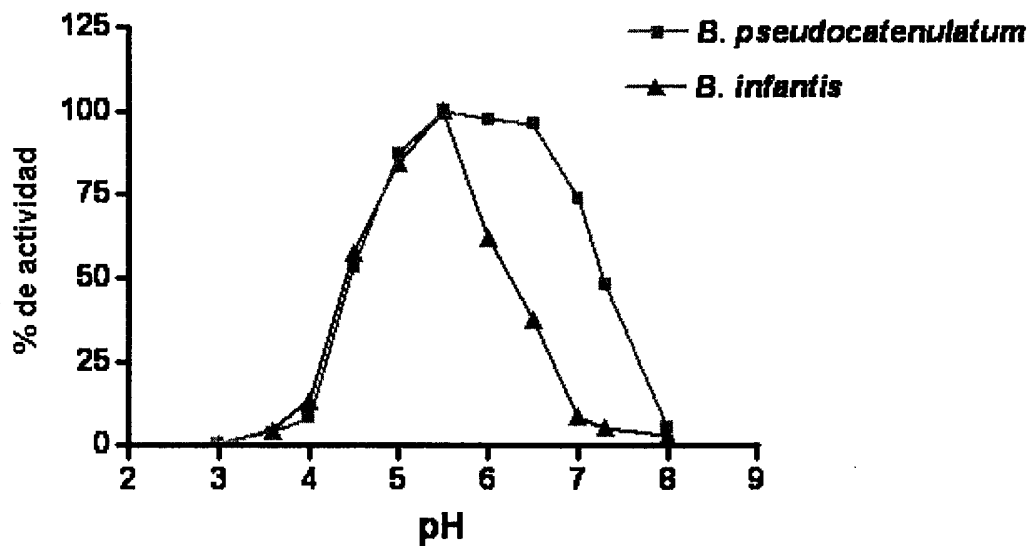


FIG. 1A

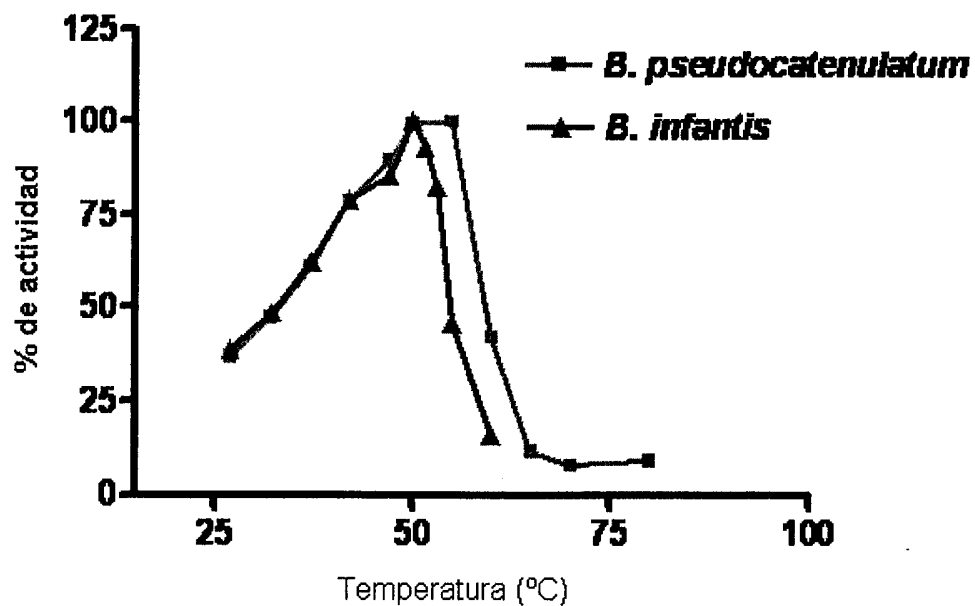


FIG. 1B

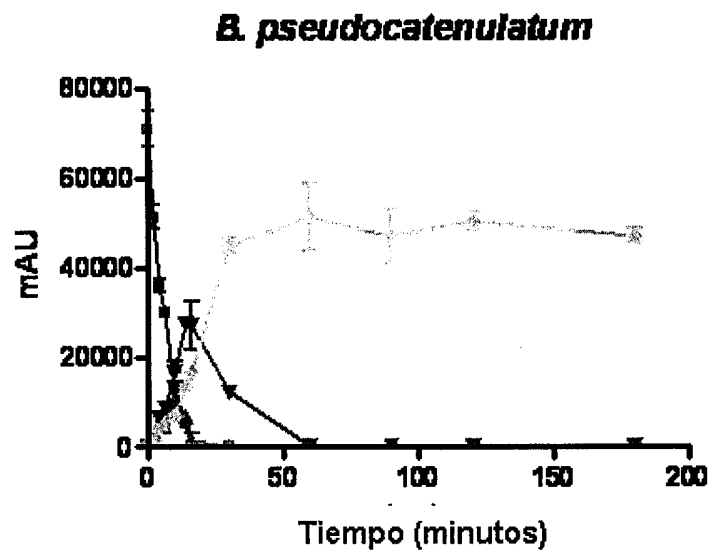


FIG. 2A

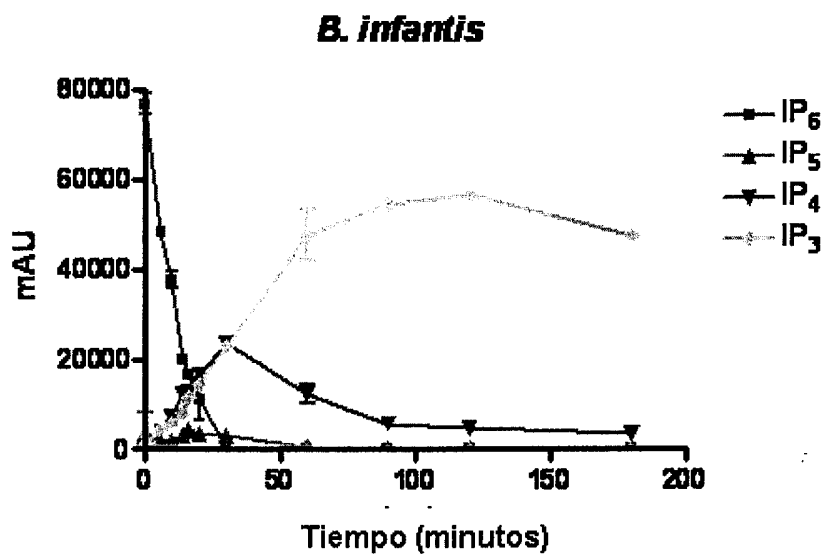


FIG. 2B

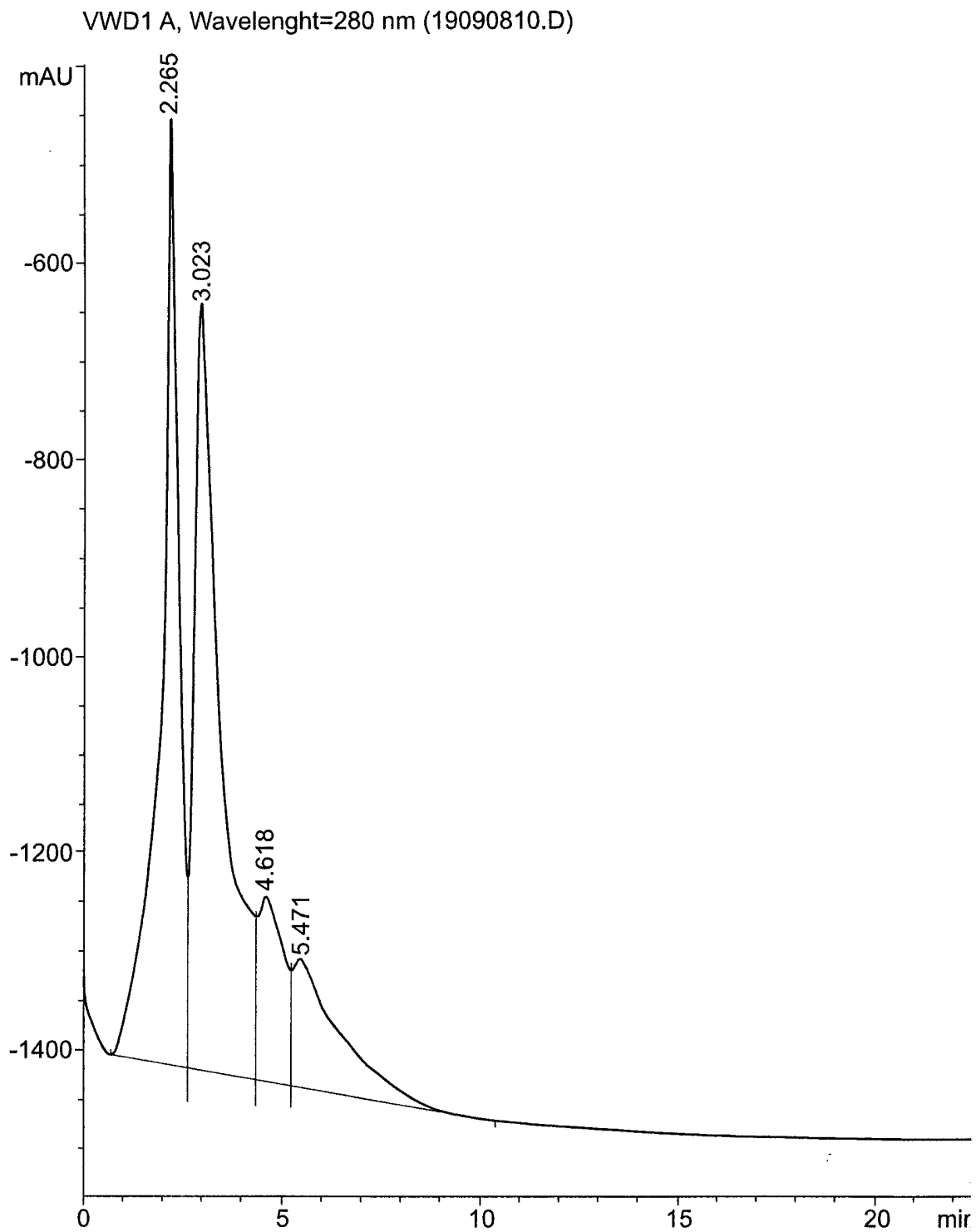
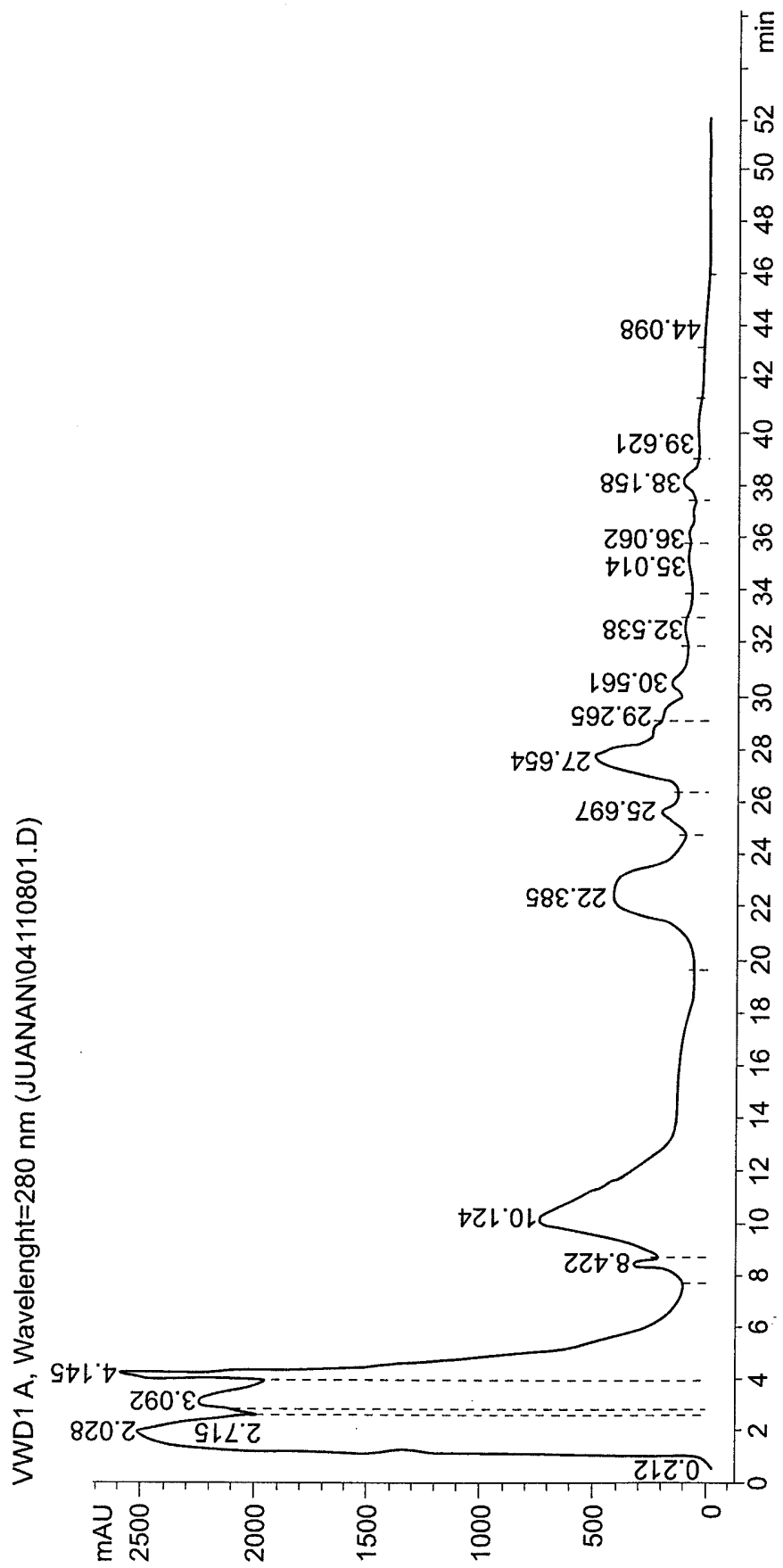


FIG. 3



6/4

FIG. 4

5/9

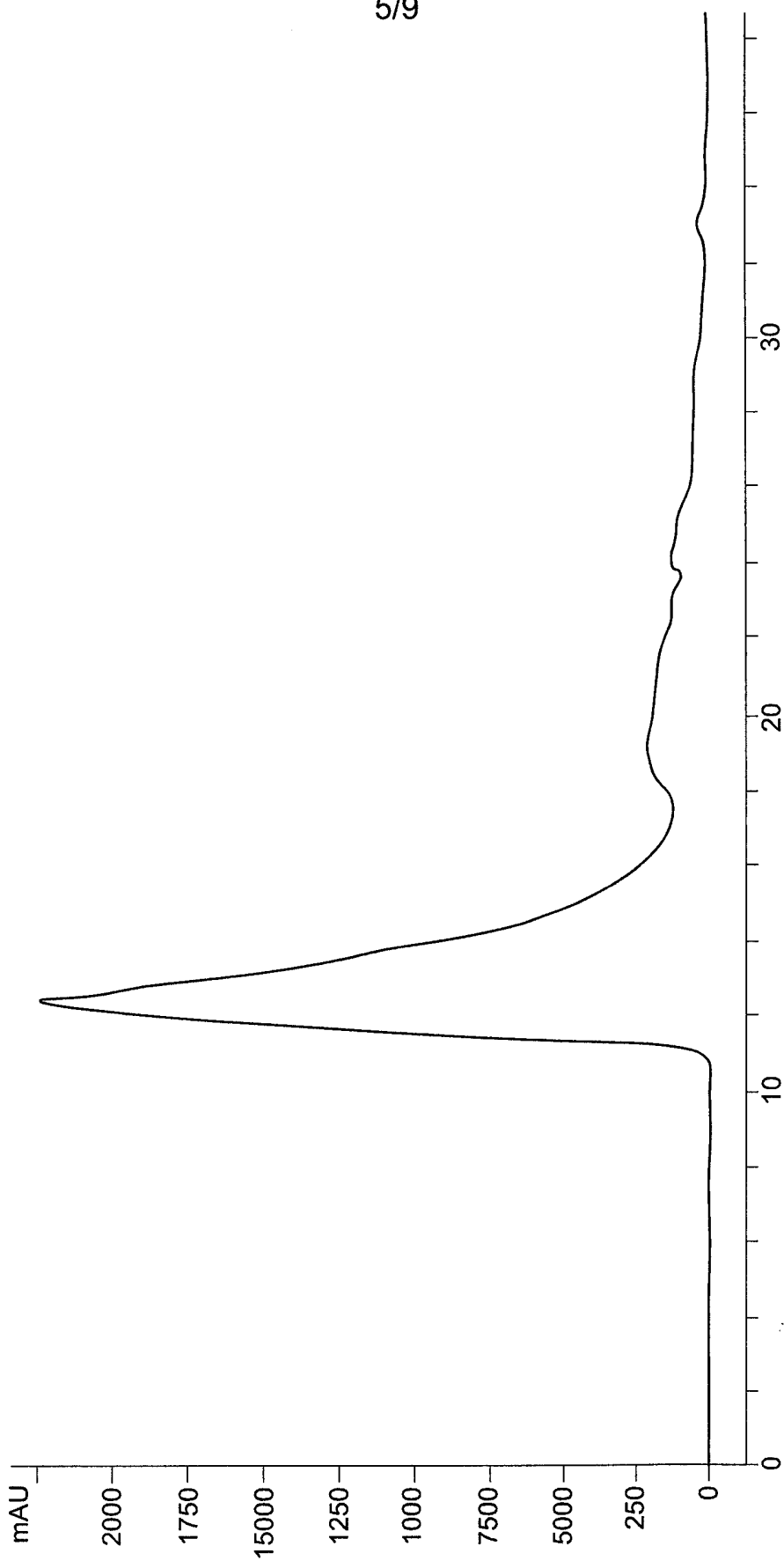


FIG. 5

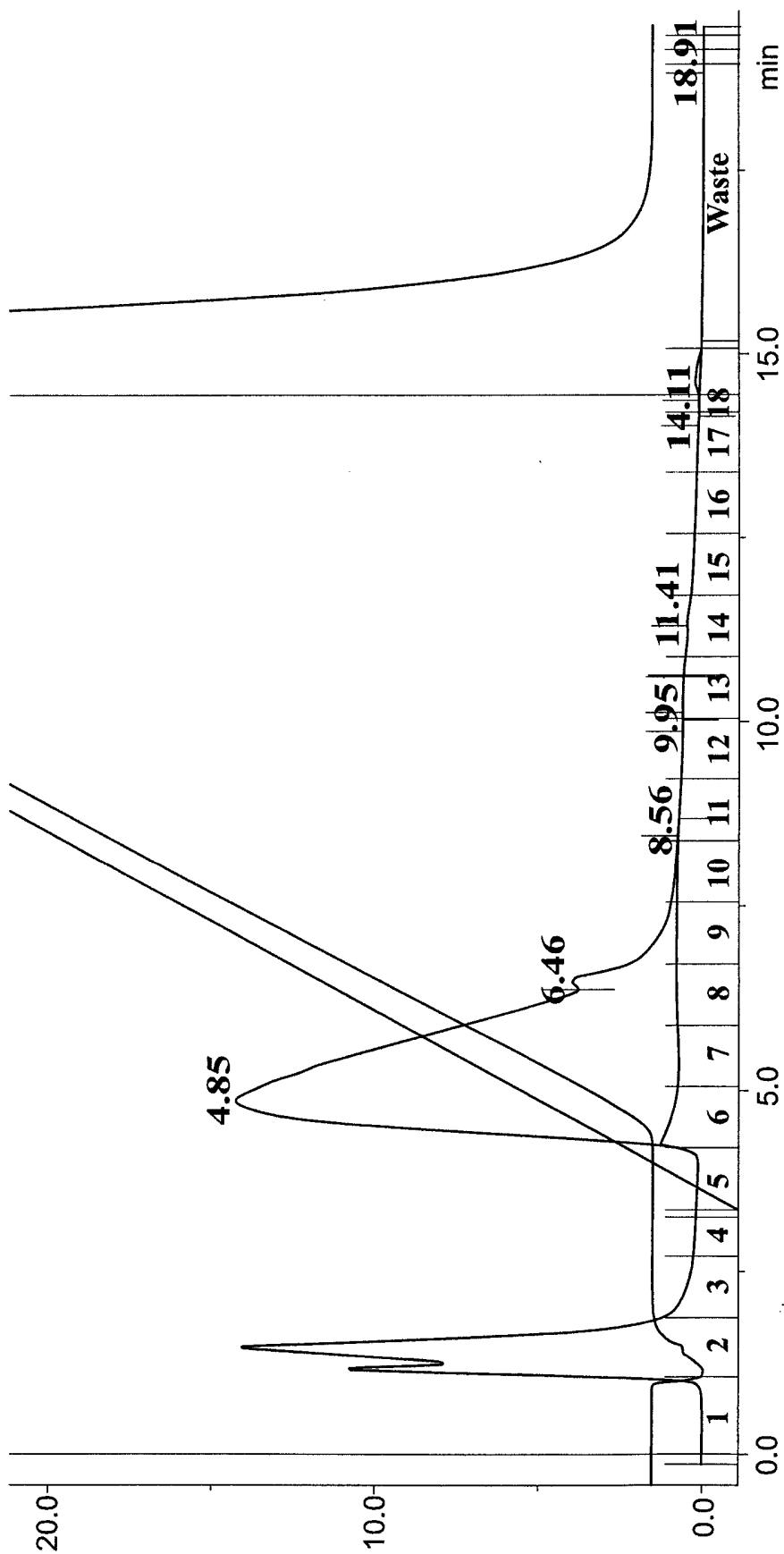


FIG. 6

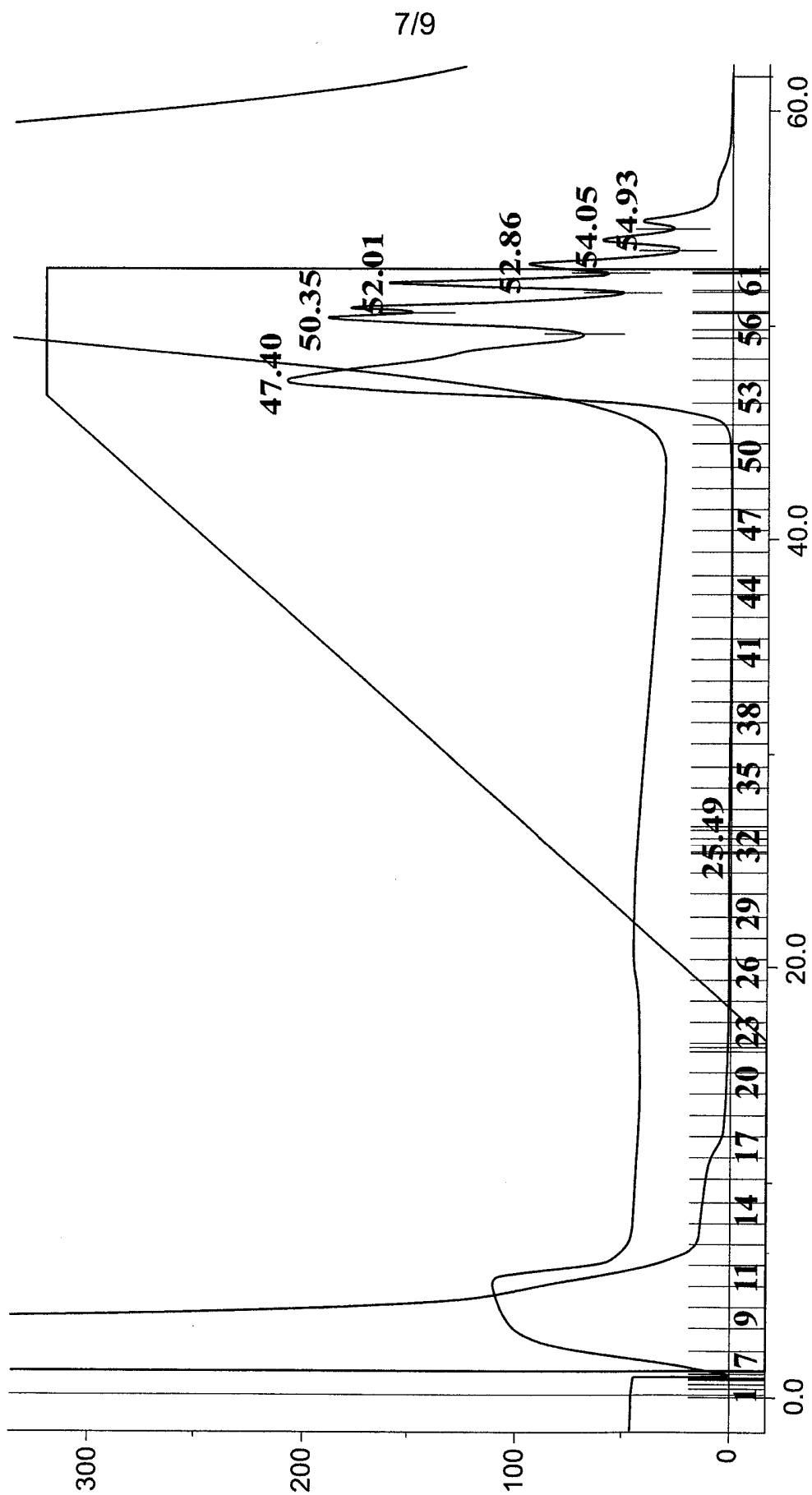


FIG. 7

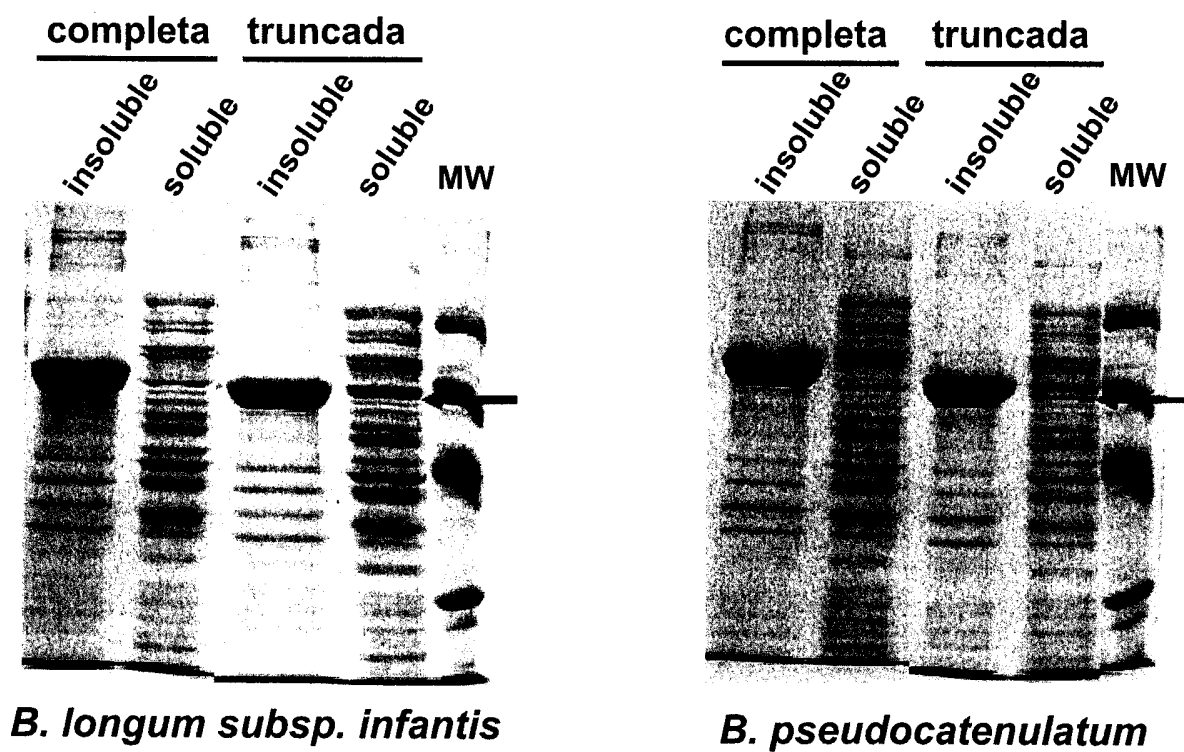


FIG. 8

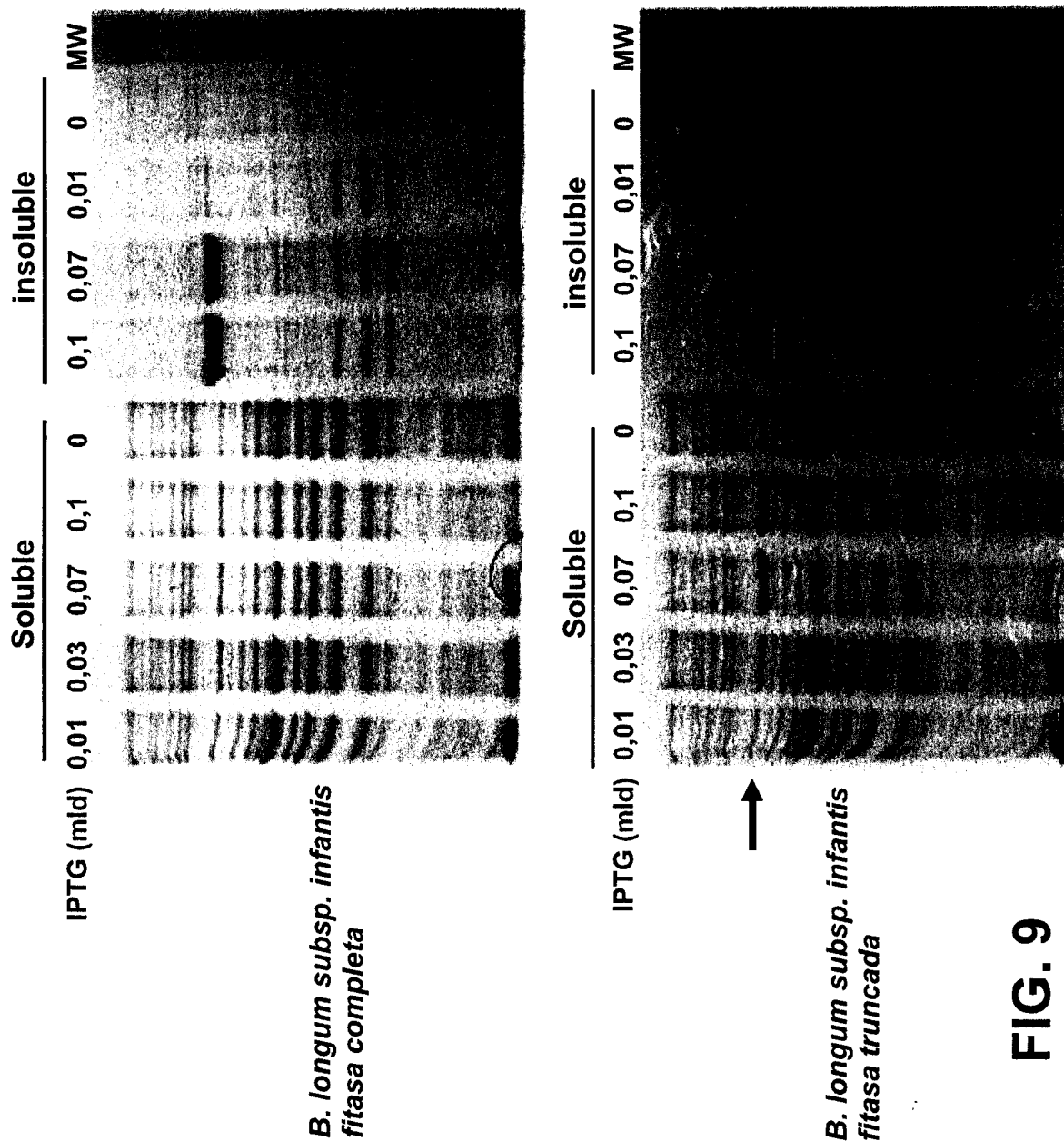


FIG. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070198

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A23K, C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, PAJ, BIOSIS, GOOGLE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAROS, M. et al. "Phytase activity as a novel metabolic in <i>Bifidobacterium</i> ". FEMS MICROBIOLOGY LETTERS. 15.06.2005. Vol. 247, N° 2, pages 231-239. the whole document, specially Table 1.	1-30
A	HAROS, M. et al. "Myo-inositol hexakisphosphate degradation by <i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697". 10.06.2007. Vol. 117, N° 1, pages 76-84. the whole document, specially Table 1.	1-30
A	WO 2008097619 A2 (DANISCO US, INC., GENENCOR DIVISION) 14.08.2008, claims.	1-30

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
03/08/2011

Date of mailing of the international search report
(05/08/2011)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
M. Novoa Sanjurjo

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498466

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2011/070198

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2008097619 A	14.08.2008	WO2008097620 A	14.08.2008
		CA2677643 A	14.08.2008
		CA2677342 A	14.08.2008
		US2008220498 A	11.09.2008
		US2008299622 A	04.12.2008
		US2009098249 A	16.04.2009
		MX2009007999 A	07.08.2009
		MX2009008000 A	18.08.2009
		EP2115143 A	11.11.2009
		EP20080725296	06.02.2008
		EP2118276 A	18.11.2009
		EP20080725297	06.02.2008
		CN101636496 A	27.01.2010
		CN101688192 A	31.03.2010
		JP2010517572 A	27.05.2010
		JP2010517573 A	27.05.2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070198

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/16 (2006.01)

C12N15/55 (2006.01)

A23K1/165 (2006.01)

C12P7/18 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070198

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A23K, C12P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, PAJ, BIOSIS, GOOGLE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	HAROS, M. et al. "Phytase activity as a novel metabolic in <i>Bifidobacterium</i> ". FEMS MICROBIOLOGY LETTERS. 15.06.2005. Vol. 247, Nº 2, páginas 231-239. Todo el documento, especialmente Tabla 1.	1-30
A	HAROS, M. et al. "Myo-inositol hexakisphosphate degradation by <i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697". 10.06.2007. Vol. 117, Nº 1, páginas 76-84. Todo el documento, especialmente Tabla 1.	1-30
A	WO 2008097619 A2 (DANISCO US, INC., GENENCOR DIVISION) 14.08.2008, reivindicaciones.	1-30

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
03/08/2011

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
05- AGOSTO- 2011 (05/08/2011)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Novoa Sanjurjo
Nº de teléfono 91 3498466

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2011/070198

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2008097619 A	14.08.2008	WO2008097620 A	14.08.2008
		CA2677643 A	14.08.2008
		CA2677342 A	14.08.2008
		US2008220498 A	11.09.2008
		US2008299622 A	04.12.2008
		US2009098249 A	16.04.2009
		MX2009007999 A	07.08.2009
		MX2009008000 A	18.08.2009
		EP2115143 A	11.11.2009
		EP20080725296	06.02.2008
		EP2118276 A	18.11.2009
		EP20080725297	06.02.2008
		CN101636496 A	27.01.2010
		CN101688192 A	31.03.2010
		JP2010517572 A	27.05.2010
		JP2010517573 A	27.05.2010

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C12N9/16 (2006.01)

C12N15/55 (2006.01)

A23K1/165 (2006.01)

C12P7/18 (2006.01)