

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 705**

51 Int. Cl.:

A23K 20/189 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2015 PCT/EP2015/075834**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2016 WO16071458**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2015 E 15791583 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 3215610**

54 Título: **Nueva fitasa, método para obtener la misma y uso de la misma**

30 Prioridad:

06.11.2014 EP 14192111

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

26.09.2019

73 Titular/es:

FERTINAGRO BIOTECH, S.L. (100.0%)

Pol. Ind. La paz, parcelas 185-188

44195 Teruel, ES

72 Inventor/es:

ATARES-REAL, SERGIO;

MARTIN-PEREZ, JULIA;

ROMERO-LOPEZ, JOAQUÍN;

SALAET-MADORRAN, IGNASI;

MARQUES-MASCARELL, RAMÓN y

ALIGUE, ROSA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 725 705 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nueva fitasa, método para obtener la misma y uso de la misma

Campo de la invención

5 La invención se refiere generalmente a secuencias de ácido nucleico nuevas y mejoradas que codifican un polipéptido o una proteína que tiene la actividad enzimática de una fitasa y a métodos para expresar eficazmente estas enzimas en una célula huésped.

10 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada i) que comprende la secuencia nucleotídica según SEQ ID NO: 1 que codifica una proteína con actividad de fitasa o ii) que tiene una identidad de secuencia de al menos 86% con una secuencia nucleotídica según SEQ ID NO: 1 que codifica una proteína con actividad de fitasa.

15 La presente invención también se refiere a una construcción de expresión o un vector que comprende la susodicha molécula de ácido nucleico aislada. La presente invención se refiere además a un método para producir una proteína que tiene la actividad enzimática de una fitasa, que comprende las etapas de:

a) introducir en una célula hospedadora un vector que comprende:

i) elementos que regulan la expresión que son funcionales en la célula hospedadora; y

ii) conectada operativamente a los mismos una molécula de ácido nucleico según se define en la presente;

20 b) cultivar las células hospedadoras obtenidas en la etapa a) bajo condiciones adecuadas para la expresión de la proteína, y opcionalmente

c) recuperar del cultivo celular la proteína producida en la etapa b).

La presente divulgación describe proteínas obtenidas mediante el método según la invención y el uso de las mismas para la fabricación de aditivos para piensos.

Antecedentes de la invención

25 La invención se refiere generalmente a nuevas moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido o una proteína que tiene la actividad enzimática de una fitasa y a un método para producir eficazmente esta proteína con actividad de fitasa en una célula hospedadora. Se divulga en la presente un polipéptido o una proteína obtenidos mediante el método según la presente invención y el uso de los mismos como un ingrediente activo en la fabricación de aditivos para piensos y/o para la liberación de fosfato del material orgánico procedente del suelo.

30 El fósforo elemental o puro (P) es bastante poco común en la naturaleza, que habitualmente se encuentra como parte de moléculas que incluyen el grupo fosfato (PO_4^{3-}) ligado a un grupo orgánico basado en carbono de animales y tejidos vegetales.

35 Sin embargo, el fósforo (P) es un nutriente importante para plantas y animales. El P es un importante macronutriente de plantas, constituyendo alrededor de 0,2% del peso seco de una planta. Es un componente de moléculas clave tales como ácidos nucleicos, fosfolípidos y ATP y, por consiguiente, las plantas no pueden crecer sin un suministro fiable de este nutriente. El fósforo inorgánico es la única fuente de fósforo que puede ser absorbida y captada por las plantas. Debido a la sola baja disponibilidad de fósforo inorgánico en el suelo, los agricultores se ven forzados a hacer disponible el macronutriente P.

40 Además, los animales requieren fósforo como un nutriente, que se puede proporcionar generalmente bien en la forma de fósforo inorgánico, por ejemplo, en una dieta o bien mediante la degradación de los diversos ingredientes de fósforo orgánico que constituyen la dieta.

45 El ácido fítico o el fitato es la principal forma de almacenamiento de fósforo en plantas tales como cereales, legumbres, semillas oleaginosas, con valores que varían de 1 a 5% en peso. El "ácido fítico", también denominado hexaquisfosfato de inositol (IP6), o la sal del mismo "fitato", es un ácido cíclico saturado. Por otra parte, el ácido fítico típicamente se quela y así hace inabsorbibles ciertos minerales secundarios importantes tales como cinc y hierro y, en un menor grado, también macrominerales tales como calcio y magnesio. Fitina se refiere específicamente a la forma de sal cálcica o magnésica de ácido fítico. Los catabolitos de ácido fítico se denominan polifosfatos de inositol

50

inferiores. Ejemplos son penta- (IP5), tetra- (IP4) y trifosfato (IP3) de inositol. Más de dos tercios del fósforo contenido en los cereales y las leguminosas están presentes en forma de fitato.

El fitato no es digerible para los seres humanos o los animales no rumiantes (animales monogástricos), de modo que no es una fuente apropiada ni de inositol ni de fosfato, si se come directamente. En particular, el fósforo y el inositol presentes en la forma de fitato no se pueden hacer biodisponibles para animales no rumiantes, debido a que carecen de la enzima digestiva *fitasa* que se requiere para retirar fosfato del inositol en la molécula de fitato. El fósforo presente en la forma de fitato constituye alrededor de entre 20 y 40% del fósforo de origen vegetal ingerido por animales monogástricos.

Puesto que el fitato no puede ser adsorbido por animales no rumiantes, el fitato no absorbido pasa habitualmente a través del tracto gastrointestinal, elevando la cantidad de fósforo en las heces. La excreción de fósforo en exceso puede conducir a problemas medioambientales y ecológicos, tales como eutrofización. La contaminación del suelo con fósforo plantea un grave problema en la agricultura, especialmente en zonas de agricultura intensiva con animales monogástricos.

Además, aunque algunos de los microorganismos de la flora intestinal del intestino delgado son capaces de hidrolizar el ácido fítico, el fósforo solo es absorbido en pequeñas cantidades. Por otra parte, un exceso de fitato tiene el efecto de un factor antinutricional ya que el fitato es capaz de quelar iones metálicos esenciales tales como calcio, cobre o cinc, que son necesarios para la nutrición animal, disminuyendo de ese modo su valor nutricional.

Para evitar las susodichas desventajas, el alimento para animales comúnmente estaba enriquecido con fósforo inorgánico, lo que a su vez incrementaba los costes de la producción ganadera. Un enfoque adicional que surgió recientemente para aliviar estas desventajas es la adición directa de fitasa, que cataliza la hidrólisis de fitato para liberar y hacer accesible fósforo orgánico para alimento para animales.

El uso de fitasa microbiana está aprobado actualmente para el uso en piensos, con el propósito de incrementar la disponibilidad de fósforo a partir de ácido fítico. Por ejemplo, la 6-fitasa producida por *Aspergillus oryzae* (DSM 14223) fue autorizada para pollos de engorde, gallinas ponedoras, pavos de engorde, cerdos de engorde y cerdos hembra por la Regulación (EC) N° 255/2005 de la Comisión Europea. Estas fitasas son extremadamente débiles e inestables, expresando la actividad máxima de pH entre 5,0 y 7,5, de modo que la actividad se reduce y limita sustancialmente debido a los bajos valores de pH del estómago (pH 2-3). También se sabe que las enzimas fitasa son fuertemente inhibidas por exceso de sustrato (fitato) y producto (fósforo inorgánico) y altas temperaturas (Power y Khon, 1993).

Las fitasas sintéticas son fosfomonoesterasas capaces de hidrolizar ácido fítico en ortofosfato inorgánico con bajas proporciones de ésteres fosfóricos, siendo los productos intermedios de penta-fosfato a monofosfato, y mioinositol libre (Nayini y Markakis, 1986; Lasztiy y Lasztiy, 1988; Harland y Morris, 1995). La IUPAC-IUB (1976) ha reconocido la 3-fitasa (EC 3.1.3.8), aislada en animales y microorganismos (Reddy y col., 1982; Lasztiy y Lasztiy, 1988).

Se han encontrado fitasas exógenas en microorganismos tales como hongos y levaduras (p. ej. *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus* sp) y bacterias (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*). La fitasa que se obtiene a partir de *Aspergillus* sp sigue cierto orden de hidrolización de la molécula de fitasa, es decir, después de haber liberado el grupo fosfato de la posición 3, continúa en el siguiente orden, 4, 5, 6 y 2 (Venekamp y cols., 1995). Estas enzimas muestran actividad a diferente pH 2,5 y 5,5. La actividad a pH 2,5 es alrededor de 40% menos eficaz que a pH 5,5, lo que es importante ya que la absorción de fósforo se produce en un grado mayor en el intestino delgado que tiene un pH 5,5. (Power y Khon, 1993).

La fitasa producida por *Aspergillus jicuumm* es una glicoproteína purificada, con una actividad enzimática que cambia con la temperatura y el pH. La temperatura óptima de la enzima está entre 60 y 70°C. Sin embargo, durante 10 minutos a 68°C, se observaba una pérdida de actividad hasta 60% (Nasi, 1990). Las enzimas de *Aspergillus niger* termoestables son resistentes contra el proceso de nodulización y se presenta que su actividad es al menos 5000 FTU/g. (Nasi, 1990).

El documento WO 2011/141613 A2 / EP 2 743 347 A2 describe un nuevo gen aislado de *Serratia odorifera*, que codifica una proteína o un polipéptido que tiene actividad de fitasa, un procedimiento para obtener el mismo en una célula hospedadora de levadura como, tal como *Pichia pastoris*, y el uso de la enzima como un ingrediente activo en la fabricación de aditivos para piensos. El documento WO 2011/141613 / EP 2 743 347 A2 informa sobre una fitasa, que no era sensible a la diferencia de pH entre el estómago (pH 3,5) y el tracto intestinal (pH 7,0) y que mantenía su actividad a lo largo de un amplio intervalo de pH. Se presentaba que la fitasa descrita en el documento WO 2011/1416 tenía termoestabilidad mejorada.

Yang y cols. titulado "Enhancement of alkaline phytase production in *Pichia pastoris*: influence of gene dosage, sequence optimization and expression temperature." (Protein Expr Purif. agosto 2012; 84(2):247-54) divulga las propiedades de estabilidad catalítica y térmica de la fitasa alcalina procedente de polen de lirio (LIALP).

Sin embargo, el modesto nivel de expresión de esta proteína silvestre fitasa de *Serratia* todavía representa un obstáculo con respecto a la producción de proteína a gran escala. Todavía existe una fuerte necesidad de identificar los factores y las condiciones que conduzcan a una expresión mejorada y eficaz de la proteína fitasa en una célula hospedadora. El estado de la técnica carece todavía de medios y métodos capaces de producir eficazmente más proteína con actividad de fitasa por volumen y a lo largo del tiempo. De ahí que todavía haya una fuerte necesidad de mejorar las condiciones de la producción a escala industrial a fin de proporcionar un método económico y fiable.

Sumario de la invención

El objetivo anterior se resuelve mediante los métodos y medios según la presente invención que se describen y reivindican en la presente. La presente invención se dirige a estas necesidades y proporciona una nueva molécula de ácido nucleico aislada de *Serratia odorifera* que codifica una proteína o un polipéptido con actividad de fitasa. La presente invención proporciona además métodos para expresar eficazmente y purificar posteriormente los genes aislados según la invención en una célula hospedadora.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada

i) que comprende la secuencia nucleotídica según SEQ ID NO: 1 que codifica una proteína con actividad de fitasa o

ii) que tiene una identidad de secuencia de al menos 86% con una secuencia nucleotídica según SEQ ID NO: 1 que codifica una proteína con actividad de fitasa,

en donde la molécula de ácido nucleico aislada comprende mutaciones de optimización codónica con respecto a un organismo celular hospedador, en donde el organismo celular hospedador es *Pichia pastoris*, y en donde la molécula de ácido nucleico difiere de la correspondiente secuencia codificante nucleotídica silvestre según SEQ ID NO: 8 en la presencia de al menos 50 mutaciones de optimización codónica.

En una realización preferida adicional, la molécula de ácido nucleico aislada tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con una secuencia nucleotídica según SEQ ID NO: 1 que codifica una proteína con actividad de fitasa.

En otra realización preferida más, la molécula de ácido nucleico no comprende una secuencia nucleotídica que codifica un péptido de señalización N-terminal.

Según la presente invención, el organismo celular hospedador es *Pichias Pastoris*.

La presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que difiere de la correspondiente secuencia codificante nucleotídica silvestre en la presencia de al menos 50 mutaciones de optimización codónica.

En una realización preferida adicional, al menos 50% de los codones de la correspondiente secuencia de ácido nucleico silvestre se modifican en los codones más favorecidos por el organismo celular hospedador.

En una realización preferida, todos los codones de la molécula de ácido nucleico aislada se modifican en los codones más favorecidos por el organismo celular hospedador.

En realizaciones preferidas adicionales, la molécula de ácido nucleico aislada según esto codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína con actividad de fitasa según SEQ ID NO: 3.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una construcción de expresión que comprende la susodicha molécula de ácido nucleico aislada conectada operativamente a elementos que regulan la expresión de la secuencia de ácido nucleico en una célula hospedadora, en donde el organismo celular hospedador es *Pichia pastoris*.

En una realización preferida, dicha construcción de expresión los elementos que regulan la expresión comprenden un promotor funcional en una célula hospedadora y opcionalmente una secuencia de terminación.

Según la presente invención, dicha célula hospedadora es un célula fúngica y la célula fúngica es *Pichia Pastoris*.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico o la construcción de expresión.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una proteína que tiene la actividad enzimática de una fitasa que comprende las etapas de:

a) introducir en una célula hospedadora un vector que comprende:

i) elementos que regulan la expresión que son funcionales en la célula hospedadora; y

ii) operativamente conectada a los mismos una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína con actividad de fitasa según se define en la presente;

5 b) cultivar las células hospedadoras obtenidas en la etapa a) bajo condiciones adecuadas para la expresión de la proteína, y opcionalmente

c) recuperar del cultivo celular la proteína producida en la etapa b), en donde el organismo celular hospedador es *Pichia pastoris*.

10 En una realización adicional, los elementos que regulan la expresión comprenden un promotor funcional en la célula hospedadora y opcionalmente una secuencia de terminación.

Según la presente invención, la célula hospedadora es una célula de levadura, y en donde la célula de levadura es *Pichia Pastoris*.

15 En realizaciones preferidas adicionales de la presente, la expresión de proteína se lleva a cabo usando un sistema de expresión metanólico.

En otras realizaciones preferidas más, la proteína recuperada en la etapa c) tiene una actividad de fitasa de al menos 1000 unidades/l.

20 En una realización preferida adicional, dicha etapa de recuperación comprende i) separar la proteína secretada del medio y/o i) separar la proteína de la célula hospedadora.

La presente invención se refiere a una proteína obtenida mediante el método según la invención.

25 También se divulga en la presente el uso de la proteína producida mediante el método descrito en la presente para la fabricación de aditivos para piensos.

30 También se divulgan en la presente aditivos para piensos que comprenden la proteína descrita en la presente o que comprenden la proteína producida mediante el método descrito en la presente.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos son ilustrativos de las realizaciones de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención según es abarcado por las reivindicaciones.

35 **Figura 1:** Determinación del peso molecular de proteína de fitasa AppAs-r mediante gel de acrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE): Medio de cultivo sin inducción con metanol (Carril 1); expresión de fitasa **AppAs-r** en medio de cultivo con metanol (Carril 2); expresión de fitasa **AppAs-r óptima** en medio de cultivo con metanol (Carril 3); marcador del PM (Carril 4)

40 **Figura 2:** Determinación de la actividad enzimática (%) de proteína de fitasa **AppAs-r óptima** dependiente de la temperatura (°C) y la resistencia a la temperatura

Figura 3: Determinación de la actividad enzimática de proteína de fitasa **AppAs-r óptima** dependiendo del pH

45 **Figura 4:** Efecto de las proteasas pepsina (rombo relleno) y tripsina (cuadrado relleno) sobre la actividad enzimática de **AppAs-r óptima**.

Figura 5: Mantenimiento de la actividad de fitasa de **AppAs-r óptima** a lo largo del tiempo

50 **Figura 6A:** Secuencia nucleotídica de la secuencia de fitasa de *Serratia odorifera* original (SEQ ID NO: 2) silvestre y la secuencia nucleotídica de *Serratia odorifera* sin la secuencia nucleotídica que codifica la secuencia del péptido de señalización N-terminal (SEQ ID NO: 8). La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia del péptido de señalización N-terminal (SEQ ID NO:4) está destacada en gris.

55 **Figura 6B:** Secuencia nucleotídica de la fitasa de *Serratia odorifera* optimizada/mejorada (**fitasa AppAs-r óptima/óptima**) (SEQ ID NO: 1)

Figura 6C: Secuencia de aminoácidos proteína de fitasa AppAs-r óptima de *Serratia odorifera* (SEQ ID NO: 3)

Figura 6D: Comparación de secuencias de aminoácidos entre la secuencia traducida de la Fig 6A (secuencia superior) y la secuencia traducida de la Fig 6B (secuencia inferior).

Figura 6E: Comparación de nucleótidos de la secuencia génica de la Fig 6A (secuencia superior) y la secuencia génica de la Fig 6B (secuencia inferior).

Figura 7: Perfiles de expresión de la fitasa silvestre y una fitasa mejorada (fitasa óptima)

Figura 8 Gráfico que muestra la producción de fitasa (unidades/l) a lo largo del tiempo (h) de fitasa silvestre en comparación con fitasa mejorada (fitasa óptima)

Descripción detallada de las realizaciones

La invención se refiere generalmente a secuencias de ácido nucleico nuevas y mejoradas que codifican un polipéptido o una proteína que tiene la actividad enzimática de una fitasa y a métodos para expresar eficazmente estas enzimas en una célula hospedadora.

Aunque la presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares, esta descripción no se debe considerar en un sentido limitativo.

Antes de describir con detalle realizaciones ejemplares de la presente invención, se dan definiciones importantes para entender la presente invención.

Según se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de "un(a)" y "uno" también incluyen los plurales respectivos a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

En el contexto de la presente invención, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" indican un intervalo de precisión que un experto en la técnica entenderá que todavía asegura el efecto técnico de la característica en cuestión. Típicamente, el término indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 20\%$, preferiblemente $\pm 15\%$, más preferiblemente $\pm 10\%$ y aún más preferiblemente $\pm 5\%$.

Se entenderá que el término "que comprende" no es limitativo. Para los propósitos de la presente invención, se considera que el término "que consiste en" es una realización preferida del término "que comprende". Si posteriormente se define en la presente que un grupo comprende al menos un cierto número de realizaciones, se entiende que esto también abarca un grupo que preferiblemente consiste solamente en estas realizaciones.

Por otra parte, los términos "primero", "segundo", "tercero" o "(a)", "(b)", "(c)", "(d)" etc. y similares en la descripción y las reivindicaciones se usan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Se ha de entender que los términos así usados son intercambiables bajo circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención descritas en la presente son capaces de funcionar en otras secuencias distintas a las descritas o ilustradas en la presente.

En caso de que los términos "primero", "segundo", "tercero" o "(a)", "(b)", "(c)", "(d)" "i", "ii" etc. se refieran a etapas de un método o uso o ensayo, no hay coherencia de tiempo o intervalos de tiempo entre las etapas, es decir, las etapas se pueden llevar a cabo simultáneamente o puede haber intervalos de tiempo de segundos, minutos, horas, días, semanas, meses o incluso años entre estas etapas, a menos que se indique otra cosa en la solicitud según se indica en la presente anteriormente o posteriormente.

Se ha de entender que esta invención no se limita a la metodología, los protocolos, los reactivos, etc. particulares que se describen en la presente, ya que estos pueden variar. También se entenderá que la terminología usada en la presente tiene el propósito de describir solamente realizaciones particulares, y no está destinada a limitar el alcance de la presente invención que solamente estará limitado por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen los mismos significados que son entendidos comúnmente por un experto normal en la técnica.

El objetivo anterior se resuelve mediante los métodos y medios según la presente invención que se describen y reivindican en la presente. La presente invención se dirige a estas necesidades y proporciona medios y métodos para obtener un gen aislado de *Serratia odorifera* que codifica una proteína o un polipéptido con actividad de fitasa. La presente invención proporciona además métodos para expresar eficazmente y purificar posteriormente los genes aislados según la invención en una célula hospedadora.

Según se usa en la presente, el término "gen" se refiere a una región definida que está situada dentro de un genoma y que puede comprender secuencias de ácido nucleico reguladoras responsables del control de la expresión, es decir, la transcripción y la traducción de la porción codificante. Un gen también puede comprender otras secuencias no traducidas y secuencias de terminación 5' y 3'. Elementos adicionales que pueden estar presentes son, por ejemplo, intrones.

Una "molécula de ácido nucleico aislada" que codifica la proteína con actividad de fitasa según la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está normalmente asociada en la fuente natural del ácido nucleico que codifica polipéptido. Una molécula de ácido nucleico que codifica polipéptido aislada es distinta de la que está en la forma o el emplazamiento en los que se encuentra en la naturaleza.

Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas son distinguibles de otra molécula de ácido nucleico que codifica polipéptido específica ya que existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico que codifica polipéptido aislada incluye moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptido contenidas en células que normalmente expresan el polipéptido donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una posición cromosómica diferente a la de células naturales.

Según se usa en la presente, el término "mutación" significa cualquier cambio en un polipéptido o una molécula de ácido nucleico con relación a un polipéptido o una molécula de ácido nucleico silvestre de los que se deriva el 'mutante' y, por ejemplo, puede comprender cambios de aminoácidos o nucleótidos individuales o múltiples, o cambios tanto de nucleótidos como de aminoácidos, incluyendo mutaciones puntuales, mutaciones nulas, mutaciones de cambio de marco, y puede comprender eliminaciones o inserciones o sustituciones de uno o más ácidos nucleicos o aminoácidos, que pueden comprender nucleótidos o aminoácidos o análogos de los mismos presentes o no presentes en la naturaleza.

Un "ácido nucleico" o una "molécula de ácido nucleico", según se usa en la presente, se refiere generalmente a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma mono-, bicatenaria o triple. El término puede abarcar ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia. Una secuencia de ácido nucleico particular también puede abarcar implícitamente variantes modificadas conservativamente de la misma (p. ej. sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias. Los términos "ácido nucleico", "secuencia de ácido nucleico" o "polinucleótido" también se pueden usar intercambiamente con gen, ADNc y ARNm codificado por un gen.

Los términos "ácido o ácidos nucleicos de la invención" o "molécula o moléculas de ácido nucleico de la invención" usados en la presente designan una secuencia de nucleótidos que se puede usar de por sí o en las composiciones o los métodos descritos en la presente. Los términos se refieren a toda la secuencia codificante de una proteína o un polipéptido procedente de *Serratia odorifera* con actividad de fitasa según SEQ ID NO: 2 mencionada en la presente. Por otra parte, los términos también designan ácidos nucleicos que codifican fragmentos de proteínas funcionales, vectores que comprenden las secuencias codificantes o los fragmentos funcionales de las proteínas anteriores así como derivados de los ácidos nucleicos mencionados en la presente, que tienen modificaciones, es decir eliminaciones, adiciones, inversiones, etc. de uno o más, p. ej. 1 a 50, 1 a 40, 1 a 30, 1 a 20, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2, o 1 nucleótido o nucleótidos, que no obstante codifican polipéptidos que tienen sustancialmente la actividad de fitasa que se describe para la fitasa de *Serratia odorifera* según SEQ ID NO: 2.

Los derivados funcionales de los ácidos nucleicos de la invención codifican polipéptidos de fitasa que tienen al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más actividad de fitasa cuando se comparan con el polipéptido silvestre.

Por otro lado, según se indica anteriormente, los términos "ácido o ácidos nucleicos de la invención" o "molécula o moléculas de ácido nucleico de la invención" designan además vectores que comprenden los ácidos nucleicos descritos en la presente. Estos vectores pueden contener secuencias reguladoras que permiten la transcripción y traducción eficaces de los ácidos nucleicos descritos en la presente.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" también pueden incluir polímeros que incluyen modificaciones tales como, pero no limitadas a, glicosilación, ligazón a lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación, y ribosilación de ADP.

El término "polipéptido aislado", según se usa en la presente, describe los diversos polipéptidos divulgados en la presente, significa un polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Sin embargo, normalmente, el polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada

i) que comprende la secuencia nucleotídica según SEQ NO: 1 que codifica una proteína con actividad de fitasa o

ii) que tiene una identidad de secuencia de al menos 86% con una secuencia nucleotídica según SEQ ID NO: 1 que codifica una proteína con actividad de fitasa.

5 Se divulgan en la presente una molécula de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende (a) un ácido nucleico (polinucleótido) que codifica al menos un polipéptido que tiene actividad de fitasa, en donde el ácido nucleico comprende una secuencia que tiene al menos alrededor de 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia o identidad de secuencia completa (100%) con la secuencia de ácido nucleico (polinucleótido) de SEQ ID NO:1. En una realización preferida adicional, la molécula de ácido nucleico aislada tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con una secuencia nucleotídica que codifica una fitasa según SEQ ID NO: 1.

15 SEQ ID NO: 1 se refiere a una secuencia nucleotídica de la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína o un polipéptido procedente de *Serratia odorifera* con actividad de fitasa. La secuencia nucleotídica de esta secuencia nucleotídica de fitasa mejorada u optimizada se denomina en la presente "AppAs-r óptima" o "fitasa óptima" (SEQ ID NO: 1) y se representa en la Figura 6B:

SEQ ID NO: 1

```

gagcctagatacgttttgaaaaaggtgggtgaggtctctcgacacggcgttagaccaccaactca
ggtaacagacaggctatgcaagcgggaaccggaaggagtgccacaatggctgactcgtgacgga
gaactaactggacacgggttatgcagccgcaacttaaggaagatcgaagccgattattataga
cgtcagggcctattggcaaacgggtgtccatctgctggggctgtttacgtctgggctagtctcta
caaagaacaagggccaccgcacaggctttgatggacgggtgcatttcccggatgcggggtcgccatt
catgctgcagccactgaacaagatcccttgtttcaagcagataagatgggtcttggtccactcgat
gccgaaagggctagaactgcaataaggcaggcaatgggtggctcagccgagcaagtgaagacacgt
tttagtgctgacattaggcgtctgcaagctgctgtttggttgctcaacaggcttgctcctgcttt
gaaacaaccttggaattactcaagagcatgacggtagattcagcatcaatggcttaggaacattg
tccaatatggctgaatctattagacttgccctactctgaaaaccagccaacggctcaagtgcgcttt
ggacacgggtgtcaacgcacccgctcgctcctttgttaccactgctaacggccagatatgacttt
accaatgatgtgcccctatatcgctcaaagagggtggctcggttctgttaaaccaaatgctttggct
cttgccgcagataggacttctgcccggggcgccacctgctgctcggttggttggtatttgctcgctcat
gacaccaatatcgcttatttaagaactctgcttgggtttttcttggaacagggactttaccaaga
ggtaatatccccctgctggaagtttggttttggaaagatggcgtgatagacaaacagggtcaaagg
ttcttacgtctgtacttccaggctcaatcggttgatcaaatacagacagttgtcaccactttctaca
ttatccccacctttaaaccaggttctctcgtcctgggttgaggcagttgtcacttggcgttctc
tgtccctggactgagtcacatgcaagaatgagagctgctatcgacccaactgcgttgctacagtg
cgtacagaccataa
    
```

20 Un aspecto de la presente invención es identificar y proporcionar mutaciones adecuadas en la secuencia génica silvestre de *Serratia odorifera* a fin de potenciar y mejorar la expresión de la proteína en una célula hospedadora. La secuencia nucleotídica silvestre no mutada o no modificada se ha descrito en el documento WO 2011/141613 A2 (que se incorpora mediante referencia) y se denomina en la presente SEQ ID NO: 2 (véase la Figura 6A):

25

SEQ ID NO: 2

atgttgctattgcaaaaggactggctcgcgtctgttatttgccgtcacgctgggtatgatttccagc
 gtaccaccaggctgagccgcgctacgtattggaaaagggtggttgaggtcagccgccacggcgtacgc
 ccgccgacctcaggcaaccggcaggcgatgcaggcgggaaccggccgagagtggccacaatggctg
 acgcgcgacggcgaaactcactggccacgggtatgcgcgcgccacgctgaaaggacgctatgaagcc
 gactattatcgcgctcagggcctattggccaacggctgtccgagcgcggggcggtgtatgtctgg
 gccagtcgcctacagcgcacgcgagccaccgcacaggcgttgatggacggcgcatctccggctgc
 ggggtcgcattcatgcggccgccaccgaacaggacccccctgtttcaggcagataaaaaggccctg
 gtgccgctcgatgccgaacgggctcgcacggcaataaggcaggcaatggggcgcagcgcgagcag
 gtgaaaaacgcgcttagcgcctgacattcggcgtctgcaagcggcggtctgcctgcgcacaacggct
 tgcccggcctttgaacaaccgtgggaaatcactcaggagcagcagcggccgcttcagcatcaacggct
 ctggggcagttgtccaacatggcggaaagcattcgcctggcctacagcgaaaaaccagccgacggcg
 caggtcgcctttggccaagggtgtcaacgcctcggccgtcgcgcgcttgcctgcccctgtcacccgc
 cgctatgactttaccaatgacgtgcccataatcgcgcaacgcgggggtcgggtgctgttaaaccaa
 atcgcgctggcgtggcgcgcgatcgaacctctgcggggcgcaccgcggcggcgcgctggttgctg
 tttgtcgcgatgacaccaatctcgttctcgcgcaccctgcttggctttagctggcaacagggg
 ctttaccacgcggcaatattccccggctggcagctcgggtattcgaaacgctggcgcgatcggcaa
 acgggcccagcgtctcctgcgctctgacttccaggcgaatcgtggatcaaatccgcagttgtca
 ccgctgagcagcgtgtcgcaccgcttaaaaaaccgagttcagccgctcctggctgcccgcagttgtca
 ctggggctactctgtccctggactgagtcgatgcaacgggatgcgcgcggctatcgaccgcagcggc
 ctgcctacgggtgcagtagcggccataa

5 La secuencia nucleotídica de fitasa de *Serratia odorifera* optimizada según SEQ ID NO: 1 difiere de la secuencia nucleotídica silvestre según SEQ ID NO: 2 en la presencia de 211 mutaciones o modificaciones puntuales en la secuencia nucleotídica.

10 La secuencia nucleotídica de fitasa de *Serratia odorifera* optimizada según SEQ ID NO: 1 no comprende la secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de señalización peptídica N-terminal de la secuencia silvestre según SEQ ID NO: 4. La secuencia del péptido de señalización en la secuencia de fitasa silvestre indicada anteriormente según SEQ ID NO: 2 se destaca en gris.

15 La secuencia codificante silvestre sin la secuencia del péptido de señalización se denomina en la presente SEQ ID NO: 8.

Una comparación de secuencias de la secuencia de SEQ ID NO: 1 con SEQ ID NO: 2 se representa en la Figura 6 E. Cada discordancia en el alineamiento de secuencias corresponda a una posición mutada o modificada, donde el nucleótido con respecto a la secuencia original se cambiaba por otro nucleótido.

20 En referencia al alineamiento de secuencias según la Fig. 6E, la secuencia nucleotídica de fitasa de *Serratia odorifera* optimizada según SEQ ID NO: 1 difiere de la secuencia nucleotídica silvestre según SEQ ID NO: 8 en 211 mutaciones o modificaciones puntuales en la secuencia nucleotídica.

25 La expresión de la secuencia nucleotídica según SEQ ID NO: 1 da como resultado la secuencia polipeptídica de la fitasa de *Serratia odorifera* que se muestra en la Figura 6C (SEQ ID NO: 3). SEQ ID NO: 3 corresponde a la secuencia polipeptídica de la proteína de fitasa madura. Como se observa en el alineamiento de secuencias de la Figura 6C, la secuencia polipeptídica traducida de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 comparten 100% de identidad, es decir ninguna de las 211 mutaciones descritas en SEQ ID NO: 1 daba como resultado un intercambio de uno de los aminoácidos codificados.

30 Preferiblemente, el término "modificación" o "mutación" dentro del significado de la presente invención se refiere a alteraciones de la posición de los nucleótidos de la secuencia silvestre, que no dan como resultado el intercambio del aminoácido codificado sino el cambio del codón de un aminoácido dado, así el intercambio de nucleótidos de ajuste codónico u optimización codónica.

35 Como se apreciará, la optimización codónica se basa generalmente en la utilización de codones en un organismo hospedador específico, en el que se expresa una secuencia de ácido nucleico dada, es decir se traduce en la proteína correspondiente. La optimización codónica del ácido nucleico que codifica la proteína de fitasa de *Serratia odorifera* descrita en la presente tiene en cuenta las frecuencias codónicas relativas, el contenido de GC optimizado y las inestabilidades del ARNm.

40 Generalmente, "porcentaje de identidad" (en %) se refiere a una medida cuantitativa de la similitud entre dos secuencias (ADN, aminoácido u otro). Se espera que las especies estrechamente relacionadas tengan un porcentaje de identidad superior para una secuencia dada que especies relacionadas más lejanamente, y así el porcentaje de

identidad hasta un grado refleja relación. El porcentaje de identidad se calcula al multiplicar el número de concordancias en el par por 100 y dividir por la longitud de la región alineada, incluyendo los huecos. La puntuación de identidad solo cuenta concordancias perfectas, y no considera el grado de similitud de aminoácidos entre sí. Para el cálculo, solo se incluyen huecos internos en la longitud, no huecos en los extremos de la secuencia.

5
$$\text{Porcentaje de Identidad} = (\text{Concordancias} \times 100) / \text{Longitud de la región alineada (con huecos)}$$

10 EL "porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico" con respecto a la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 1 que codifica una proteína con actividad de fitasa identificada en la presente se define como el porcentaje de nucleótidos en una posible secuencia que son idénticos a los nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 1, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de identidad de secuencia. El alineamiento con propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de ácidos nucleicos se puede conseguir de diversos modos que están dentro de la experiencia de la técnica al usar software disponible públicamente tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (ADNSTAR).

20 Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico se puede determinar usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul y cols., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> u obtenerse de otro modo de the National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en donde todos esos parámetros de búsqueda se fijan a valores por defecto incluyendo, por ejemplo, desenmascarado = sí, cadena = todos, presencias esperadas = 10, longitud de baja complejidad mínima = 15/5, valor e de múltiples pasos = 0,01, constante para múltiples pasos = 25, caída para el alineamiento con huecos final = 25 y matriz de puntuación = BLOSUM62.

25 Cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico dada, es decir la secuencia AppAs-r óptima (SEQ ID NO: 1), no es igual a la longitud de una secuencia de ácido nucleico de comparación, el porcentaje de identidad se calcula como sigue:

1. AppAs-r óptima (SEQ ID NO: 1) es más corta que el ADN de comparación:

30 AppAs-r óptima NNNNNNNNNNNNNN (longitud = 14 nt)

ADN de comparación NNNNNNXXXXXXXXXX (longitud = 16 nt)

(Las longitudes de las secuencias son ejemplares)

35 % de identidad de secuencia de ácido nucleico = (el número de nucleótidos idénticamente concordantes entre las dos secuencias de ácido nucleico según se determina, p. ej., mediante NCBI-BLAST2) x 100 dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico AppAs-r óptima) = 6 x 100 dividido por 14 = 42,9%

2. AppAs-r óptima (SEQ ID NO: 1) es más larga que el ADN de comparación:

40 AppAs-r óptima NNNNNNNNNNNNNN (longitud = 12 nt)

ADN de comparación NNNNNNXXYY (longitud = 9 nt)

(Las longitudes de las secuencias son ejemplares)

45 % de identidad de secuencia de ácido nucleico = (el número de nucleótidos idénticamente concordantes entre las dos secuencias de ácido nucleico según se determina, p. ej., mediante NCBI-BLAST2) x 100 dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico AppAs-r óptima) = 4 x 100 dividido por 24 = 33,3%

50 De ahí que la longitud de la secuencia de referencia (secuencia de ácido nucleico AppAs-r óptima) determine la longitud de la región alineada. Se apreciará que este principio también es aplicable para la comparación de secuencias polipeptídicas.

55 Las expresiones "proteína con actividad de fitasa" o "fitasa" que se usan en la presente se refieren a hexafosfato de meso-inositol fosfohidrolasas, que catalizan la disociación de los grupos fosfato procedentes del ácido fítico (IP6) o el fitato. El resultado de esta reacción enzimática es un grupo fosfato libre y un éster del fosfatoinositol (IP5-IP1). Generalmente, las fitasas se pueden clasificar en dos grupos: fitasas microbianas o fúngicas (E.C. 3.1.3.8) o 3-fitasa,

que empiezan a hidrolizar el grupo fósforo situado en el anillo de inositol C1 o C3 o fitasas de plantas (E.C. 3.1.3.26) o 6-fitasa, que empiezan a hidrolizar, preferiblemente, el grupo fosfato situado en el C6 del anillo de inositol.

5 Según esto, "actividad de fitasa", según se usa en la presente, se refiere a una reacción enzimática de hidrolización de los grupos fosfato procedentes del ácido fítico (IP6) o fitato. En una realización, la actividad enzimática de fitasa es la actividad de fitasa que se describe para la proteína de *Serratia odorifera* según SEQ ID NO: 2.

10 La presente invención también contempla medir la actividad de fitasa. A modo de ejemplo, la actividad de fitasa se puede medir con los ensayos que se describen en el documento WO 2011/141613 A2 o se describen en la presente en el Ejemplo 3, en el que la actividad específica se evaluó al medir la concentración de fosfato o fósforo libre que era liberada por la enzima fitasa usando el método de molibdato-vanadato en ácido.

15 Este método se basa en el APHA Standard Method 4500-P C. En ácidos, los iones ortofosfato reaccionan con molibdato amónico y vanadato amónico para formar vanadomolibdato fosfórico amónico amarillo, que se puede analizar fotométricamente a 415 nm. La intensidad del color amarillo es proporcional a la concentración de fosfato. Sin embargo, la presente invención también prevé otros métodos o ensayos para medir o determinar y actividad de fitasa que están dentro de los hábitos del experto en la técnica. Un método alternativo es el método del azul de molibdeno. En un medio ácido, los orto-fosfatos se unen con molibdato amónico para formar ácido molibdénico-fosfórico. Con la ayuda de un agente reductor, este forma un compuesto azul de molibdeno fosforado. La medida fotométrica de la intensidad de colorante se puede realizar a 880 nm.

20 En un aspecto específico, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que carece de la secuencia de señalización N-terminal y/o la metionina iniciadora y está codificada por una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos como la descrita anteriormente en la presente.

25 La secuencia peptídica de señalización del gen silvestre de *Serratia odorifera* está definida por la secuencia nucleotídica según SEQ ID NO: 4 y por la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 4:

```
atggttgctattgcaaaaggactggctgcgctctgttatttgccgctcacgctgggtatgattttccagc
gtagcccaggct
```

30 SEQ ID NO: 5: MLLLQKDWSRLLFAVTLGMISVAQA

Los inventores de la presente invención observaron que la expresión del gen de fitasa silvestre de *Serratia odorifera* de longitud completa como el mostrado en la Fig. 6A (SEQ ID NO: 2) que incluye el péptido de señalización de 26 AA conduce a una proteína inestable que después de la expresión desaparecía rápidamente. Por lo tanto, los inventores de la presente invención observaron que la omisión del péptido de señalización de 26 AA daba como resultado una potenciación de la expresión (véase el Ejemplo 1).

35 En una realización específica, la invención describe la secuencia AppAs-r optimizada para la expresión en un sistema de expresión de células hospedadoras adecuado. La secuencia optimizada tiene en cuenta el sesgo de utilización de codones del organismo celular hospedador. En una realización, se usan los codones más preferidos o más frecuentes para cada aminoácido de la secuencia de ácido nucleico dada que codifica la proteína con actividad de fitasa que se describe en la presente. Alternativamente, puede ser suficiente proporcionar una secuencia parcialmente optimizada, es decir donde una parte de los codones de la secuencia de ácido nucleico está adaptada al codón más favorecido. En algunas realizaciones, es suficiente optimizar los codones de algunos aminoácidos específicos en la secuencia AppAs-r.

40 Realizaciones preferidas de la presente invención se refieren a una secuencia nucleotídica, en la que al menos 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% de los codones de la secuencia de ácido nucleico AppAs-r silvestre están modificados en los codones más favorecidos por el organismo celular hospedador. En realizaciones preferidas adicionales, al menos 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58% o 59% de los codones de la secuencia de ácido nucleico están modificados en hasta los codones más favorecidos por el organismo celular hospedador. En realizaciones preferidas adicionales, al menos 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68% o 69% de los codones de la secuencia de ácido nucleico silvestre están modificados en los codones más favorecidos por el organismo celular hospedador. En realizaciones preferidas adicionales, al menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% o 79% de los codones de la secuencia de ácido nucleico silvestre están modificados en los codones más favorecidos por el organismo celular hospedador. En realizaciones preferidas adicionales, al menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% u 89% de los codones de la secuencia de ácido nucleico están modificados en los codones más favorecidos por el organismo celular hospedador. En realizaciones preferidas adicionales, al menos 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de los codones de la secuencia de ácido nucleico silvestre están modificados en los codones más favorecidos por el organismo celular hospedador.

5 En realización preferidas, la molécula de ácido nucleico aislada molécula de ácido nucleico difiere de la correspondiente secuencia codificante nucleotídica silvestre según SEQ ID NO: 8 en la presencia de mutaciones de optimización codónica.

10 "Mutaciones de optimización codónica" según la presente invención se refiere a mutaciones sinónimas en la secuencia codificante que no dan como resultado un cambio de la secuencia de aminoácidos. El uso de las nuevas secuencias nucleotídicas de fitasa que comprenden mutaciones de optimización codónica según la presente invención tiene la sorprendente ventaja técnica sobre secuencias de fitasa de la técnica anterior de que es posible una mejora de la expresión en un organismo celular hospedador dado sin afectar negativamente a la actividad de fitasa al cambiar la secuencia de aminoácidos, así, se conserva la estructura o la función de la proteína de fitasa resultante.

15 Realizaciones preferidas adicionales de la presente divulgación se refieren a una secuencia nucleotídica, en la que al menos 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% de la secuencia codificante nucleotídica de fitasa silvestre según SEQ ID NO: 8 están modificados en los codones más favorecidos por el organismo celular hospedador. En realizaciones preferidas adicionales, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58% o 59% de los
 20 codones de la secuencia codificante nucleotídica de fitasa silvestre según SEQ ID NO: 8 están modificados en los codones más favorecidos por el organismo celular hospedador. En realizaciones preferidas adicionales, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68% o 69% de los codones de la secuencia codificante nucleotídica de fitasa silvestre según SEQ ID NO: 8 están modificados en los codones más favorecidos por el organismo celular hospedador. En realizaciones preferidas adicionales, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% o 79% de los codones de la
 25 secuencia codificante nucleotídica de fitasa silvestre según SEQ ID NO: 8 están modificados en los codones más favorecidos por el organismo celular hospedador. En realizaciones preferidas adicionales, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% u 89% de los codones de la secuencia codificante nucleotídica de fitasa silvestre según SEQ ID NO: 8 están modificados en los codones más favorecidos por el organismo celular hospedador. En realizaciones preferidas adicionales, al menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de los codones de la secuencia
 30 codificante nucleotídica de fitasa silvestre según SEQ ID NO: 8 están modificados en los codones más favorecidos por el organismo celular hospedador.

35 En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico aislada comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones de optimización codónica con respecto al organismo celular hospedador.

En otras realizaciones adicionales de la presente invención; la secuencia de ácido nucleico aislada comprende al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mutaciones de optimización codónica con respecto al organismo celular hospedador.

40 En realizaciones preferidas adicionales de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico aislada comprende al menos 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o 210 mutaciones de optimización codónica con respecto al organismo celular hospedador.

45 En las realizaciones más preferidas, todos los codones de la secuencia de ácido nucleico aislada están optimizados codónicamente con respecto al organismo celular hospedador.

En algunas realizaciones, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91 y 90% de todas las posiciones de aminoácidos usan el codón más preferido de la célula hospedadora.

50 Según la presente invención, la secuencia de ácido nucleico se ha optimizado teniendo en cuenta el sesgo de utilización de codones en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. En realizaciones específicas, como las descritas adicionalmente en el Ejemplo 5 posterior, los codones originales se analizaron uno a uno y se cambiaron hasta el codón más preferido para cada aminoácido en *P. pastoris*. El sesgo de la utilización de codones en *P. pastoris* fue descrito previamente en Bai y cols. (Bai J., Swartz D.J., Protasevich I.I., Brouillette C.G., Harrell P.M., Hidebrandt E.,
 55 Gasser B., Mattanovich D., Ward A., Chang G. y Urbatsch I.L. (2011) A gene optimization strategy that enhances production of fully functional P-glycoprotein in *Pichia pastoris*. PLoSOne 6:1-15), Sinclair y cols. (Sinclair G. y Choy F.Y.M. (2002) Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification 26 :96-105) y Huang y cols. (Huang H, Yang P, Luo H, Tang H, Shao N, y cols. (2008) High-level expression of a truncated 1,3-1,4-beta-D-glucanase from *Fibrobacter succinogenes* in *Pichia pastoris* by optimization of codons and fermentation. Appl Microbiol Biotechnol. 78: 95-103.).
 60

65 El término "construcción de expresión" o "casete de expresión" se puede usar intercambiamente en la presente y se refieren a una secuencia de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una secuencia nucleotídica particular en una célula hospedadora apropiada, que comprende un promotor conectado operativamente a la secuencia nucleotídica de interés que está conectada operativamente a señales de terminación. Típicamente, comprende secuencias requeridas para la traducción apropiada de la secuencia nucleotídica. La región codificante

habitualmente codifica una proteína de interés. El casete de expresión que comprende la secuencia nucleotídica de interés puede ser quimérico, significando que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión también puede ser uno que esté presente en la naturaleza pero que se ha obtenido de una forma recombinante útil para la expresión heteróloga. Sin embargo, típicamente, el casete de expresión es heterólogo con respecto al hospedador, es decir, la secuencia de ADN particular del casete de expresión no se presenta naturalmente en la célula hospedadora y se debe haber introducido en la célula hospedadora o un progenitor de la célula hospedadora mediante un episodio de transformación. La expresión de la secuencia nucleotídica en el casete de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible que inicia la transcripción solamente cuando la célula hospedadora se exponga a algún estímulo externo particular. En una realización, el vector de expresión incluye un gen indicador conectado operativamente para la expresión con la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido con actividad de fitasa.

"Heterólogo", según se usa en la presente, significa "de origen natural diferente" o representa un estado no natural. Por ejemplo, si una célula hospedadora se transforma con una secuencia de ácido nucleico derivada de otro organismo, particularmente de otra especie, esa secuencia de ácido nucleico es heteróloga con respecto a esa célula hospedadora y también con respecto a descendientes de la célula hospedadora que portan esa secuencia de ácido nucleico. De forma similar, heterólogo se refiere a una secuencia nucleotídica derivada de e insertada en el mismo tipo de célula original natural, pero que está presente en un estado no natural, p. ej. un número de copias diferente, o bajo el control de elementos reguladores diferentes.

"Elementos reguladores" se refieren generalmente a secuencias implicadas en conferir la expresión de una secuencia nucleotídica. Los elementos reguladores comprenden comúnmente un promotor conectado operativamente a la secuencia nucleotídica de interés y señales de terminación. Típicamente, también abarcan secuencias requeridas para la traducción apropiada de la secuencia nucleotídica. "Elementos reguladores" adecuados para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucarióticas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El término "conectado operativamente", según se usa en la presente, significa que una secuencia de ácido nucleico se sitúa en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está conectado operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está conectado operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está conectado operativamente a una secuencia codificante si está situado de modo que facilite la traducción. Generalmente, "conectado operativamente" significa que las secuencias de ADN que están conectadas son contiguas, y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Los potenciadores no son necesariamente contiguos. La conexión se efectúa mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen estos sitios, se usan los adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos según la práctica común.

"Vectores de expresión" o "plásmidos de expresión" adecuados para la expresión del gen de fitasa optimizado según la presente invención en los diversos sistemas de expresión están completamente dentro de la experiencia de la técnica. Vectores de expresión adecuados para la expresión en la levadura *Pichias*, a modo de ejemplo, incluyen, pero no se limitan a, la serie pPIC de vectores. Estos vectores usan el promotor AOX1 que es inducible con metanol. Los plásmidos de expresión pueden contener elementos para la inserción de ADN extraño en el genoma de la levadura y una secuencia de señalización para la secreción de proteína expresada.

La proteína fitasa optimizada según la presente invención se puede expresar en cualquier sistema de expresión de proteínas de células hospedadoras adecuado. Sistemas de expresión de proteínas comúnmente usados incluyen los derivados de bacterias, levaduras, baculovirus/insecto y células de mamífero, y los hongos filamentosos tales como el hongo comercialmente importante *Myceliophthora thermophile*. Sistemas bacterianos adecuados incluyen, pero no se limitan a, *Escherichia coli*, *Corynebacterium* o *Pseudomonas fluorescens*. Sistemas de expresión eucarióticos incluyen sistemas de levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia Pastoris* o *Kluyveromyces lactis*. La presente invención también contempla el uso de otros sistemas de expresión fúngicos tales como hongos filamentosos como *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Myceliophthora thermophila*, *C1*, recientemente descritos para la producción de diversas enzimas industriales. Sistemas de expresión eucarióticos adicionales incluyen una célula infectada con baculovirus, por ejemplo, células de insecto infectadas tales como Sf9, Sf21, cepas High Five o células de mamífero tales como HeLa y HEK 293, lo que también permite la expresión de proteínas glicosiladas que no se pueden expresar usando levaduras o células procariontes (como *E. coli*). Es un sistema muy útil para la expresión de proteínas con alta calidad. Sistemas de expresión eucarióticos adecuados adicionales también incluyen la expresión de células de insecto no líticas como una alternativa al sistema de expresión baculoviral lítico, el sistema de expresión de *Leishmania tarentolae* (cepa no patógena) protozoario, así como sistemas vegetales (p. ej. tabaco) y sistemas de mamífero tales como *Bos primigenius* (bovino), *Mus musculus* (ratón), ovario de hámster chino, células renales embrionarias humanas y riñón de cría de hámster.

En una realización preferida adicional más, la célula fúngica es *Pichia Pastoris* (véase Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR (septiembre 2000). "Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*". Mol. Biotechnol. 16 (1): 23-52). Cepas de *Pichia pastoris* adecuadas para la expresión de proteínas según se describe en la presente incluyen GS 115, X33 o KH71H (Invitrogen, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, 92008, EE. UU. de A.). En una realización preferida, la cepa de *Pichia pastoris* es KH71H.

Para la expresión de la nueva molécula de ácido nucleico nucleotídica de fitasa de la presente invención, el gen se clona en un vector de expresión adecuado que comprende dicha molécula de ácido nucleico o la construcción de expresión según se describe en la presente en los ejemplos.

La presente invención se refiere a un método para producir una proteína que tiene la actividad enzimática de una fitasa que comprende las etapas de:

a) introducir en una célula hospedadora a el vector de expresión que comprende:

i) elementos que regulan la expresión que son funcionales en la célula hospedadora; y

ii) conectada operativamente a los mismos una molécula de ácido nucleico según se define en la presente;

b) cultivar las células hospedadoras obtenidas en la etapa a) bajo condiciones adecuadas para la expresión de la proteína, y opcionalmente

c) recuperar del cultivo celular la proteína producida en la etapa b).

La etapa de introducción del vector de expresión se conoce comúnmente como "transformación", que se define como la alteración genética de una célula resultante de la captación y la incorporación directas de material genético exógeno (ADN exógeno) de sus alrededores y tomado a través de la membrana o las membranas celulares. Métodos para transformar una célula hospedadora dada con el vector de expresión o la construcción de expresión así como las condiciones óptimas dependen generalmente de la célula hospedadora y están dentro de la experiencia de la técnica. Según esto, el experto está totalmente al tanto de las condiciones específicas para inducir la expresión en la célula hospedadora y cultivar la célula hospedadora en un medio apropiado.

Los términos "recuperar" y "purificar" se pueden usar intercambiabilmente en la presente y se refieren a la separación del cultivo del polipéptido expresado para obtener una cantidad pura o sustancialmente pura del polipéptido, es decir separado de otras proteínas y/o lípidos y/o ácidos nucleicos y/o componentes de la célula hospedadora en el cultivo. Dentro del significado de la presente invención, dicha etapa de recuperación comprende i) separar del medio la proteína secretada y/o ii) separar la proteína de la célula hospedadora.

La proteína de fitasa optimizada de la presente invención se expresa en la levadura *Pichia pastoris*. La producción de proteína recombinante en la levadura *Pichia pastoris* tiene varias ventajas sobre otros sistemas de expresión eucarióticos y procarióticos, a saber: velocidad de crecimiento rápida, fermentación de alta densidad celular, productividad en un medio casi libre de proteína; eliminación de contaminación por endotoxinas y bacteriófagos, diversas modificaciones postraduccionales que incluyen plegamiento, glicosilación, metilación, acilación, ajuste proteolítico y orientación a compartimentos subcelulares del polipéptido; y purificación fácil del medio de crecimiento.

La mayoría de los sistemas de expresión de *P. pastoris* se basan en el promotor de alcohol oxidasa (AOX1) inducido por metanol (véase Romanos, M. A., Scorer, C. A., & Clare, J. J. (1992). Yeast, 8, 423-488.) Al inducir mediante metanol, la fracción de proteína soluble total que está compuesta por alcohol oxidasa puede ascender típicamente hasta 30%. Vectores de expresión de *P. pastoris* comúnmente usados comprenden los siguientes elementos: (1) 5'-AOX1 (el promotor de alcohol oxidasa aguas arriba del gen de interés); (2) SIG (una secuencia de señalización de la secreción); (3) MCS (un sitio de clonación múltiple); (4) TT (un sitio de terminación de la transcripción); (5) HIS4 (un marcador para la selección mediante hidroxihistidinasa); (6) Ampr (para la selección con ampicilina); y (7) ColB1 (un elemento de replicación para propagación de plásmidos en *E. coli*) (véase Li, P. Z., Gao, X.-G., Arellano, R. O., & Renugopalakrishnan, V. (2001). Protein Expression and Purification, 22, 369-380.)

Sistemas vectoriales disponibles comercialmente adecuados adicionales para la expresión *P. pastoris* incluyen los vectores pPICZα A, B y C (*Pichia* Expression Kit K1710-01 o EasySelect™ *Pichia* Expression Kit nº K1740-01 adquirido de Invitrogen), que se basan en la selección de la proteína recombinante con Zeocin®.

En un aspecto adicional la presente divulgación se refiere a proteína obtenida mediante el método según la invención. La metodología descrita en la presente da como resultado la producción de una proteína de fitasa de *Serratia odorifera* optimizada codónicamente según la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 2. El producto génico expresado del gen de *Serratia odorifera* diseñado y optimizado corresponde a la proteína madura que carece de los primeros 26 aminoácidos, es decir después de la escisión del péptido de señalización en la célula, que tiene un peso

molecular de alrededor de 45 a 46 kD como se puede observar en el gel de SDS en la Fig. 1, que muestra que a las mismas condiciones de expresión y a la misma carga de muestra, el nivel de expresión del gen de AppAs-r óptima es sustancialmente superior que el del gen de AppAs-r.

5 Como se evidencia mediante el Ejemplo 5 y las Figuras 7 y 8, se encontró sorprendentemente que el uso de la secuencia optimizada codónicamente SEQ ID NO: 1 daba como resultado una expresión mejorada en comparación con la expresión de la correspondiente secuencia de fitasa silvestre según SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 8. En este contexto, el Ejemplo 5 demuestra que la expresión de la correspondiente secuencia de fitasa silvestre no supera 143 unidades/l (U/l) mientras que la fitasa óptima se puede expresar hasta una cantidad de hasta 29973 unidades/l. El
10 Ejemplo 5 demuestra que las mutaciones realizadas en la secuencia óptima, que tiene en cuenta la utilización de codones en la respectiva célula hospedadora de levadura *Pichia Pastoris*, contribuían sustancialmente a una expresión de proteína incrementada y eficaz, en la que se incrementa la cantidad de la proteína expresada y la velocidad de expresión. De ahí que la expresión de la secuencia de fitasa de *Serratia odorifera* optimizada diera como resultado una expresión de proteína sustancialmente mejorada.

15 En realizaciones preferidas específicas, la expresión de la secuencia de ácido nucleico aislada se lleva a cabo en un sistema de expresión de *P. pastoris* según se describe en la presente.

20 En otras realizaciones adicionales de la presente invención, la expresión de proteína se lleva a cabo usando un sistema de expresión metanólico como el descrito ejemplarmente en la presente en el Ejemplo 1 o 5 y la actividad de fitasa se midió en U/l usando el método de molibdato-vanadato en medio ácido (ISO 300024:2009 (E)) según se describe en el Ejemplo 3.

25 En realizaciones preferidas, el método según la invención da como resultado una expresión mejorada, donde la proteína tiene una actividad de fitasa de al menos 250, 500, 750 o al menos 1000 U/l según se determina con los métodos descritos en la presente.

30 En realizaciones preferidas, el método según la invención da como resultado una expresión mejorada, donde la proteína tiene una actividad de fitasa de al menos 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500 o al menos 10000 U/l según se determina con los métodos descritos en la presente. En otras realizaciones preferidas adicionales, el método según la invención da como resultado una expresión mejorada, donde la proteína tiene una actividad de fitasa de al menos 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000, 19000 o al menos 20000 U/l según se determina con los métodos descritos en la presente.

35 Por otro lado, la secuencia de fitasa de *Serratia odorifera* optimizada se analizó con respecto a la actividad de fitasa dependiente de la temperatura, el pH, la presencia de proteasas y el mantenimiento de la fitasa activa a lo largo del tiempo en el Ejemplo 3. Sorprendentemente, los resultados del Ejemplo 3 mostraban que la proteína de fitasa de *Serratia odorifera* optimizada codónicamente obtenida mediante el método según la presente invención daba como
40 resultado una proteína específicamente estable con actividad de fitasa mejorada.

Se divulga en la presente el uso de la proteína producida mediante el método descrito en la presente para la fabricación de aditivos para piensos.

45 La proteína fitasa optimizada expresada mediante los métodos que se describen en la presente tiene las siguientes características:

a) Peso molecular de alrededor de 45 a 47 kDa, preferiblemente alrededor de 46 kDa;

b) óptimo de pH de entre 2,0 y 9, preferiblemente de entre 2,5 y 8, aún más preferiblemente de entre 3,0 y 7, y lo más preferiblemente de 3,3 y 5,8.

50 c) la actividad enzimática es de entre 40 y 55°C, preferiblemente a 50°C;

d) alta actividad específica en más de 500 U/mg, preferiblemente más de 600, 700, 800, 900 o 1000 U/mg, más preferiblemente en alrededor de 1120 +/- 150 U/mg

e) alta resistencia a proteasas, preferiblemente resistencia a pepsina y tripsina

f) punto isoeléctrico en 9,3.

55 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a aditivos para piensos que comprenden la proteína descrita en la presente o que comprende la proteína producida mediante el método descrito en la presente. El aditivo se

puede preparar adecuadamente en base sólida o líquida. Los aditivos pueden comprender además otras preparaciones enzimáticas usadas comúnmente para preparaciones de aditivos sólidas o líquidas, o usadas comúnmente en la preparación de piensos. Los aditivos para piensos pueden comprender una cantidad eficaz de fitasa suficiente para la asimilación y la liberación enzimática de fósforo libre desde el fitato.

5 Ejemplos

Ejemplo 1: Expresión en *Pichia pastoris*

1. Construcción del vector de expresión.

Para aislar el área codificante de la proteína madura se usaron los siguientes oligonucleótidos:

SerrF: GCGCG**GAATTC**GAGCCGCGCTACGTATTGG (SEQ ID NO: 6)

10 SerrR: GCGCG**CAAGCTT**GTCTAGACGTGGCCGGTACTGCACCG (SEQ ID NO: 7)

El área codificante de la proteína madura se amplificó usando los oligonucleótidos SerrF y SerrR. El producto de amplificación se visualizó sobre un gel de agarosa, la banda del tamaño esperado se cortó y el ADN se extrajo del gel usando el NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel).

15 El ADN purificado se insertó en el vector pPICZα A (Invitrogen, San Diego, Calif.) a través de los sitios de restricción de EcoRI y XbaI generados por los oligonucleótidos. El sitio de restricción EcoRI en SerrF y el sitio de restricción XbaI en SerrR se destaca en negrita. La construcción con el ADN purificado insertado se transformó en células DH5α, que posteriormente se sembraron en medio LB que contenía 25 µg/ml de Zeocin. Las colonias positivas se recogieron y los vectores obtenidos se sometieron a secuenciación. El clon positivo con la secuencia correcta se cultivó en grandes cantidades con el objetivo de obtener ADN para la transformación de levaduras.

20

2. Transformación de levaduras y expresión de la proteína

La cepa de *Pichia pastoris* KH71H (Invitrogen) se cultivó sobre medio YPD y se preparó para la transformación. Se linealizaron 10 µg de plásmido pPICZα A AppAs-r mediante la enzima de restricción PmeI y se introdujeron en las células de levadura mediante choque con litio/poliétileno.

25

Las células de levadura transformadas se sembraron sobre medio YPDZ que contenía 100 µg/ml de Zeocin, lo que permitía la selección de colonias que tienen integrado el gen *Sh ble* (producto que confiere resistencia a Zeocin) en el ADN cromosómico del hospedador. Solo los transformantes, que tenían integrado el gen *Sh ble*, eran capaces de crecer sobre el medio YPDZ. Después de dos días, los transformantes se inocularon y se cultivaron sobre medio mínimo que contenía glicerol (BMGY) durante 24 horas y posteriormente las levaduras se recogieron mediante centrifugación (2.500 g, 3 min) y se resuspendieron en un medio con metanol al 0,5% (BMMY) para la inducción de la expresión del gen de fitasa.

30

3. Cuantificación de la actividad de fitasa de los transformantes

Un total de 61 transformantes se analizó y se cuantificó con respecto a la actividad de fitasa usando en método de molibdato-vanadato en medio ácido (ISO 300024:2009 (E)).

35

Se añadieron 1.160 µl de solución de sustrato (fitato sódico 5 mM en tampón de acetato sódico 250 mM, pH 5,5) a 40 µl de solución diluida de la enzima. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron 800 µl de solución de detención (ácido nítrico al 14%; tetrahidrato de heptamolibdato amónico al 3,3%, vanadato al 0,078%) a la solución para finalizar la reacción. Como un control, se añadió solución de detención a la solución diluida de la enzima para la inactivación, que a continuación se añadió la solución de sustrato. Después de 10 minutos, se cuantificó la intensidad del color amarillo a 415 nm y se cuantificaron la actividad de la solución de enzima y la solución de control respectiva. Una unidad de fitasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de fósforo por minuto. Dos días después de la inducción con metanol, 6 de 61 transformantes producían entre 10 y 55 U/ml en medio de cultivo. El gen obtenido es un nuevo gen que codifica un polipéptido con actividad de fitasa. El polipéptido con actividad de fitasa se denominó AppAs-r.

40

45

Ejemplo 2: Purificación de polipéptido de AppAs-r expresado en *Pichia pastoris*

A fin de purificar la fitasa producida en *Pichia pastoris*, los transformantes con una actividad de 55 U/ml se cultivaron e indujeron en condiciones óptimas. Cuatro días después de la inducción con metanol, la actividad de fitasa se midió usando el mismo método que en los ejemplos previos dando como resultado una actividad del sobrenadante de 163 U/l. El sobrenadante se obtuvo mediante centrifugación a 14.100 g durante 5 minutos. Las células precipitadas se descartaron.

El sobrenadante se alcanzó a través de centrifugación con VIVASPIN 20 (50.000 MWCO (Sartorius Studium)). La solución concentrada se dializó posteriormente en un tampón de acetato sódico (0,25 M, pH 5,5). Finalmente, la fitasa se purificó usando filtración en gel (Sephacryl S-200) con el mismo tampón que se usó para la diálisis.

Ejemplo 3: Caracterización de la AppAs-r óptima expresada en *Pichia pastoris*

1. Determinación del peso molecular

El peso molecular de la fitasa AppAs-r óptima se caracterizó usando gel de acrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE). La Figura 1 muestra el resultado de la SDS-PAGE:

- 1) el primer carril corresponde al control (medio de cultivo sin inducción con metanol),
- 2) el segundo carril corresponde a la expresión en medio de cultivo con metanol de fitasa **AppAs-r**,
- 3) el tercer carril corresponde a la expresión en medio de cultivo con metanol de fitasa **AppAs-r óptima** y
- 4) el cuarto carril corresponde al marcador del peso molecular.

Se cargó el mismo volumen de muestra en los carriles 1, 2 y 3.

Como se puede observar a partir de la Figura 1, el peso molecular de AppAs-r óptima es alrededor de 46 KDa, que corresponde al peso molecular estimado de la secuencia polipeptídica derivada de la secuencia de ADN clonada. También se puede observar a partir de SDS-gel que a las mismas condiciones de expresión y a la misma carga de muestra el nivel de expresión del gen de AppAs-r óptima es sustancialmente superior que el del gen de AppAs-r.

2. Determinación de la actividad enzimática de AppAs-r óptima dependiendo de la temperatura

Como se puede observar en la Figura 2, la actividad enzimática cambia con la temperatura. La temperatura óptima se determinó a pH 5,5, que es el pH que era requerido por ISO 300024:2009 (E). La actividad se probó dentro del intervalo de temperatura de entre 35°C y 85°C. La actividad máxima se midió a 50°C. Según se muestra en la Figura 2, después de 10 minutos a 60°C, la enzima todavía retiene un 40% de su actividad.

3. Determinación de la actividad enzimática de AppAs-r óptima dependiendo del pH.

El efecto del pH sobre la actividad de fitasa se probó usando los siguientes tampones: glicina-HCl para pH 1,5-3,5; acetato sódico para pH 3,5-6,0; Tris-HCl para pH 6,0-8,5; glicina-NaOH para pH 8,5-10,0. Todos los tampones contenían 0,05% de IGPAL.

Como se puede observar en la Figura 3, la actividad enzimática cambia con el pH. La actividad máxima se observó a pH 5,0. Una actividad de 70% todavía se mantiene a pH 4,0, mientras que se mantiene más de 80% de actividad a pH 5,5.

4. Efecto de proteasas sobre la actividad enzimática

A fin de determinar la resistencia a proteasas, se incubó AppAs-r óptima purificada (1,6 mg/ml) con 5 mg/ml de pepsina o 50 mg/ml de tripsina a 37°C. Después de la incubación a diferentes tiempos de incubación (5; 10; 15; 30 y 60 minutos) la actividad de fitasa restante se cuantificó en la muestra. Como se puede observar en la Figura 4, una hora después de la incubación con pepsina la fitasa AppAs-r retenía más del 70% (73%) de su actividad inicial y más de 90% (95%) de su actividad inicial una hora después de la incubación con tripsina. Esto indica que la fitasa probada es muy resistente a la actividad de proteasas, lo que puede ser muy beneficioso para el uso en piensos.

5. Mantenimiento de la actividad de fitasa a lo largo del tiempo

Para determinar la actividad de la fitasa AppAs-r a lo largo del tiempo, se determinó la actividad específica por minuto en diferentes puntos temporales después de la adición del sustrato. Como puede derivarse de la Figura 5, AppAs-r difiere de la mayoría de las fitasas en que incrementa su actividad específica a lo largo del tiempo. AppAs-r todavía es al menos 8 horas después de que se añada el sustrato, y dobla su actividad específica inicial después de 4 ½ horas de actividad (Figura 5). Esta actividad incrementada y sostenida a lo largo del tiempo no se ha descrito para ninguna otra. Este es un elemento muy importante debido a que la digestión de los animales habitualmente lleva más de 30 minutos de modo que se requiere que la enzima permanezca activa tanto como sea posible. La actividad incrementada sostenida a lo largo del tiempo también puede ser importante con respecto a piensos líquidos. Así, esto permite la liberación de la mayoría del fósforo presente en forma de fitato en el pienso al usar una menor cantidad de encima.

6. Determinación de la actividad específica

Al fin de determinar la actividad específica, se midió la concentración de la fitasa AppAs-r usando el método de Lowry y la actividad específica se evaluó mediante molibdato-vanadato en ácido a 37°C y pH 4,75. La actividad específica resultante de AppAs-r purificada era $1,123 \pm 112$ U/mg.

Ejemplo 4: Liberación de fosfato de material orgánico procedente del suelo

Debido a la prolongada actividad de la fitasa era importante determinar su capacidad para liberar fósforo inorgánico a partir de material orgánico en el suelo. El resultado de este ensayo se consideraba útil para la preparación de un aditivo para fertilizantes. Para este ensayo, se recogieron 5 muestras de suelo. Se pesaron 2,5 g de cada muestra y se resuspendieron en un tampón de acetato, y se calculó y ajustó una concentración final de 0,25 g de muestra/ml. Las muestras se incubaron durante 20 minutos bajo agitación a temperatura ambiente. Después de una dilución 1/10 de las muestras con tampón de acetato, se añadió el equivalente de 1 U de fitasa AppAs-r/100 g de suelo a 1,2 ml de cada muestra y se incubó durante 24 horas a 25°C. Los resultados muestran que la liberación de fósforo era $53,6 \pm 27,8$ mg de fósforo/100 g de suelo, se incrementaba así el fosfato libre del suelo en $23,4 \pm 18,1\%$.

Ejemplo 5: Expresión comparativa del gen de fitasa silvestre y un gen de fitasa modificado (fitasa óptima)

Los inventores de la presente invención observaron que la expresión del gen de fitasa del gen silvestre de *Serratia odorifera* de longitud completa según se muestra en la Fig. 6A (SEQ ID NO: 2) que incluye el péptido de señalización de 26 AA conduce a una proteína inestable que después de la expresión desaparecía rápidamente. Por lo tanto, los inventores de la presente invención observaron que la omisión del péptido de señalización de 26 AA (SEQ ID NO: 8) daba como resultado una expresión potenciada (véase el Ejemplo 1).

Partiendo de esta observación, el vector pPICZα que contenía la secuencia nucleotídica que codifica la fitasa silvestre de *Serratia odorifera* madura que se describe en el Ejemplo 1 se evaluó adicionalmente en cuanto a cómo se puede modificar adicionalmente la secuencia nucleotídica en cuanto a una expresión mejorada de la proteína de fitasa en la célula hospedadora.

A fin de obtener una secuencia de AppAs-r mejorada, los codones originales se analizaron uno a uno y se cambiaron por el codón más preferido para cada aminoácido en *P. pastoris*. El sesgo de la utilización de codones en *P. pastoris* se describió previamente en Bai y cols. (Bai J., Swartz D.J., Protasevich I.I., Brouillette C.G., Harrell P.M., Hidebrandt E., Gasser B., Mattanovich D., Ward A., Chang G. and Urbatsch I.L. (2011) A gene optimization strategy that enhances production of fully functional P-glycoprotein in *Pichia pastoris*. PLoSOne 6:1-15), Sinclair y cols. (Sinclair G. and Choy F.Y.M. (2002) Synonymous codon usage bias and the expresión of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification 26 :96-105) y Huang y cols. (Huang H, Yang P, Luo H, Tang H, Shao N, y cols. (2008) High-level expresión of a truncated 1,3-1,4-beta-D-glucanase from *Fibrobacter succinogenes* in *Pichia pastoris* by optimization of codons and fermentation. Appl Microbiol Biotechnol. 78: 95-103.).

En SEQ ID NO: 1, se analizaron, identificaron y aplicaron la utilización de codones más frecuente en *P. pastoris*. En SEQ ID NO: 1, se han optimizado los 211 codones de la secuencia codificante silvestre sin la secuencia que codifica la secuencia del péptido de señalización N-terminal (SEQ ID NO: 8). La evaluación que la frecuencia de la utilización de codones descrita en la bibliografía era conservada hasta cierto punto en algunos genes de *P. pastoris* que codifican proteínas con actividad catalítica tales como fosfatasa y cinasas.

El polinucleótido de fitasa modificado que comprende el codón optimizado que se muestra mediante SEQ ID NO: 1 se obtuvo mediante síntesis génica. El polinucleótido de fitasa modificado fue adquirido por GenScript Company

(España) y se insertó en el vector pPICZα A (Invitrogen, San Diego, Calif.) a través de los sitios de restricción de EcoRI y XbaI.

5 El plásmido resultante que contenía el gen de AppAs-rOp se linealizó mediante digestión con la enzima de restricción PmeI y se transformó en las células de levadura mediante choque con litio/polietileno como en el Ejemplo 1.

10 El producto génico expresado del gen de *Serratia odorifera* diseñado y optimizado corresponde a la proteína madura que carece de los primeros 26 aminoácidos, es decir después de la escisión del péptido de señalización en la célula, que tiene un peso molecular de alrededor de 45 a 46 kD como se puede observar en el SDS gel en la Fig. 1.

15 Partiendo del vector pPICZα que contiene la secuencia nucleotídica que codifica la fitasa silvestre de *Serratia odorifera* madura que se describe en el Ejemplo 1, los inventores de la presente invención evaluaron y probaron mutaciones puntuales en esta secuencia nucleotídica que podrían conducir a una expresión mejorada de la proteína de fitasa en la célula hospedadora. Se observó que las 211 mutaciones puntuales que se presentan en la Figura 6B (SEQ ID NO:1) en comparación con la secuencia de fitasa silvestre (SEQ ID NO: 2) contribuían a una expresión eficaz y estable en la levadura *Pichia pastoris*. La Fig. 6C muestra un alineamiento de secuencias de la secuencia de fitasa óptima (SEQ ID NO:1) y la secuencia de fitasa silvestre (SEQ ID NO: 2). Las discordancias indican las mutaciones puntuales realizadas en la secuencia génica original. Las mutaciones puntuales toman los codones usados preferiblemente en la levadura de células hospedadoras *Pichia pastoris*. Como se puede observar a partir de la Fig. 6D, que muestra un alineamiento de la proteína madura traducida de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, las 211 mutaciones son sinónimas, es decir ninguna de las mutaciones conducía a un aminoácido diferente en el polipéptido de la fitasa.

25 A fin de determinar si las mutaciones realizadas en SEQ ID NO: 1 tienen un efecto sobre la expresión de proteína de levadura, la secuencia nucleotídica modificada se expresó bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 1. A fin de determinar los perfiles de expresión, se tomaron muestras en los puntos temporales 0, 19, 31, 43, 55, 67, 79 y 91 horas después de la expresión en metanol. La actividad de fitasa se midió usando el método del molibdato-vanadato en medio ácido (ISO 300024:2009 (E)) según se describe en el Ejemplo 3. AppAs-r del Ejemplo 3 se usó como un ejemplo comparativo.

30 Los resultados se resumen en la Tabla 1. Los datos de este ejemplo comparativo se expresan logarítmicamente en la gráfica según la Figura 7, que muestra la actividad expresada en unidades/l frente al tiempo (h).

35 En la Figura 7, el perfil de expresión de la fitasa AppAS-r silvestre (ejemplo comparativo) se muestra en azul (rombo relleno) y el perfil de expresión de la secuencia óptima se muestra en rojo (cuadrados rellenos). Como se puede observar a partir de la gráfica, la expresión del gen de fitasa silvestre no es óptima. Los primeros productos medibles aparecen después de 40 horas de inducción. Después de 91 horas, la curva de saturación muestra una actividad máxima de 143 U/l. Sorprendentemente, la expresión de la secuencia del gen de fitasa modificado (secuencia óptima) muestra un producto génico de fitasa medible inmediatamente en las primeras horas de expresión de proteína, que alcanza la saturación después de alrededor de 20 a 30 horas de inducción de la expresión génica. Después de 90 horas, la producción de fitasa era mayor de 200 veces. Este incremento en la producción era inesperado.

45 El Ejemplo 5 demuestra así que las mutaciones realizadas en la secuencia óptima, que tiene en cuenta la utilización de codones en la respectiva célula hospedadora de levadura *Pichia Pastoris*, contribuía en efecto a una expresión de proteína incrementada y eficaz.

50 Tabla 1: Perfil de expresión de fitasa silvestre en comparación con fitasa óptima

Tiempo después de la inducción con metanol (horas)	Fitasa silvestre (AppAs-r)							
	0	19	31	43	55	67	79	91
Unidades/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
Unidades/l	1	1	1	1	21	57	68	143

Tiempo después de la inducción (horas)	Fitasa óptima (AppAs-r óptima)							
	0	19	31	43	55	67	79	91
Unidades/ml	0	2	6	15	15	20	28	30
Unidades/l	1	2163	6430	14914	15059	19797	27846	29973

ES 2 725 705 T3

Listado de secuencias

<110> Fertinagro Nutrientes, S.L.

5 <120> NUEVA FITASA, MÉTODO PARA OBTENER LA MISMA Y USO DE LA MISMA

<130> FERNU.0010 WO

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

10 < 211> 1203

< 212> ADN

< 213> Serratia odorifera

<400> 1

```

gagcctagat acgttttggg aaaggtgggt gaggtctctc gacacggcgt tagaccacca      60
acctcaggta acagacaggc tatgcaagcg ggaaccggaa gggagtggcc acaatggctg      120
actcgtgacg gagaactaac tggacacggt tatgcagccg caacacttaa aggaagatac      180
gaagccgatt attatagacg tcagggccta ttggcaaacg gttgtccatc tgctggggct      240
gtttacgtct gggctagtcc tctacaaaga acaagggcca ccgcacaggc tttgatggac      300
gggtgcatctt ccggatgcgg ggtcgccatt catgctgcag ccaactgaaca agatcccttg      360
tttcaagcag ataagatggg tcttgttcca ctcgatgccg aaagggctag aactgcaata      420
aggcaggcaa tgggtggctc agccgagcaa gtgaagacac gttttagtgc tgacattagg      480
cgtctgcaag ctgctgtttg tttgcctcaa caggcttgtc ctgcctttga acaaccttgg      540
gaaattactc aagagcatga cggtagatc agcatcaatg gtctaggaac attgtccaat      600
atggctgaat ctattagact tgcctactct gaaaaccagc caacggctca agtcgcattt      660
ggacacggtg tcaacgcctc cgccgtcgct cctttgttac cactgctaac cgccagatat      720
gactttacca atgatgtgcc ctatatcgct caaagagggtg gctccgttct gttaaaccaa      780
attgctttgg ctcttgccgc agataggact tctgcccggg cgccacctgc tgctcgttgg      840
ttgttatttg tcgctcatga caccaatata gcttatttaa gaactctgct tggtttttct      900
tggcaacagg gactttacc c aagaggtaat attccccctg ctggaagttt ggttttcgaa      960
agatggcgtg atagacaaac aggtcaaagg ttcttacgtc tgtacttcca ggctcaatcg      1020
ttggatcaaa tcagacaggt gtcaccactt tctacattat cccaccttt aaaaaccgag      1080
ttctctcgtc ctggttgacg gcagttgtca cttggcggtc tctgtccctg gactgagtcc      1140
atgcaaagaa tgagagctgc tatcgaccca actgcggttc ctacagtgca gtacagacca      1200
taa                                                                                   1203
    
```

ES 2 725 705 T3

<210> 2

< 211> 1281

< 212> ADN

< 213> *Serratia odorifera*

5 <400> 2

```

atggttgctat tgcaaaagga ctggtcgcgt ctggtatattg ccgtcacgct gggatatgatt      60
tccagcgtag cccaggctga gccgcgctac gtattggaaa aggtgggtga ggtcagccgc      120
cacggcgtac gcccgccgac ctcaggcaac cggcaggcga tgcaggcggg aaccggccga      180
gagtggccac aatggctgac gcgcgacggc gaactcactg gccacggtta tgccgccgcc      240
acgctgaaaag gacgctatga agccgactat tatcgccgtc agggcctatt ggccaacggc      300
tgtccgagcg cgggggcggt gtatgtctgg gccagtcgpc tacagcgcac gcgagccacc      360
gcacaggcgt tgatggacgg cgcatttccc ggctgcgggg tcgccattca tgcggccgcc      420
accgaacagg accccctggt tcaggcagat aaaatgggcc tggtgccgct cgatgccgaa      480
cgggctcgca cggcaataag gcaggcaatg ggcgcgagcg ccgagcaggt gaaaacgcgc      540
tttagcgctg acattcggcg tctgcaagcg gcggtctgcc tgccgcaaca ggcttgcccg      600
gcctttgaac aaccgtggga aatcactcag gagcacgacg gccgcttcag catcaacgggt      660
ctggggacgt tgtccaacat ggcggaaga acgcgctggt cctacagcga aaaccagccg      720
acggcgcagg tcgccttttg ccacgggtgc aacgcacggt ccgtcgcgcc gttgctgccc      780
ctgctcaccg cccgctatga ctttaccaat gacgtgccct atatcgcgca acgcggtggc      840
tcggtgctgt taaaccaa atcgcgctggcg ctggccgccc atcgaacctc tgccggggcg      900
ccaccggcgg cgcgctggtt gctgtttgtc gcgcatgaca ccaatatcgc ttatctgcgc      960
accctgcttg gctttagctg gcaacagggg ctttaccac gcggcaatat tccccggct      1020
ggcagctctg tattcgaacg ctggcgcgat cggcaaacgg gccagcgtt cctgcgtctg      1080
tacttccagg cgcaatcgtt ggatcaaata cgcagttgt caccgctgag cacgctgtcg      1140
ccaccgttaa aaaccgagtt cagccgtcct ggctgccggc agttgtcact gggcgtactc      1200
tgtccctgga ctgagtcgat gcaacggatg cgcgcggcta tcgacccgac ggcgctgcct      1260
acggtgcagt accggccata a                                     1281

```

<210> 3

< 211> 340

< 212> PRT

10 < 213> *Serratia odorifera*

<400> 3

ES 2 725 705 T3

Glu Pro Arg Tyr Val Leu Glu Lys Val Val Glu Val Ser Arg His Gly
 1 5 10 15

Val Arg Pro Pro Thr Ser Gly Asn Arg Gln Ala Met Gln Ala Gly Thr
 20 25 30

Gly Arg Glu Trp Pro Gln Trp Leu Thr Arg Asp Gly Glu Leu Thr Gly
 35 40 45

His Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Leu Lys Gly Arg Tyr Glu Ala Asp Tyr
 50 55 60

Tyr Arg Arg Gln Gly Leu Leu Ala Asn Gly Cys Pro Ser Ala Gly Ala
 65 70 75 80

Val Tyr Val Trp Ala Ser Pro Leu Gln Arg Thr Arg Ala Thr Ala Gln
 85 90 95

Ala Leu Met Asp Gly Ala Phe Pro Gly Cys Gly Val Ala Ile His Ala
 100 105 110

Ala Ala Thr Glu Gln Asp Pro Leu Phe Gln Ala Asp Lys Met Gly Leu
 115 120 125

Val Pro Leu Asp Ala Glu Arg Ala Arg Thr Ala Ile Arg Gln Ala Met
 130 135 140

Gly Gly Ser Ala Glu Gln Val Lys Thr Arg Phe Ser Ala Asp Ile Arg
 145 150 155 160

Arg Leu Gln Ala Ala Val Cys Leu Pro Gln Gln Ala Cys Pro Ala Phe
 165 170 175

Glu Gln Pro Trp Glu Ile Thr Gln Glu His Asp Gly Arg Phe Ser Ile
 180 185 190

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

Tyr Ser Glu Asn Gln Pro Thr Ala Gln Val Ala Phe Gly His Gly Val
 210 215 220

Asn Ala Ser Ala Val Ala Pro Leu Leu Pro Leu Leu Thr Ala Arg Tyr
 225 230 235 240

Trp Gln Gln Gly Leu Tyr Pro Arg Gly Asn Ile Pro Pro Ala Gly Ser
 245 250 255

Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Asp Arg Gln Thr Gly Gln Arg Phe Leu
 260 265 270

Arg Leu Tyr Phe Gln Ala Gln Ser Leu Asp Gln Ile Arg Gln Leu Ser
 275 280 285

ES 2 725 705 T3

Pro Leu Ser Thr Leu Ser Pro Pro Leu Lys Thr Glu Phe Ser Arg Pro
 290 295 300

Gly Cys Arg Gln Leu Ser Leu Gly Val Leu Cys Pro Trp Thr Glu Ser
 305 310 315 320

Met Gln Arg Met Arg Ala Ala Ile Asp Pro Thr Ala Leu Pro Thr Val
 325 330 335

Gln Tyr Arg Pro
 340

<210> 4

< 211> 78

5 < 212> ADN

< 213> Serratia odorifera

<400> 4

atggtgctat tgcaaaagga ctggtcgcgt ctggtatttg ccgtcacgct gggtatgatt 60

tccagcgtag cccaggct 78

<210> 5

10 < 211> 26

< 212> PRT

< 213> Serratia odorifera

<400> 5

Met Leu Leu Leu Gln Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Phe Ala Val Thr
 1 5 10 15

Leu Gly Met Ile Ser Ser Val Ala Gln Ala
 20 25

15 <210> 6

< 211> 31

< 212> ADN

< 213> Serratia odorifera

<400> 6

20 gcgcgcgaat tcgagccgcg ctacgtattg g 31

<210> 7

ES 2 725 705 T3

< 211> 38

< 212> ADN

< 213> Serratia odorifera

<400> 7

5 gcgcgcaagc ttgtctagac gtggccgcta ctgcaccg 38

<210> 8

< 211> 1203

< 212> ADN

< 213> Serratia odorifera

10 <400> 8

gagccgcgct	acgtattgga	aaaggtggtt	gaggtcagcc	gccacggcgt	acgcccgcg	60
acctcaggca	accggcaggc	gatgcaggcg	ggaaccggcc	gagagtggcc	acaatggctg	120
acgcgcgacg	gcgaactcac	tggccacggt	tatgccgccc	ccacgctgaa	aggacgctat	180
gaagccgact	attatcgccc	tcagggccta	ttggccaacg	gctgtccgag	cgcgggggcg	240
gtgtatgtct	gggccagtcc	gctacagcgc	acgcgagcca	ccgcacaggc	gttgatggac	300
ggcgcatttc	ccgctgcg	ggtcgccatt	catgcggccc	ccaccgaaca	ggaccccctg	360
tttcaggcag	ataaaatggg	cctggtgccc	ctcgatgccc	aacgggctcg	cacggcaata	420
aggcaggcaa	tggcggcgag	cgccgagcag	gtgaaaacgc	gctttagcgc	tgacattcgg	480
cgtctgcaag	cgcggtctg	cctgccgcaa	caggcttgcc	cggcctttga	acaaccgtgg	540
gaaatcactc	aggagcacga	cggccgcttc	agcatcaacg	gtctggggac	gttgtccaac	600
atggcggaaa	gcattcgcc	ggcctacagc	gaaaaccagc	cgacggcgca	ggtcgccctt	660
ggccacggtg	tcaacgcata	ggccgtcgcg	ccgttgctgc	ccctgctcac	cgcccgcctat	720
gactttacca	atgacgtgcc	ctatatcgcg	caacgcggtg	gctcgggtgct	gttaaaccaa	780
atcgcgctgg	cgctggccgc	cgatcgaacc	tctgccgggg	cgccaccggc	ggcgcgctgg	840
ttgctgtttg	tcgcgcatga	caccaatata	gcttatctgc	gcaccctgct	tggctttagc	900
tggcaacagg	ggctttacc	acgcggaat	attccccgg	ctggcagctc	ggtattcgaa	960
cgctggcgcg	atcggcaaac	gggcccagcgc	ttcctgcgtc	tgtacttcca	ggcgcaatcg	1020
ctggatcaaa	tccgccagtt	gtcaccgctg	agcacgctgt	cgccaccggt	aaaaaccgag	1080
ttcagccgtc	ctggtgccc	gcagttgtca	ctgggcgtac	tctgtccctg	gactgagtcg	1140
atgcaacgga	tgcgcgcggc	tatcgacccc	acggcgctgc	ctacggtgca	gtaccggcca	1200
taa						1203

REIVINDICACIONES

1. Un molécula de ácido nucleico aislada
- i) que comprende la secuencia nucleotídica según SEQ ID NO: 1 que codifica una proteína con actividad de fitasa o
- 5 ii) que tiene una identidad de secuencia de al menos 86% con una secuencia nucleotídica según SEQ ID NO: 1 que codifica una proteína con actividad de fitasa,
- en donde la molécula de ácido nucleico aislada comprende mutaciones de optimización codónica con respecto a un organismo celular hospedador,
- 10 en donde el organismo celular hospedador es *Pichia pastoris*, y
- en donde la molécula de ácido nucleico difiere de la correspondiente secuencia codificante nucleotídica silvestre según SEQ ID NO: 8 en la presencia de al menos 50 mutaciones de optimización codónica.
- 15 2. La molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 1, en donde la molécula de ácido nucleico no comprende una secuencia nucleotídica que codifica un péptido de señalización N-terminal.
3. La molécula de ácido nucleico aislada según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que al menos 50% de los codones de la correspondiente secuencia de ácido nucleico silvestre están modificados en los codones más favorecidos por el organismo celular hospedador.
- 20 4. La molécula de ácido nucleico aislada según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que todos los codones de la molécula de ácido nucleico aislada están modificados en los codones más favorecidos por el organismo celular hospedador.
- 25 5. La molécula de ácido nucleico aislada según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína con actividad de fitasa según SEQ ID NO: 3.
6. Una construcción de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 conectada operativamente a elementos que regulan la expresión de la secuencia de ácido
- 30 nucleico en una célula hospedadora, en donde el organismo celular hospedador es *Pichia pastoris*.
7. La construcción de expresión según la reivindicación 6, en la que los elementos que regulan la expresión comprenden un promotor funcional en la célula hospedadora y opcionalmente una secuencia de terminación.
- 35 8. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 a 5 o la construcción de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7.
9. Un método para producir una proteína que tiene la actividad enzimática de una fitasa que comprende las etapas de:
- 40 a) introducir en una célula hospedadora un vector que comprende:
- i) elementos que regulan la expresión que son funcionales en la célula hospedadora; y
- ii) conectada operativamente a los mismos una molécula de ácido nucleico como la definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;
- 45 b) cultivar las células hospedadoras obtenidas en la etapa a) bajo condiciones adecuadas para la expresión de la proteína, y opcionalmente
- c) recuperar del cultivo celular la proteína producida en la etapa b),
- en donde el organismo celular hospedador es *Pichia pastoris*.
- 50 10. El método según la reivindicación 9, en el que los elementos que regulan la expresión comprenden un promotor funcional en la célula hospedadora y opcionalmente una secuencia de terminación.

11. El método según la reivindicación 9 o 10, en el que la expresión de la proteína se lleva a cabo usando un sistema de expresión metanólico.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la proteína recuperada en la etapa c) tiene una actividad de fitasa de al menos 1000 unidades/l.
13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que la etapa de recuperación comprende a) separar la proteína secretada del medio y/o b) separar la proteína de la célula hospedadora.

Figura 1

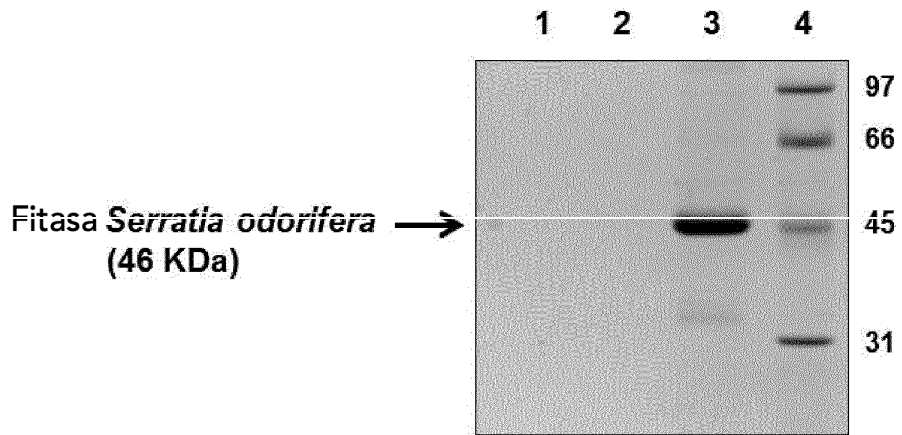


Figura 2

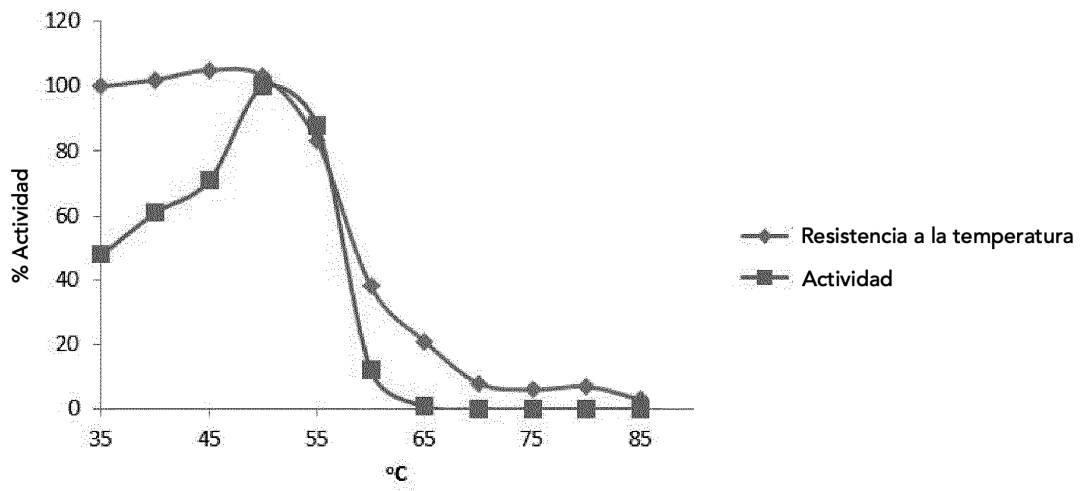


Figura 3

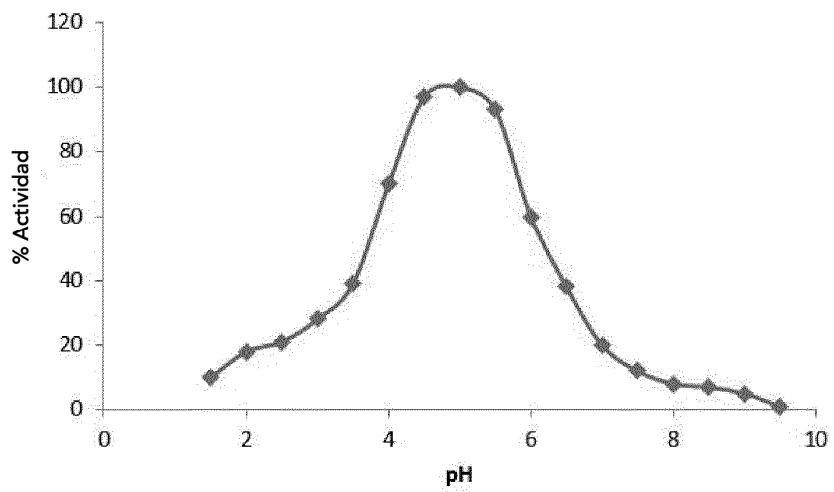


Figura 4

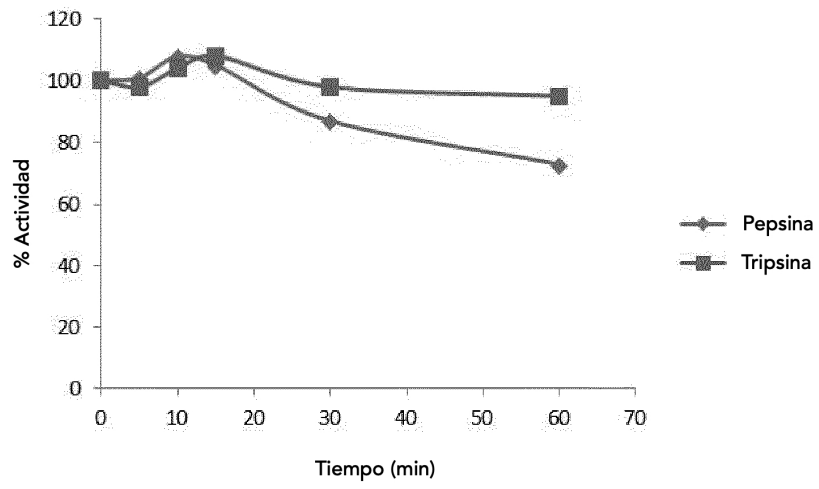


Figura 5

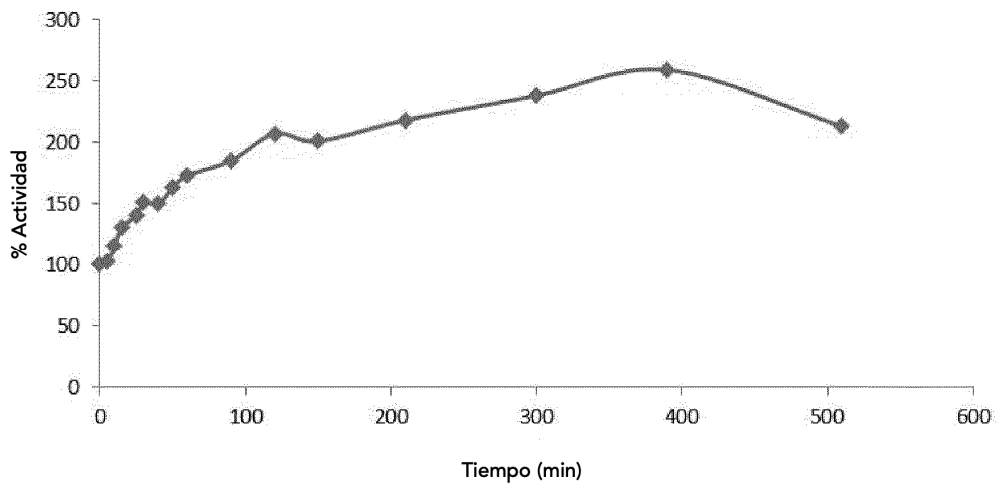


Figura 6

Figura 6A: Secuencia génica de fitasa de *Serratia odorifera* silvestre (SEQ ID NO: 2)

atggttgcctattgcaaaaggaactgggtcgcgctctgttatttgcgctcacgctgggtatgatttccagc
 gttagccaggctgagccgctacgtattggaaaaggtgggttgaggtcagccgccacggcgtacgc
 ccgccgacctcaggcaaccggcaggcgtatgcaggcgggaaccggccgagagtggccacaatggctg
 acgogcgacggcgaactcactggccacgggttatgccgcccacgctgaaaggacgctatgaagcc
 gactattatcgccgtcaggccctattggccaacggctgtccgagcgcggggcggtgtatgtctgg
 gccagtccgctacagcgcacgcgagccaccgcacaggcgttgatggacggcgcatttcccggctgc
 ggggtgcgccattcatgogccgccaccgaaacaggaccctgtttcaggcagataaaaatgggcctg
 gtgccgctcgatgccgaacgggctcgcacggcaataaggcaggcaatgggcggcagcgcggcagcag
 gtgaaaacgcgctttagcgcctgacattcggcgtctgcaagcggcggctctgctgccgcaacaggct
 tggccggcctttgaacaaccgctgggaaatcactcaggagcacgacggccgcttcagcatcaacggct
 ctggggacgcttgtccaacatggcggaaagcattcgcctggcctacagcgaaccagccgacggcg
 caggctcgcctttggccaacgggtgtcaacgcctcggccgtcgcgcccgttgcctgccctgctcaccgcc
 cgctatgactttaccaatgacgtgccctatcgcgcaacgcgggtggctcggctgctgttaaaccaa
 atcgcgctggcgtggccgcgctcgaacctctgccggggcgccaccggcggcgcgctggttgcctg
 tttgtcgcgcatgacaccaatcgccttatctgcccaccctgcttggcttagctggcaacagggg
 ctttaccacgcggcaatattccccggctggcagctctgggtatcgaacgctggcgcgatcggcaa
 aogggccagcgccttccctgctctgacttccaggcgcgaatcgcctggatcaaatccgccagttgtca
 ccgctgagcaccgctgtcgcaccgcttaaaaaccgagttcagccgctcctggctgccggcagttgtca
 ctgggctgactctgctccctggactgagtcgatgcaacggatgcgcgcccgtatcgaccggacggcg
 ctgcctacggtgcagtagccggccataa

Secuencia génica de fitasa de *Serratia odorifera* silvestre sin la secuencia nucleotídica que codifica la secuencia del péptido de señalización N-terminal (SEQ ID NO: 8)

gagccgcgctacgtattggaaaaggtgggttgaggtcagccgccacggcgtacgccgcggacctca
 ggcaaccggcaggcgtatgcaggcgggaaccggccgagagtggccacaatggctgacgcgcgacggc
 gaactcactggccacgggttatgccgcccacgctgaaaggacgctatgaagccgactattatcgc
 cgtcagggcctattggccaacggctgtccgagcgcggggcggtgtatgtctgggccaagtccgcta
 cagcgcacgcgagccaccgcacaggcgttgatggacggcgcatttcccggctgoggggtcgcatt
 catgcccgcgccaccgaaacaggaccctgtttcaggcagataaaaatgggcctggtgccgctcgat
 gccgaacgggctcgcacggcaataaggcaggcaatgggcggcagcgcggcagcaggtgaaaacgcgc
 tttagcgcctgacattcggcgtctgcaagcggcggctctgctgccgcaacaggcttggccggccttt
 gaacaaccgctgggaaatcactcaggagcacgacggccgcttcagcatcaacggctctggggacgctt
 tccaacatggcggaaagcattcgcctggcctacagcgaaccagccgacggcgaggtcgccttt
 ggccaacgggtgtcaacgcctcggccgtcgcgcccgttgcctgccctgctcaccgcccgtatgacttt
 accaatgacgtgccctatcgcgcaacgcgggtggctcggctgctgttaaaccaaatcgcgctggcg
 ctggccgcgctcgaacctctgccggggcgccaccggcggcgcgctggttgcctgtttgtcgcgcat
 gacaccaatcgccttatctgcccaccctgcttggcttagctggcaacaggggctttaccacgc
 ggcaatattccccggctggcagctctgggtattcgaacgctggcgcgatcggcaaacgggcccagcgc
 ttccctgctctgacttccaggcgcgaatcgcctggatcaaatccgccagttgtcaccgctgagcaccg
 ctgtcgcaccgcttaaaaaccgagttcagccgctcctggctgccggcagttgtcactgggctgactc
 tgtccctggactgagtcgatgcaacggatgcgcgcccgtatcgaccggacggcgcctgcctacggtg
 cagtagccggccataa

Figura 6B: Secuencia nucleotídica de fitasa de *Serratia odorifera* optimizada (fitasa óptima) (SEQ ID NO: 1)

Gag cct aga tac gtt ttg gaa aag gtg gtt gag gtc tct cga cac ggc
 gtt aga cca cca acc tca ggt aac aga cag gct atg caa gcg gga acc
 gga agg gag tgg cca caa tgg ctg act cgt gac gga gaa cta act gga
 cac ggt tat gca gcc gca aca ctt aaa gga aga tac gaa gcc gat tat
 tat aga cgt cag ggc cta ttg gca aac ggt tgt cca tct gct ggg gct
 gtt tac gtc tgg gct agt cct cta caa aga aca agg gcc acc gca cag
 gct ttg atg gac ggt gca ttt ccc gga tgc ggg gtc gcc att cat gct
 gca gcc act gaa caa gat ccc ttg ttt caa gca gat aag atg ggt ctt
 gtt cca ctc gat gcc gaa agg gct aga act gca ata agg cag gca atg
 ggt ggc tca gcc gag caa gtg aag aca cgt ttt agt gct gac att agg
 cgt ctg caa gct gct gtt tgt ttg cct caa cag gct tgt cct gcc ttt
 gaa caa cct tgg gaa att act caa gag cat gac ggt aga ttc agc atc
 aat ggt cta gga aca ttg tcc aat atg gct gaa tct att aga ctt gcc
 tac tct gaa aac cag cca acg gct caa gtc gca ttt gga cac ggt gtc
 aac gca tcc gcc gtc gct cct ttg tta cca ctg cta acc gcc aga tat
 gac ttt acc aat gat gtg ccc tat atc gct caa aga ggt ggc tcc gtt
 ctg tta aac caa att gct ttg gct ctt gcc gca gat agg act tct gcc
 ggg gcg cca cct gct gct cgt tgg ttg tta ttt gtc gct cat gac acc
 aat atc gct tat tta aga act ctg ctt ggt ttt tct tgg caa cag gga
 ctt tac cca aga ggt aat att ccc cct gct gga agt ttg gtt ttc gaa
 aga tgg cgt gat aga caa aca ggt caa agg ttc tta cgt ctg tac ttc
 cag gct caa tcg ttg gat caa atc aga cag ttg tca cca ctt tct aca
 tta tcc cca cct tta aaa acc gag ttc tct cgt cct ggt tgc agg cag
 ttg tca ctt ggc gtt ctc tgt ccc tgg act gag tcc atg caa aga atg
 aga gct gct atc gac cca act gcg ttg cct aca gtg cag tac aga cca
 taa

Figura 6C: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fitasa optimizada (SEQ ID NO: 3)

EPRYVLEKVVVEVSRHGVRPPTSGNRQAMQAGTGREWPQWLTRDGELTGHGYAAATLK
 GRYEADY YRRQGLLANGCP SAGAVYVWASPLQRTTRATAQALMDGAFPGCGVAIHAAA
 TEQDPLFQADKMGLVPLDAERARTAIRQAMGGSAEQVKTRF SADIRRLQAAVCLPQQ
 ACPAFEQPWEITQEHDGRFS INGLGTLNMAESIRLAYSENQPTAQVAFGHGVNAS
 VAPLLPLLTARYWQQGLYPRGNIPPAGSLVFERWRDRQTGQRFRLRYFQAQSLDQIR
 QLSPLSTLSPPLKTEFSRPGCRQLSLGVLCPWTESMORMRAAIDPTALPTVQYRP

Figura 6D: Comparación de secuencias de aminoácidos entre la secuencia traducida de la Fig 6A y la secuencia traducida de la Fig 6B

> ref | ZP_06638020.1 | 3-fitasa [Serratia odorifera DSM 4582]
 gb | EFE96977.1 | 3-fitasa [Serratia odorifera DSM 4582]
 Longitud=426

Puntuación = 792 bits (2046), Esperado = 0,0, Método: Ajuste de matriz de composición.
 Identities = 400/400 (100%), Positivos = 400/400 (100%), Huecos = 0/400 (0%)
 Marco = +1

Interr.	1	EPRYVLEKVVVEVSRHGVRPPTSGNRQAMQAGTGREWPQWLTRDGELTGHGYAAATLKGRY	180
		EPRYVLEKVVVEVSRHGVRPPTSGNRQAMQAGTGREWPQWLTRDGELTGHGYAAATLKGRY	
Suj.	27	EPRYVLEKVVVEVSRHGVRPPTSGNRQAMQAGTGREWPQWLTRDGELTGHGYAAATLKGRY	86
Interr.	181	EADY YRRQGLLANGCP SAGAVYVWASPLQRTTRATAQALMDGAFPGCGVAIHAAATEQDPL	360
		EADY YRRQGLLANGCP SAGAVYVWASPLQRTTRATAQALMDGAFPGCGVAIHAAATEQDPL	
Suj.	87	EADY YRRQGLLANGCP SAGAVYVWASPLQRTTRATAQALMDGAFPGCGVAIHAAATEQDPL	146
Interr.	361	FQADKMGLVPLDAERARTAIRQAMGGSAEQVKTRF SADIRRLQAAVCLPQQACPAFEQPW	540
		FQADKMGLVPLDAERARTAIRQAMGGSAEQVKTRF SADIRRLQAAVCLPQQACPAFEQPW	
Suj.	147	FQADKMGLVPLDAERARTAIRQAMGGSAEQVKTRF SADIRRLQAAVCLPQQACPAFEQPW	206
Interr.	541	EITQEHDGRFS INGLGTLNMAESIRLAYSENQPTAQVAFGHGVNASAVAPLLPLLTARY	720
		EITQEHDGRFS INGLGTLNMAESIRLAYSENQPTAQVAFGHGVNASAVAPLLPLLTARY	
Suj.	207	EITQEHDGRFS INGLGTLNMAESIRLAYSENQPTAQVAFGHGVNASAVAPLLPLLTARY	266
Interr.	721	DFTNDVPYIAQRGGSVLLNQIALALAADRTSAGAPPAARWLLFVAHDTNIAYLRTLLGFS	900
		DFTNDVPYIAQRGGSVLLNQIALALAADRTSAGAPPAARWLLFVAHDTNIAYLRTLLGFS	
Suj.	267	DFTNDVPYIAQRGGSVLLNQIALALAADRTSAGAPPAARWLLFVAHDTNIAYLRTLLGFS	326
Interr.	901	WQQGLYPRGNIPPAGSLVFERWRDRQTGQRFRLRYFQAQSLDQIRQLSPLSTLSPPLKTE	1080
		WQQGLYPRGNIPPAGSLVFERWRDRQTGQRFRLRYFQAQSLDQIRQLSPLSTLSPPLKTE	
Suj.	327	WQQGLYPRGNIPPAGSLVFERWRDRQTGQRFRLRYFQAQSLDQIRQLSPLSTLSPPLKTE	386
Interr.	1081	FSRPGCRQLSLGVLCPWTESMORMRAAIDPTALPTVQYRP	1200
		FSRPGCRQLSLGVLCPWTESMORMRAAIDPTALPTVQYRP	
Suj.	387	FSRPGCRQLSLGVLCPWTESMORMRAAIDPTALPTVQYRP	426

ES 2 725 705 T3

Figura 6E: comparación de nucleótidos de la secuencia génica de la Fig 6A (SEQ ID NO: 8, secuencia superior) y la secuencia génica de la Fig 6B (SEQ ID NO: 1, secuencia inferior).

Longitud=1203

Puntuación = 1218 bits (1350), Esperado = 0,0
 Identidades = 992/1203 (82%), Huecos = 0/1230 (0%)
 Cadena=Más/Más

Interr.	1	GAGCCGCGCTACGTATTGGAAAAGGTGGTTGAGGTCTCAGCCGCCACGGCGTACGCCCGCCG	60
Suj.	1	GAGCCTAGATACGTTTGGAAAAGGTGGTTGAGGTCTCTCGACACGGCGTTAGACCACCA	60
Interr.	61	ACCTCAGGCAACCCGGCAGGCGATGCAGGCGGGAACCGGCCGAGAGTGGCCACAATGGCTG	120
Suj.	61	ACCTCAGGTAACAGACAGGCTATGCAAGCGGGAACCGGAAGGGAGTGGCCACAATGGCTG	120
Interr.	121	ACGCGCGACGGCGAACTCACTGGCCACGGTTATGCCGCCGCCACGCTGAAAGGACGCTAT	180
Suj.	121	ACTCGTGACGGAGAATAACTGGACACGGTTATGCAGCCGCAACACTTAAAGGAAGATAC	180
Interr.	181	GAAGCCGACTATTATCGCCGTCAGGGCCTATTGGCCAACGGCTGTCGAGCGCGGGGCG	240
Suj.	181	GAAGCCGATTATTATAGACGTCAGGGCCTATTGGCAAACGGTTGTCCATCTGCTGGGGCT	240
Interr.	241	GTGTATGTCTGGGCCAGTCCGCTACAGCGCACGGAGCCACCGCACAGGCGTTGATGGAC	300
Suj.	241	GTTTACGTCTGGGCTAGTCTCTACAAAGAACAAGGGCCACCGCACAGGCTTTGATGGAC	300
Interr.	301	GGCGCATTTCCCGGCTCGGGGTCGCCATTTCATGCGGCCGCCACCGAACAGGACCCCTG	360
Suj.	301	GGTGCATTTCCCGGATGCGGGGTCGCCATTTCATGCTGCAGCCACTGAACAAGATCCCTG	360
Interr.	361	TTTCAGGCAGATAAAATGGGCCTGGTGCCGCTCGATGCCGAACGGGCTCGCACGGCAATA	420
Suj.	361	TTTCAAGCAGATAAGATGGGTCTTGTTCCTACTCGATGCCGAAAGGGCTAGAACTGCAATA	420
Interr.	421	AGGCAGGCAATGGGCGGCAGCGCCGAGCAGGTGAAAACGGCTTTAGCGCTGACATTCCG	480
Suj.	421	AGGCAGGCAATGGGTGGCTCAGCCGAGCAAGTGAAGACACGTTTGTAGTCTGACATTAGG	480
Interr.	481	CGTCTGCAAGCGGGCTCTGCCTGCCGCAACAGGCTTGCCCGGCTTTGAACAACCGTGG	540
Suj.	481	CGTCTGCAAGCTGCTGTTTGTCTTGCCTCAACAGGCTTGTCTGCTTTGAACAACCTGG	540
Interr.	541	GAAATCACTCAGGACACGACGGCCGCTTTCAGCATCAACGGTCTGGGACGTTGTCCAAC	600
Suj.	541	GAAATTACTCAAGAGCATGACGGTAGATTTCAGCATCAATGGTCTAGGAACATTGTCCAAT	600
Interr.	601	ATGGCGGAAAGCATTTCGCTGCGCTACAGCGAAAACCGCGGCGGCGAGGTCGCCTTT	660
Suj.	601	ATGGCTGAATCTATTAGACTTGCCTACTCTGAAAACCGCAACGGCTCAAGTGCATT	660
Interr.	661	GGCCACGGTGTCAACGCATCGGCCGTCGCGCCGTTGCTGCCCTGCTCACCGCCGCTAT	720
Suj.	661	GGACACGGTGTCAACGCATCCGCCGTCGCTCCTTTGTTACCACTGCTAACCGCCAGATAT	720
Interr.	721	GACTTTACCAATGACGTGCCCTATATCGCGCAACCGGTTGGCTCGGTGCTGTTAAACCAA	780
Suj.	721	GACTTTACCAATGATGTGCCCTATATCGCTCAAAGAGGTGGCTCCGTTCTGTTAAACCAA	780
Interr.	781	ATCGCGCTGGCGCTGGCCCGGATCGAACCTCTGCCGGGGCGCCACCGCGGCGCGCTGG	840
Suj.	781	ATTGCTTTGGCTCTTGCCGAGATAGGACTTCTGCCGGGGCGCCACCTGCTGCTCGTTGG	840
Interr.	841	TTGCTGTTTGTGCGGCATGACACCAATATCGCTTATCTGCGCACCCCTGCTTGGCTTTAGC	900
Suj.	841	TTGTTATTTGTGCTCATGACACCAATATCGCTTATTTAAGAACTCTGCTTGGTTTTTCT	900

ES 2 725 705 T3

```

Interr. 901  TGGCAACAGGGGCTTTACCCACGCGGCAATATTCCCCGGCTGGCAGTCTGGTATTCGAA 960
              |||
Suj.      901  TGGCAACAGGGACTTTACCCAAGAGGTAATATTCCCCCTGCTGGAAGTTTGGTTTTTCGAA 960

Interr. 961  CGCTGGCGCGATCGGCCAAACGGGCCAGCGCTTCCTGCGTCTGTACTTCCAGGCGCAATCG 1020
              |
Suj.      961  AGATGGCGTGATAGACAAACAGGTCAAAGGTTCTTACGTCTGTACTTCCAGGCTCAATCG 1020

Interr. 1021 CTGGATCAAATCCGCCAGTTGTCACCGCTGAGCACGCTGTCGCCACCGTTAAAAACCGAG 1080
           |||
Suj.      1021 TTGGATCAAATCAGACAGTTGTCACCACTTTCTACATTATCCCCACCTTTAAAAACCGAG 1080

Interr. 1081 TTCAGCCGTCCTGGCTGCCGGCAGTTGTCACTGGGCGTACTCTGTCCCTGGACTGAGTCG 1140
           |||
Suj.      1081 TTCTCTCGTCCTGGTTGCAGGCAGTTGTCACTTGGCGTTCTCTGTCCCTGGACTGAGTCC 1140

Interr. 1141 ATGCAACGGATGCGCGCGGCTATCGACCCGACGGCGCTGCCTACGGTGCAGTACCGGCCA 1200
           |||
Suj.      1141 ATGCAAAGAATGAGAGCTGCTATCGACCCAACGCGTTGCCTACAGTGCAGTACAGACCA 1200

Interr. 1201  TAA  1203
           |||
Suj.      1201  TAA  1203
    
```

Figura 7

Ejemplo 5

	Fitasa silvestre (AppAs-r)							
Tiempo después de la inducción (horas)	0	19	31	43	55	67	79	91
Unidades/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
Unidades/l	1	1	1	1	21	57	68	143

	Fitasa óptima (AppAs-r óptima)							
Tiempo después de la inducción (horas)	0	19	31	43	55	67	79	91
Unidades/ml	0	2	6	15	15	20	28	30
Unidades/l	1	2163	6430	14914	15059	19797	27846	29973

Figura 8

