

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
17 de noviembre de 2011 (17.11.2011)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/141613 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 14/435 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2011/070587

(22) Fecha de presentación internacional:
8 de agosto de 2011 (08.08.2011)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **FERTINAGRO NUTRIENTES, S.L.** [ES/ES]; Polígono Industrial La Paz parcelas 185-188, E-44195 Teruel (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **ALIGUE ALEMANY, Rosa** [ES/ES]; Polígono Industrial La Paz parcelas 185-188, E-44195 Teruel (ES). **ATARES REAL, Sergio** [ES/ES]; Polígono Industrial La Paz parcelas 185-188, E-44195 Teruel (ES). **MARQUES MASCARELL, Ramon** [ES/ES]; Polígono Industrial La Paz parcelas 185-188, E-44195 Teruel (ES). **MARTIN PEREZ, Julia** [ES/ES]; Polígono Industrial La Paz parcelas 185-188, E-44195 Teruel (ES). **ROMERO LOPEZ, Joaquin** [ES/ES]; Polígono Industrial La Paz parcelas 185-188, E-44195 Teruel (ES). **SALAET MADORRAN, Ignacio** [ES/ES]; Polígono Industrial La Paz parcelas 185-188, E-44195 Teruel (ES).

(74) Mandatario: **MATO ADROVER, Angel Luis**; Caleruega, 12 1° C, E-28033 Madrid (ES).

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

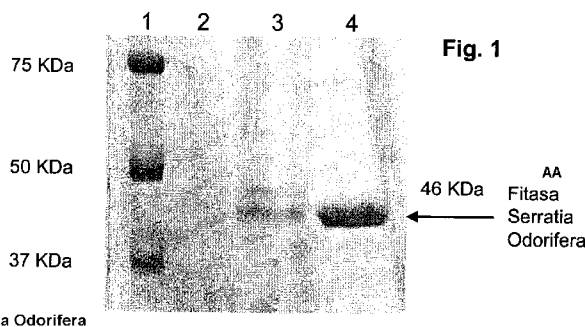
(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- a pedido del solicitante, antes de la expiración del plazo a que se refiere en el Artículo 21.2(a)
- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: NOVEL PHYTASE, METHOD FOR OBTAINING SAME AND USE THEREOF

(54) Título : NUEVA FITASA, PROCEDIMIENTO DE OBTENCION Y UTILIZACION DE LA MISMA



(57) Abstract: The invention relates to an isolated *Serratia odorifera* gene encoding a protein or polypeptide with phytase activity, to a method for obtaining same in a host yeast cell, such as *Pichia pastoris*, and to the use of the enzyme as an active ingredient in the production of additives for animal feed and/or for the release of phosphate from organic matter from the soil.

(57) Resumen: La invención se refiere a un gen aislado de *Serratia odorifera* que codifica una proteína o polipéptido con actividad fitasa, a un método para su obtención en una célula huésped de levadura tal como, por ejemplo *Pichia pastoris*, y a la utilización de la enzima como ingrediente activo en la fabricación de aditivos para piensos destinados a la nutrición animal y/o para la liberación de fosfato de materia orgánica procedente del suelo.



WO 2011/141613 A2

NUEVA FITASA, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y UTILIZACIÓN DE LA MISMA

La presente invención se refiere a un nuevo gen de fitasa, a la enzima
5 fitasa codificada por dicho gen, a un método para obtener la enzima en una célula hospedadora de levadura y a la utilización de la enzima como ingrediente activo en la fabricación de aditivos para piensos destinados a la nutrición animal y/o para la liberación de fosfato de materia orgánica procedente del suelo.

Más en particular, la invención se refiere a un gen aislado de *Serratia*
10 *odorifera* que codifica una proteína o polipéptido con actividad fitasa, a un método para su obtención en una célula huésped de levadura tal como, por ejemplo *Pichia pastoris*, y a la utilización de la enzima como ingrediente activo en la fabricación de aditivos para piensos destinados a la nutrición animal.

El fósforo elemental o puro (P) es raro en la naturaleza, siendo habitual
15 encontrarlo formando parte de moléculas que incluyen el grupo fosfato (PO_4^{3-}) unido a grupo orgánico basado en carbono en los tejidos de animales y plantas.

El fósforo es un nutriente esencial para plantas y animales. Debido a la falta de fósforo inorgánico del suelo (la única forma en que es absorbido por las plantas), los agricultores se ven obligados a realizar aportes de fósforo, parte del
20 cual será fijado por las plantas convirtiéndose en fósforo orgánico, permaneciendo no obstante cierta proporción en el suelo. Los animales también necesitan fósforo en forma inorgánica, que lo obtienen del fósforo inorgánico aportado directamente en la dieta y de la degradación del fósforo orgánico presente en los diversos ingredientes que componen dicha dieta.

25 El ácido fítico o fitato es la forma principal de almacenamiento de fósforo en cereales, legumbres, semillas oleaginosas, con valores comprendidos entre 1-5% del peso. Mas de los dos tercios del fósforo contenido en los cereales y leguminosas está en forma de fitato, además del fósforo, también otros cationes como calcio, magnesio, hierro, zinc, también proteínas y aminoácidos están
30 secuestrados por los fitatos.

Sin embargo, los animales monogástricos (cerdos y aves) son incapaces de absorber el fósforo en forma de fitato, ya que carecen de las enzimas necesarias para digerirlo, conocidas como fitasas. Esto representa que entre un 20% y 40% del fósforo de origen vegetal ingerido por monogástricos, no es
5 asimilado, siendo excretado a través de las heces con los consiguientes problemas ecológicos. Esta contaminación por fósforo es un problema que va teniendo cada vez mayor importancia, en las zonas donde se practica la ganadería intensiva de monogástricos.

Además, aunque algunos de los microorganismos presentes en la flora
10 intestinal del intestino delgado tienen la capacidad de hidrolizar el ácido fítico, debido a su localización en el intestino, el fósforo se absorbe en muy pequeña cantidad. Por otro lado, un exceso de fitato actúa como un factor antinutricional al quelar iones metálicos necesarios para el animal tales como el calcio, el cobre y el zinc, disminuyendo su disponibilidad nutricional.

Estos hechos hacen que sea común enriquecer el alimento de estos
15 animales con fósforo inorgánico, lo cual incrementa en gran medida los costes de producción ganadera, además de aportarse un fósforo no asimilado extra al suelo a través del abonado con estiércol, lo que rompe el equilibrio natural de este elemento, produciendo la eutrofización de las aguas superficiales y la
20 contaminación de acuíferos.

Hace unos años y tras numerosas investigaciones se consiguió aportar al estado de la técnica una posible solución a estos problemas, o al menos minimizarlos, proporcionándose la primera fitasa, una enzima que hidroliza el fitato y libera fósforo orgánico, y que, añadida al alimento, hace el fósforo más
25 accesible.

A este respecto, las fitasas son meso-inositol hexafosfato fosfohidrolasas y catalizan la escisión de los grupos fosfato del ácido fítico (IP6) o del fitato, dando como resultado un grupo fosfato libre y un éster de inositol fosfato inferior (IP5-IP1). Las fitasas se pueden dividir en 2 grupos: fitasas microbianas
30 o fúngicas (E.C. 3.1.3.8) o 3-fitasa, que empiezan a hidrolizar el grupo fosfato situado en el C1 o C3 del anillo inositol o fitasas de plantas (E.C. 3.1.3.26) o 6-

fitasa, que empiezan a hidrolizar preferentemente el grupo fosfato situado en el C6 del anillo inositol.

Tal como se cita en el artículo de Carmen Frontela y col., "Empleo de fitasas como ingrediente funcional en alimentos", (Carmen Frontela, Gaspar Ros, Carmen Martínez, Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, Murcia, España, 2008) a fin de conseguir una completa degradación del contenido en ácido fítico durante el procesado de los alimentos, y de este modo incrementar la disponibilidad mineral, son numerosas las investigaciones que apuntan al empleo de fitasas de origen exógeno como estrategia.

Así, es de gran importancia conocer las condiciones óptimas de actividad de la fitasa empleada, teniendo en cuenta que estas condiciones dependen del tipo de cereal con el que se está trabajando. La mayoría de las fitasas procedentes de cereales presentan un pH óptimo de actividad entre 4,5-5,6, mientras que las procedentes de leguminosas, presentan un pH óptimo en valores de 7 o superiores. No obstante, existen evidencias que ponen de manifiesto que el empleo de fitasas procedentes de microorganismos como es el caso de hongos del género *Aspergillus spp.* son el método más sencillo y eficaz de conseguir la completa eliminación del ácido fítico produciendo un importante incremento en la absorción de hierro, lo cual podría suponer que el empleo de estas enzimas de origen microbiano durante el procesado de los alimentos, podría ser en un futuro cercano factible de ser empleado en la industria alimentaria a fin de incrementar la disponibilidad mineral de los alimentos producidos.

El uso de fitasa de origen microbiano está actualmente autorizado para su empleo en alimentación animal, y está encaminado a incrementar la disponibilidad del fósforo del ácido fítico reduciendo la excreción fecal del mismo al ambiente. En el caso del preparado enzimático de 6-fitasa producido por *Aspergillus oryzae* (DSM 14223), éste fue autorizado para los pollos de engorde, las gallinas ponedoras, los pavos de engorde, los lechones, los cerdos de engorde y las cerdas por el Reglamento (CE) nº 255/2005 de la Comisión

Europea, y actualmente se han presentado nuevos datos en apoyo a una solicitud para ampliar la autorización del uso de este preparado enzimático a los salmónidos.

Las fitasas son extremadamente débiles, expresando su máxima actividad a pH que varían entre 5,0 y 7,5, por lo que, los bajos valores de pH presentes en el estomago (pH 2-3) limitan su actividad, con alguna actividad a un pH menor de 3,0, por lo que hay una ruptura considerable de la molécula de fitato de la dieta, en el buche de los pollos y en el estomago de los no rumiantes, antes de que la secreción gástrica reduzca el pH de la ingesta a un nivel demasiado bajo como para interrumpir la actividad enzimática (Simons y col., 1992). Además, la enzima tiende a ser fuertemente inhibida por exceso de sustrato (fitato) y producto (fósforo inorgánico), y por altas temperaturas (Power y Khon, 1993).

Las fitasas sintéticas, que hidrolizan el ácido fítico, al igual que las intrínsecas de los vegetales, son fosfomonoesterasas capaces de hidrolizar el ácido fítico produciendo ortofosfatos inorgánicos y una pequeña proporción de esteres fosfóricos, pentafofato a monofosfato, como productos intermedios, y finalmente mioinositol libre (Nayini y Markakis, 1986; Lasztity y Lasztity, 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; Lasztity y Lasztity, 1988).

Se han encontrado fitasas exógenas en microorganismos como hongos (*Saccharomyces cerevisiae*, especies de *Aspergillus sp*), levaduras y bacterias (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*). La fitasa obtenida de *Aspergillus sp* sigue un cierto orden para la hidrólisis de la molécula de fitato, es decir, después de ser liberado el grupo fosfato de la posición 3, continúa en el siguiente orden, 4, 5, 6 y 2 (Venekamp y col., 1995).

Las enzimas presentan actividad a dos pH diferentes, 2,5 y 5,5, siendo 40% menos efectiva al primer pH. Esto es de gran importancia debido a que la mayor absorción de fósforo ocurre en las proximidades del intestino delgado, donde el pH de 5,5 es óptimo para que la fitasa actúe hidrolizando los fosfatos,

siendo primero necesario que la enzima se active en el medio ácido del estomago (pH 2,5) (Power y Khon, 1993).

La fitasa producida por el *Aspergillus ficuumm*, es una glicoproteína purificada, con una actividad enzimática que varía con la temperatura y cambios
5 de pH. La temperatura óptima de la enzima es de 60 a 70°C. Sin embargo, temperaturas de 68°C, durante 10 minutos, provocan pérdidas del 60% de actividad (Nasi, 1990). Las enzimas obtenidas del *Aspergillus niger* son termoestables, resistente al proceso de pelletización y su actividad es de un mínimo de 5000 FTU/g. (Nasi, 1990).

10 Existen evidencias de que las fitasas pueden incrementar significativamente, la utilización de fósforo fítico (Qian y col., 1997; Yi y col., 1996a,b; Carlos y col., 1998; Maenz y Classen, 1998; Pan y col., 1998; Denbow y col., 1998).

Así, Denbow y col. (1998) establecen que la incorporación de fitasas
15 (400, 800, o 1.200 U/kg) a una dieta basal baja en fósforo, incrementó linealmente la ganancia de peso, el contenido de cenizas del dedo y la resistencia a la ruptura de las tibias de aves y mejoró, además, la digestibilidad del fósforo (Nelson y col., 1971; Denbow y col., 1995; Kornegay y col., 1996; Yi y col., 1996). Estos experimentos establecen que cerca de 821 U/kg de fitasa son
20 requeridas para reemplazar 1 g de fosfato inorgánico como fosfato desfluorinado, en términos de ganancia de peso y porcentaje de cenizas.

Simons y col. (1990), adicionando fitasa (750 U/kg) en una dieta maíz-soja para pollos, aumentaron la disponibilidad de fósforo y calcio a 62% y disminuyeron la excreción de fósforo vía fecal y urinaria (2,0 g/kg MS). Por otra
25 parte, Perney (1991), utilizando pollos de engorde alimentados con una dieta basal a base de maíz-soya, con 0,38% de fósforo disponible, con la adición de 500 U/kg de fitasa, obtuvieron mejoras en la resistencia a la ruptura de la tibia, sin cambios significativos en el consumo y ganancia de peso de los animales. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Edwards (1993), quien
30 observó poco beneficio debido a los bajos niveles de adición de la fitasa a dietas deficientes de fósforo.

La solicitud de patente americana US 2010/0092613, "Cloning and expression of a novel phytase", se refiere a una fitasa obtenida a partir un microorganismo del género *Yersinia* con un peso molecular de 45,5 kDa, un pH óptimo de 4-5, una temperatura óptima de 50-60°C, un punto isoeléctrico de 7,7
5 y una actividad específica de 3.000 U/mg.

La ES 2255281, "Sobreexpresión de genes de fitasa en sistemas de levadura", se refiere a un método de producción de fitasa en levadura que comprende proporcionar un gen appA aislado a partir de células bacterianas, codificando dicho gen appA una proteína o polipéptido con actividad fitasa,
10 expresar dicho gen appA en una cepa de levadura y aislar la proteína o polipéptido expresado, en el que dicha proteína o polipéptido tiene una termoestabilidad aumentada en comparación con la de dicha proteína o polipéptido expresado en una célula hospedadora no de levadura, así como a una proteína o polipéptido obtenible mediante dicho método y que tiene
15 actividad fitasa, con una actividad óptima en el intervalo de temperatura de 57-65°C a un pH de 2,5 a 3,5 o de 5,5.

Por todo lo anterior, sería deseable proporcionar una nueva fitasa cuyo uso no conllevara las desventajas de las fitasas conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo aquellas relacionadas con:

- 20 • La diferencia de pH entre el estómago (pH 3,5) y del tracto intestinal (pH 7,0), que hacen que la enzima no pueda tener una buena actividad con un rango de pH tan amplio;
- La termo-estabilidad también juega un papel importante, ya que los piensos compuestos en la fase de granulación (formación del pellet)
25 sufren un choque térmico del orden de 70°C que desnaturaliza la enzima;
- Las proteasas del tracto digestivo catabolizan gran parte de la enzima;

Y que, por ende, permitiera conseguir resultados más eficientes al mantenerse activa a lo largo de todo el tracto digestivo, en el estómago, donde el pH es demasiado bajo para la actividad de la mayoría de las fitasas, y
30 manteniendo su actividad en el intestino delgado, donde el pH es próximo a 7.

En las figuras adjuntas:

Fig. 1: Determinación del peso molecular de la proteína con actividad fitasa.

Fig. 2: Determinación de la actividad enzimática de la proteína con actividad fitasa en función de la temperatura.

Fig. 3: Determinación de la actividad enzimática de la proteína con actividad fitasa en función del pH.

Fig. 4: Efecto de las proteasas en la actividad enzimática.

Fig. 5: Mantenimiento de la actividad fitasa en el tiempo.

10

Por tanto, según un aspecto de la invención, se proporciona un gen aislado de *Serratia odorifera* que codifica una proteína o un polipéptido con actividad fitasa. Es también objeto de la invención la proteína o el polipéptido codificado por dicho gen de *Serratia odorifera* con actividad fitasa expresado en una cepa de levadura hospedadora, preferentemente *Pichia pastoris*, donde la proteína o el polipéptido tiene propiedades alostéricas que doblan su actividad enzimática (medida según ISO30024:2009 (E)) a las cuatro horas de entrar en contacto con el sustrato y permaneciendo activa durante más de ocho horas.

Así, la presente invención proporciona un gen que codifica una proteína o un polipéptido con actividad fitasa, siendo su secuencia de nucleótidos la mostrada en la SEQ ID No 2, o un derivado de la misma.

En otro aspecto, la invención proporciona una proteína o un polipéptido con actividad fitasa con las siguientes características: a) Peso molecular teórico de 46 kDa; b) rango de pH óptimo de 3,5 a 5,8; c) temperatura de actividad óptima en el rango de 45-55°C; d) Alta actividad específica de 1120 ± 150 U/mg, en particular de 1.123 ± 112 U/mg; e) alta resistencia a la pepsina y la tripsina, y f) punto isoelectrico PI=6,1, donde la proteína con actividad fitasa se selecciona de entre:

- i) un polipéptido con actividad fitasa que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID No 3 o un derivado de la misma por sustitución, delección o inserción de uno o más residuos aminoácidos, o.
- ii) un polipéptido con actividad fitasa que es codificado por un polinucleótido de SEQ ID No 2 o un polipéptido con actividad fitasa que presenta una homología de secuencia de al menos un 60% con la SEQ ID No 2, preferentemente al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%, con especial preferencia al menos un 95%.

Esta fitasa se obtiene a partir de un microorganismo del género *Serratia*, preferentemente de *Serratia odorifera*.

Igualmente, según otro aspecto de la invención, es otro objeto de la misma la utilización de la proteína codificada por dicho gen de *Serratia odorifera* con actividad fitasa expresado en una cepa de levadura como huésped, como ingrediente activo, en la fabricación de aditivos para piensos destinados a la nutrición animal.

De acuerdo con el primer aspecto de la invención, se proporciona un gen aislado de *Serratia odorifera* según la SEQ ID No 2 que codifica una proteína o un polipéptido con actividad fitasa, teniendo la proteína las siguientes características:

- a) Peso molecular teórico de 47 kDa;
- b) Rango de pH óptimo de 3,5 a 5,8; preferentemente de 3,7 a 5,8;
- c) Temperatura de actividad óptima en el rango de 45-55°C, preferentemente a 50°C;
- d) Alta actividad específica de 1120 ± 150 U/mg;
- e) Alta resistencia a la pepsina y la tripsina; y
- f) Punto isoeléctrico de 6,1.

La proteína o el polipéptido de la invención codificado por dicho gen de *Serratia odorifera* con actividad fitasa se expresa en una cepa de levadura hospedadora, preferentemente *Pichia pastoris*. Así, en otro aspecto de la invención, ésta se refiere a un vector recombinante que comprende el gen de *Serratia odorifera* que codifica la proteína o el polipéptido con actividad fitasa, una célula hospedadora recombinante, tal como *Pichia pastoris* en la que se ha introducido dicho vector, así como un método para expresar la enzima en una célula huésped.

En el presente contexto, por "polipéptido con actividad fitasa que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID No 3 o un derivado de la misma por sustitución, delección o inserción de uno o más residuos aminoácidos" se entienden, por ejemplo en el caso de las sustituciones, sustituciones conservativas de aminoácidos bien conocidas por el experto en la materia y que no modifican la actividad fitasa, siendo igualmente aplicable a las delecciones o inserciones. Es de conocimiento general del experto en la materia que, durante la clonación de genes, se designan sitios de reconocimiento que podrían resultar en uno o más residuos aminoácidos no relacionados en los extremos de la proteína diana, sin que por ello se vea afectada la actividad fitasa. Es igualmente sabido que con el fin de construir una proteína de fusión, mejorar la expresión de una proteína recombinante, obtener una proteína recombinante secretada por la célula huésped o facilitar la purificación de la proteína recombinante, en el N-terminus o en el C-terminus, o en otras regiones adecuadas de las proteínas, se suelen introducir péptidos de unión, péptidos señal, péptidos líder, extensiones terminales o similares.

Igualmente la invención proporciona un polipéptido con actividad fitasa que es codificado por un polinucleótido de SEQ ID No 2 o un polipéptido con actividad fitasa que presenta una homología de secuencia de al menos un 60% con la SEQ ID No 2, preferentemente al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%, con especial preferencia al menos un 95%. A este respecto, se entenderá que la invención además incluye moléculas de ácido nucleico que difieren en alguno de los nucleótidos mostrados en la SEQ ID No 2 debido a

la degeneración del código genético, siempre que codifiquen la misma proteína fitasa.

En la presente invención, el término "vector" se refiere a un ácido nucleico que es capaz de transportar otro ácido nucleico al cual está unido, pudiendo ser,
5 por ejemplo, un plásmido o un vector viral.

Así, los vectores recombinantes de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión en una célula huésped, lo que significa que los vectores recombinantes de la invención incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas de acuerdo con la
10 célula hospedadora a emplear para la expresión, unidas operativamente a la secuencia a expresar; esto es, la secuencia de nucleótidos de interés se une a la secuencia reguladora de forma que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos. A este respecto, se entiende que la secuencia reguladora puede incluir promotores, sitios de activación, terminadores, etc. conocidos por el
15 experto en la materia.

El vector puede introducirse en la célula huésped mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Métodos de este tipo para transformar o transfectar células hospedadores se pueden encontrar, por ejemplo, en Sambrook y col., Molecular cloning: A laboratory Manual, 2ª Ed.,
20 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

En la presente invención, la célula huésped se emplea para producir una proteína con actividad fitasa. Por tanto, la invención proporciona un método para producir una proteína con actividad fitasa tal como se ha descrito anteriormente empleando una célula huésped de levadura, preferentemente de *Pichia pastoris*,
25 que comprende el gen de *Serratia odorifera*, el cual codifica una proteína con actividad fitasa, donde el método incluye cultivar la célula huésped en la cual se ha introducido el vector de expresión que codifica la proteína con actividad fitasa, en un medio adecuado para la producción de la proteína y posterior separación de las proteínas del medio, si son secretadas, o de la célula
30 huésped.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, es otro objeto de la misma la utilización de la proteína codificada por dicho gen de *Serratia odorifera* con actividad fitasa expresado en una cepa de levadura como huésped, como ingrediente activo, en una cantidad efectiva, en la fabricación de aditivos para
5 piensos destinados a la nutrición animal, y también el aditivo así obtenido.

El aditivo de la invención puede prepararse adecuadamente en forma sólida o líquida y opcionalmente puede incluir otras preparaciones enzimáticas correspondientemente adecuadas a la preparación sólida o líquida, siendo adecuado para su utilización en la preparación de piensos u otros alimentos
10 destinados a la nutrición animal, ya que contiene una cantidad efectiva de fitasa que favorece la asimilación del fósforo e incrementa la absorción de metales y proteínas al liberarlos del fitato.

Ejemplos

Ejemplo 1: Expresión en *Pichia pastoris*

15 Construcción del vector de expresión

Para aislar la región codificante de la proteína madura se sintetizaron los oligonucleótidos:

SerrF: GCGCGCGAATTCGAGCCGCGCTACGTATTGG

SerrR: GCGCGCAAGCTTGTCTAGACGTGGCCGGTACTGCACCG

20 La región codificante de la proteína madura se amplificó usando los oligonucleótidos serrF y SerrR. El producto de amplificación fue visualizado en un gel de agarosa, la banda del tamaño esperado fue recortada y el ADN fue extraído del gel mediante el kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel).

El ADN purificado fue insertado dentro del vector pPICZα A (Invitrogen,
25 San Diego, Calif.) entre los sitios de restricción delimitados por las secuencias de EcoRI y XbaI. La construcción fue transformada en células DH5α que fueron posteriormente plaqueadas en medio LB que contenía 25 µg/ml de Zeocin. Las colonias positivas fueron secuenciadas. Una de las colonias con la secuencia

correcta se cultivo en grandes cantidades con el objetivo de obtener ADN para transformar las levaduras.

Transformación de las levaduras y expresión de la proteína

- 5 Se hizo crecer la cepa de *Pichia pastoris* KH71H (Invitrogen) en medio YPD y se preparó para la transformación. 10 µg de plásmido pPICZα A AppAs-r fue linealizado mediante la enzima de restricción PmeI e introducido en las levaduras mediante shock con Litio/Polietilenglicol.

- Las células transformadas fueron plaqueadas en medio YPDZ (contiene
10 100 µg/ml de Zeocin) que permite seleccionar las colonias que han integrado el gen Sh ble (el producto de este gen confiere resistencia al Zeocin) en el ADN cromosómico del huésped. Los transformantes que hayan integrado el gen Sh ble crecerán correctamente en el medio YPDZ. Después de 2 días, los transformantes fueron inoculados en medio mínimo con glicerol (BMGY) durante
15 24 horas, después las levaduras fueron recuperadas mediante centrifugación (2.500g, 3 min) y resuspendidas en un medio con 0,5% de metanol (BMMY) para inducir la expresión del gen de la fitasa.

Cuantificación de la actividad fitasa de los transformantes

- Un total de 61 transformantes fueron analizados para cuantificar la
20 actividad fitasa mediante el método molibdato-vanadato en medio ácido (establecido en la ISO 300024:2009 (E)).

- Se añadieron 1.160 µl de solución sustrato (5mM fitato de sodio en un tampón 250 mM de acetato de sodio, pH 5,5) a 40 µl de una solución diluida de la enzima. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos. Después se
25 añadieron a la reacción 800 µl de solución STOP (14% ácido nítrico; 3,3% heptamolibdato amónico tetrahidratado, 0,078% vanadato) para parar la reacción. Como control, se añadió la solución STOP a la solución diluida de la enzima para inactivarla y después se añadió la solución sustrato. Tras 10 minutos, se cuantificó la intensidad de color amarillo a 415 nm y se calculó la
30 actividad en solución de la enzima y de la solución control. Una unidad de

actividad fitasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de fósforo en un minuto. Dos días después de la inducción por metanol, 6 transformantes de 61 produjeron entre 10 y 55 U/ml de medio de cultivo. Obviamente, el gen obtenido es un nuevo gen que codifica para un polipéptido con actividad fitasa. El polipéptido con actividad fitasa se denominó AppAs-r.

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

Con el objetivo de purificar la fitasa producida por *Pichia pastoris*, el transformante con una actividad de 55 U/ml fue cultivado e inducido en condiciones óptimas. Cuatro días después de la inducción con metanol se midió la actividad fitasa mediante el mismo método utilizado en el ejemplo anterior, dando como resultado una actividad de 163 U/ml en el sobrenadante. El sobrenadante se obtuvo mediante centrifugación a 14.100 g durante 5 minutos. El precipitado de células fue descartado.

El sobrenadante fue concentrado mediante centrifugación con VIVASPIN 20 (50.000 MWC O (Sartorius Studium)). Seguidamente la solución concentrada fue dializada en tampón de acetato de sodio (0,25 M, pH 5,5). Finalmente la fitasa fue purificada mediante gel filtración (Sephacryl S-200) con el mismo tampón usado en la diálisis.

Ejemplo 3: Características de AppAs-r expresado en *Pichia pastoris*

20 *Determinación del peso molecular*

El peso molecular de la fitasa AppAs-r se caracterizó mediante un gel desnaturalizante de acrilamida (SDS-PAGE). En la Fig. 1, la línea 1 se corresponde con el marcador de peso molecular; la línea 2 se refiere al control de medio de cultivo sin inducir con metanol; la línea 3 al medio de cultivo inducido con metanol; y la línea 4 a la fitasa concentrada dializada y purificada.

Como se muestra en la Figura 1, el peso molecular de AppAs-r es de aproximadamente 46 kDa, que es el peso estimado a partir de la secuencia de polipéptidos derivada de la secuencia de ADN clonada.

Determinación de la actividad enzimática de AppAs-r con la temperatura

Tal como se observa en la Fig. 2, la actividad cambia con la temperatura. La temperatura óptima se determinó a un pH 5,5, ya que es el pH que exige la ISO 300024:2009 (E). Se testó un rango de temperaturas entre 35°C y 80°C. La máxima actividad se registro a 50°C. Como se muestra en la Fig. 2, después de 10 minutos a 60°C la enzima retiene el 40% de su actividad.

Determinación de la actividad enzimática de AppAs-r dependiente del pH

El efecto del pH sobre la actividad fitasa fue comprobado utilizando los siguiente tampones: Glicina-HCl para pH 1,5-3,5; acetato de sodio 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% IGPAL. Como se observa en la Fig. 3, la actividad enzimática varia con el pH. La máxima actividad se observo a un pH 4,75. Un 70% de la actividad se mantiene a un pH de 3,75, mientras que más del 80% de la actividad se mantiene a pH 5,5.

Efecto de las proteasas en la actividad enzimática

Para determinar la resistencia a las proteasas, la AppAs-r purificada (1,6 mg/ml) fue incubada con 5 mg/ml de pepsina o con 50 mg/ml de tripsina a 37°C. Después de la incubación a diferentes tiempos (3; 5; 10; 15; 30 y 60 minutos) se cuantificó la actividad fitasa remanente en las muestras. Como se puede observar en la Fig. 4, después de 1 hora de incubación con pepsina la fitasa AppAs-r retiene más del 70% de su actividad inicial, mientras que retiene más del 90% de su actividad inicial después de 1 h de incubación con tripsina. Así, esta fitasa es altamente resistente a la acción de las proteasas, hecho que es muy beneficioso para su utilización en alimentación animal.

Mantenimiento de la actividad fitasa con el tiempo

Para determinar la cinética de actividad en el tiempo de la fitasa AppAs-r se midió la actividad específica por minuto a diferentes tiempos después de incorporar el sustrato. Como se observa en la Fig. 5A, a diferencia de la mayoría de fitasas, AppAs-r va aumentando su actividad específica a lo largo del tiempo. Como se muestra en la Fig. 5B, AppAs-r está activa durante al menos 8 horas desde el momento en que se añade el sustrato, llegando a doblar su actividad

específica inicial después de 4 horas y media de actividad. Esta actividad creciente y sostenida en el tiempo no se ha descrito en ninguna otra fitasa y es un punto muy importante puesto que la digestión animal dura más de 30 minutos y es importante que la enzima esté activa durante el máximo de tiempo posible.

- 5 Esta actividad creciente y sostenida en el tiempo puede ser muy relevante también en la alimentación líquida. Esto permitiría liberar la mayoría del fósforo presente como fitato en los piensos con una cantidad de enzima mucho menor.

Determinación de la actividad específica

- 10 Con el fin de determinar la actividad específica, se valoró la concentración de la fitasa AppAs-r concentrada y purificada mediante el método de Lowry y se estudió la actividad específica mediante el método molibdato-vanadato ácido a 37°C y pH 4,75. Como resultado, la actividad específica de AppAs-r purificada fue de 1.123 ± 112 U/mg.

Ejemplo 4: Liberación de fosfato de materia orgánica procedente del suelo

- 15 Debido a la larga vida activa de la fitasa y con la intención de conocer su capacidad para liberar fósforo inorgánico del material orgánico procedente del suelo, siendo el fin de este ensayo estudiar su utilización en la preparación de un aditivo para fertilizantes, se recogieron 5 catas de suelo. Se pesaron 2,5 g de cada una y se resuspendieron en un tampón acetato, calculando una
20 concentración final de 0,25 g muestra/ml. Se incubó durante 20 minutos bajo agitación a temperatura ambiente. Después, se llevó a cabo una dilución 1/10 de las muestras en el tampón acetato. Se añadieron a 1,2 ml de cada muestra diluida el equivalente a 1 U de fitasa AppAs-r/100g suelo y se incubó durante 24 h a 25°C. Como resultado, la liberación de fósforo fue de $53,6 \pm 27,8$ mg de
25 fósforo/ 100 g de suelo, incrementando el fosfato libre del suelo en un $23,4 \pm 18,1\%$.

REIVINDICACIONES

1. Proteína con actividad fitasa con las siguientes características:
 - a) Peso molecular teórico de 46 kDa;
 - 5 b) Rango de pH óptimo de 3,5 a 5,8;
 - c) Temperatura de actividad óptima en el rango de 45-55°C;
 - d) Alta actividad específica de 1120 ± 150 U/mg;
 - e) Alta resistencia a la pepsina y la tripsina; y
 - f) Punto isoelectrico de 6,1.
- 10 2. Proteína con actividad fitasa según la reivindicación 1, caracterizada porque el rango de pH óptimo es de 3,7 a 5,8, la temperatura óptima es de 50°C y la actividad específica es de 1.123 ± 112 U/mg.
3. Proteína con actividad fitasa según las reivindicaciones 1-2, caracterizada porque se selecciona de entre:
 - 15 i) un polipéptido con actividad fitasa que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID No 3 o un derivado de la misma por sustitución, delección o inserción de uno o más residuos aminoácidos, o
 - 20 ii) un polipéptido con actividad fitasa que es codificado por un polinucleótido de SEQ ID No 2 o un polipéptido con actividad fitasa que presenta una homología de secuencia de al menos un 60% con la SEQ ID No 2, preferentemente al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%, con especial preferencia al menos un 95%.

4. Proteína según la reivindicación 1, caracterizada porque es codificada por un gen de *Serratia odorifera* de SEQ ID No 2 y expresada en una cepa de levadura.
5. Proteína según la reivindicación 4, caracterizada porque la cepa de levadura es *Pichia pastoris*.
6. Vector recombinante que comprende el gen de *Serratia odorifera* que codifica la proteína con actividad fitasa según la reivindicación 1 y una célula hospedadora recombinante *Pichia pastoris* en la que se ha introducido dicho vector.
- 10 7. Procedimiento para la producción de una proteína con actividad fitasa que comprende el cultivo de la célula huésped *Pichia pastoris* en la que se ha introducido el vector según la reivindicación 6.
8. Utilización de la proteína según la reivindicación 1 codificada por el gen de *Serratia odorifera* con actividad fitasa expresado en una cepa de levadura como huésped, como ingrediente activo, en una cantidad efectiva, en la fabricación de aditivos para piensos destinados a la nutrición animal.
- 15 9. Aditivo para la alimentación animal que incluye una cantidad efectiva de una proteína según la reivindicación 1.
- 20 10. Aditivo según la reivindicación 9, caracterizado porque se prepara adecuadamente en forma sólida o líquida y porque puede incluir otras preparaciones enzimáticas correspondientemente adecuadas a la forma sólida o líquida.
11. Aditivo para fertilizantes que incluye una cantidad efectiva de una proteína según la reivindicación 1.
- 25

1 / 3

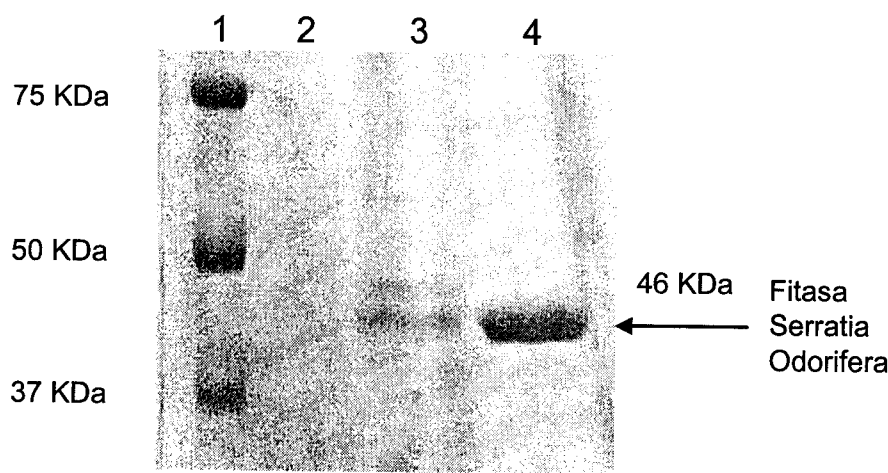


Fig. 1

5

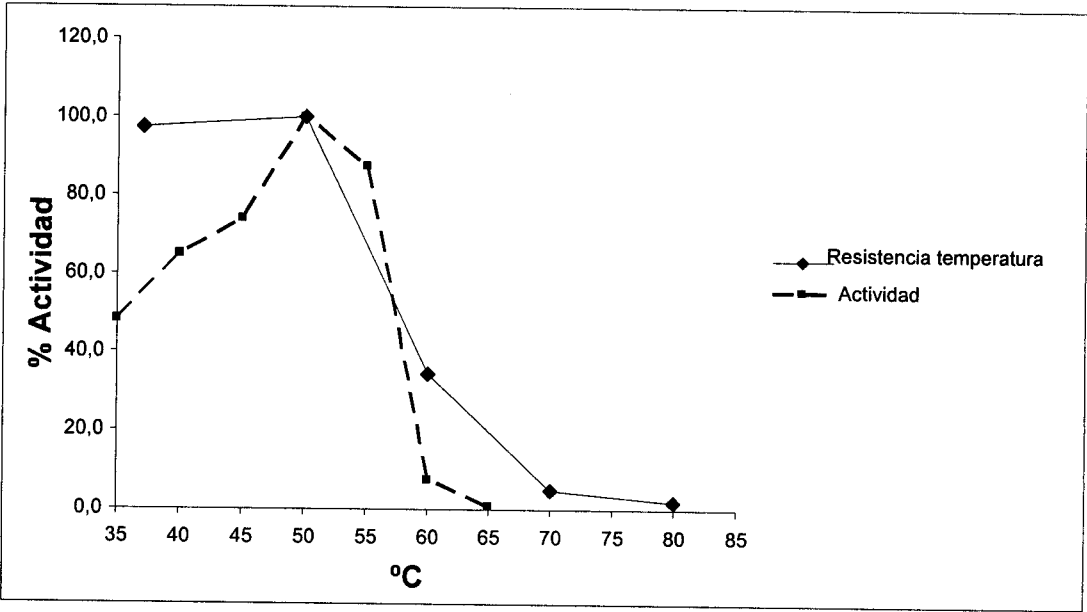


Fig. 2

2 / 3

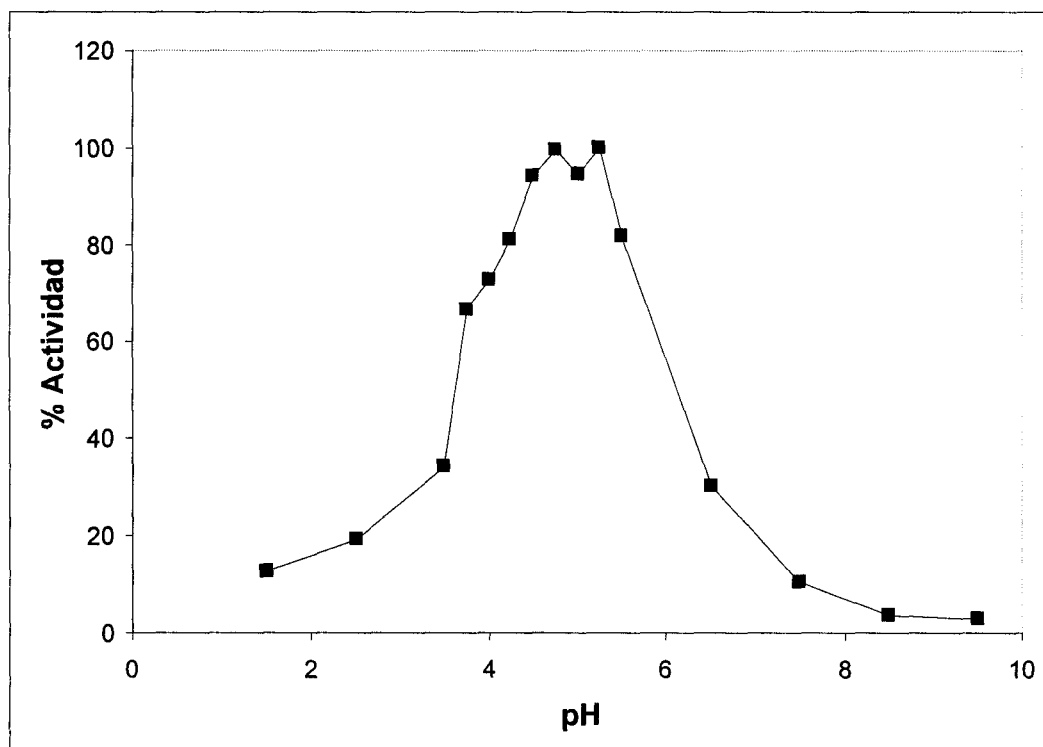


Fig. 3

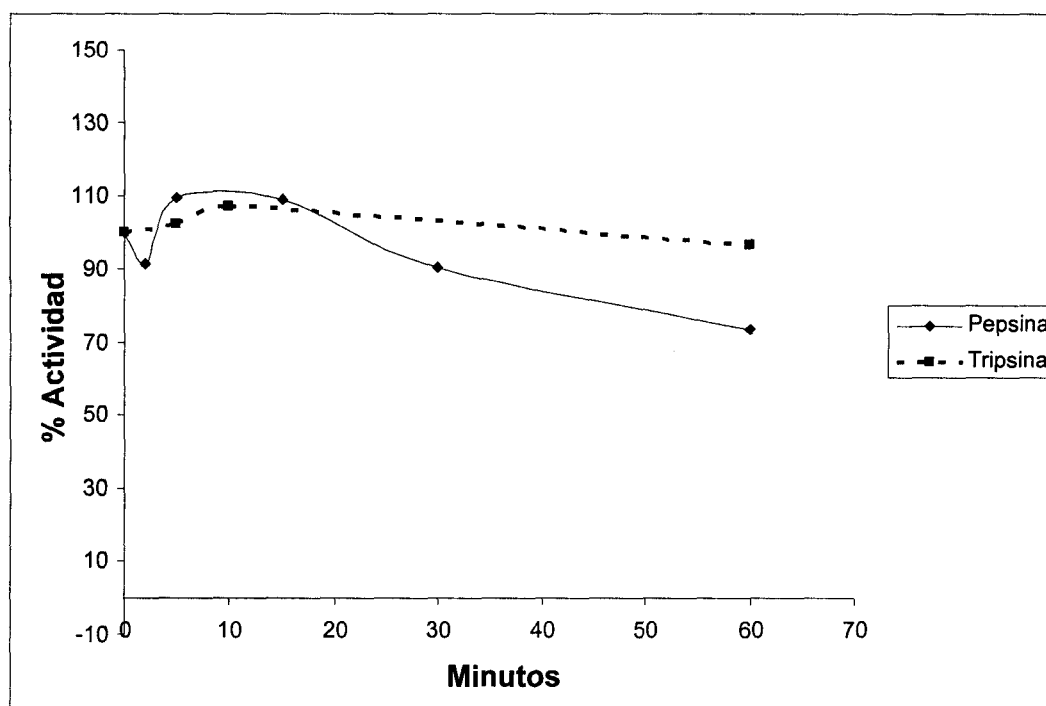
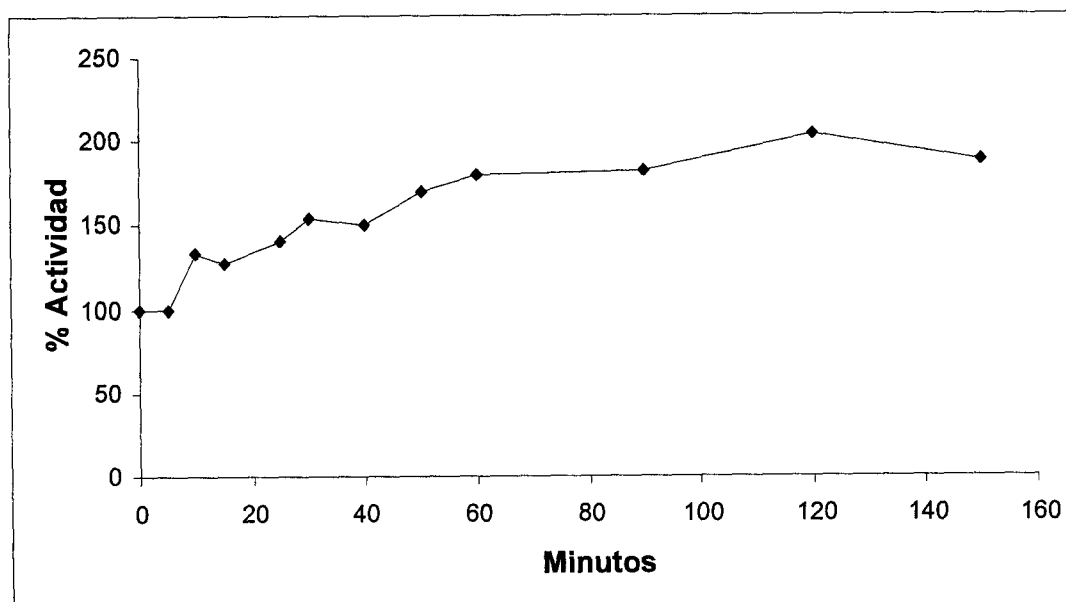
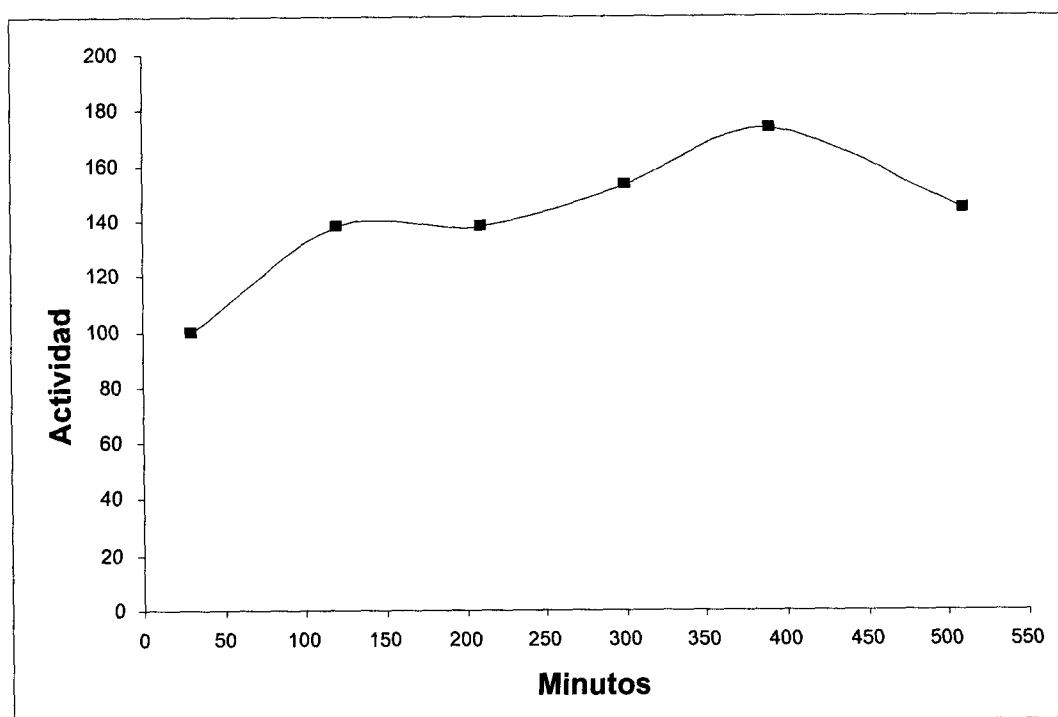


Fig. 4

3 / 3

A**B****Fig. 5**