



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1006620-9 B1



(22) Data do Depósito: 23/04/2010

(45) Data de Concessão: 13/10/2021

(54) Título: SUPLEMENTO ALIMENTAR, ALIMENTO PARA ANIMAIS, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE UM ALIMENTO PARA ANIMAIS E DE PRODUÇÃO DE UM SUPLEMENTO ALIMENTAR E USO DE UM SUPLEMENTO ALIMENTAR

(51) Int.Cl.: A23K 1/165; C12N 9/16; C12N 9/20.

(30) Prioridade Unionista: 10/03/2010 US 61/312,413; 20/05/2009 GB 0908770.1; 23/12/2009 GB 0922467.6; 24/04/2009 US 61/172,272.

(73) Titular(es): DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS.

(72) Inventor(es): MAI FAURSCOU ISAKSEN; CHERRY LIN; LUIS FERNANDO ROMERO MILLAN; MASOUD RAJABI ZARGAHI; MICHAEL WARD; PETER PLUMSTEAD; RIKKE HØEGH LORENTSEN; SUSAN M. MADRID.

(86) Pedido PCT: PCT IB2010051804 de 23/04/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/122532 de 28/10/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/10/2011

(57) Resumo: SUPLEMENTO ALIMENTAR, ALIMENTO PARA ANIMAIS, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE UM ALIMENTO PARA ANIMAIS, DE SUPLEMENTO ALIMENTAR, PARA AUMENTAR A DISPONIBILIDADE DE PELO MENOS UM DOS NUTRIENTES DA DIETA, PARA AUMENTAR A TAXA DE CRESCIMENTO DE UM ANIMAL E USO DE UM SUPLEMENTO ALIMENTAR A presente invenção refere-se a um suplemento alimentar compreendendo uma fitase e uma enzima lipolítica, em que a dita enzima lipolítica tem atividade lipase em um pH na faixa de cerca de pH 1,5 a cerca de pH 3,5.

“SUPLEMENTO ALIMENTAR, ALIMENTO PARA ANIMAIS, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE UM ALIMENTO PARA ANIMAIS E DE PRODUÇÃO DE UM SUPLEMENTO ALIMENTAR E USO DE UM SUPLEMENTO ALIMENTAR”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção está relacionada a suplementos alimentares. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a suplementos alimentares compreendendo fitases e enzimas lipolíticas, que podem ser usados para melhorar a digestão dos alimentos para animais, e para alimentos para animais compreendendo suplementos alimentares.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] O fitato é a principal forma de armazenamento de fósforo em cereais e leguminosas. No entanto, os animais monogástricos, tal como suínos, aves e peixes, não são capazes de metabolizar ou absorver o fitato (ou ácido fítico) que, portanto, é excretado, levando a poluição por fósforo em áreas de intensa produção pecuária. Além disso, o ácido fítico também atua como um agente antinutricional em animais monogástricos por agentes quelantes de metais como o cálcio, cobre e zinco.

[003] A fim de fornecer fosfatos suficientes para o crescimento e saúde destes animais, é adicionado fosfato inorgânico a suas dietas. Essa adição pode ser cara e aumentar ainda mais os problemas de poluição.

[004] Por meio da ação da fitase, o fitato é geralmente hidrolisado para formar fosfatos de inositol menores e fosfato inorgânico. As fitases são úteis como aditivos nos alimentos para animais onde elas melhoraram a disponibilidade de fósforo orgânico para o animal e diminuem a poluição do meio ambiente pelo fosfato (Wodzinski RJ, Ullah AH. *Adv Appl Microbiol.* 42, 263-302 (1996)).

[005] Também foi demonstrado que a adição de fitase na alimentação de frangos de corte aumenta a energia metabolizável aparente

(AME), e a disponibilidade de nitrogênio e aminoácidos (Ravindran, V. *et al*, *Brit. Poultry Sci.* 41, 193-200 (2000)).

[006] Diversas fitases de origem fúngica foram descritas na literatura (Wyss M. *et al. Appl. Environ. Microbiol.* 65 (2), 367-373 (1999); Berka R.M. *et al. Appl. Environ. Microbiol.* 64 (11), 4423-4427 (1998); Lassen S. *et al. Appl. Environ. Microbiol.* 67 (10), 4701-4707 (2001)) e bactérias (Greiner R. *et al Arch. Biochem. Biophys.* 303 (1), 107-113 (1993); Kerovuo *et al. Appl. Environ. Microbiol.* 64 (6), 2079-2085 (1998); Kim H.W. *et al. Biotechnol. Lett.* 25, 1231-1234 (2003); Greiner R. *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 341 (2), 201-206 (1997); Yoon S.J. *et al. Enzyme and microbial technol.* 18, 449-454 (1996); Zinin N.V. *et al. FEMS Microbiol. Lett.* 236, 283-290 (2004)).

[007] No entanto, as fitases de origem fúngica tendem a ser proteoliticamente instáveis (Igbasan FA *et al. Arch. Anim. Nutr.* 53,353-373 (2000)) e, portanto, suscetíveis à degradação, enquanto algumas fitases bacterianas possuem uma especificidade estreita de substratos para o fitato sozinho e degradam mal inositol fosfatos com graus de fosforilação intermediários (Greiner R. *et al, Arch Biochem Biophys* 303 (1), 107-113 (1993); Kerovuo J *et al, Biochem J.* 352, 623-628 (2000)).

[008] Além disso, sabe-se que a interação do cálcio com o fitato para formar complexos Ca-fitato é prejudicial para a atividade da fitase (Selle, PH *et al., Livestock Science.* 124, 126-141 (2009)). Foi hipotetizado que o cálcio nestes complexos 'Ca-fitato' torna o fitato inacessível para a fitase ou compete com os fitatos não complexados pelo sítio ativo da enzima (Long, C., *Phytase, Biochemists Handbook*, Princeton, NY, Van Nostrand-Reinhold (1961); Wise, A., *Nutrition Abstracts & Reviews*, 53, 791-806 (1983)).

[009] Foi demonstrado que a adição de fitase aumenta a AME de uma dieta rica em fitato. Ravindran *et al (Br. Poult. Sci.*, 2000, 41, 193-200) sugeriram que os complexos fitato de cálcio reagem com ácidos graxos para

formar sabões insolúveis no lúmen intestinal, diminuindo assim a digestibilidade da gordura. A adição da fitase tem sido sugerida para reduzir o nível desses sabões. Apoiando esta hipótese, não há evidência de interações de fitato com lipídios no milho (Cosgrove, 1966, *Rev. Pure App. Chem.* 16:209-224). Estas “lipofitinas” foram descritas como um complexo de Ca/Mg-fitato, lipídios e peptídeos (Cosgrove, 1966, *Rev. Pure App. Chem.* 16:209-224). Outras descrições também sugeriram interações entre Ca, gordura e fitato na dieta. Por exemplo, Matyka *et al.* (1990) (*Anim. Feed. Sci. Technol.* 31:223-230) descobriram que o sebo na dieta reduziu a utilização de fitato P em pintos, e aumentou o percentual de gordura excretada como sabão de ácidos graxos.

[010] A adição de lipases exógenas tem tido um sucesso limitado no aumento de lipídios e digestibilidade mineral. No entanto, isso pode ter sido limitado pela formação de complexos de ácidos graxos livres ligados com Ca e fitato (Cosgrove, 1966 *supra*), que são insolúveis no trato gastro intestinal, e mal absorvidos (Matyka *et al.* 1990 *supra*).

[011] O uso de lipases exógenas na alimentação animal foi anteriormente sugerido com o objetivo de melhorar a digestão das gorduras pelos animais. A hipótese é que a lipase melhora a digestão, uma vez que ela libera ácidos graxos livres (AGL) absorvíveis de forma mais rápida do que de ocorreria de outra forma. No entanto, as tentativas de demonstrar melhorias no desempenho ou digestibilidade em animais pelo uso de lipases exógenas têm sido, na melhor das hipóteses, inconsistentes e muitas vezes demonstraram o não funcionamento das lipases. Dierick e Decuypere (2004) (*J. Sci. Food Agric.* 84:1443-1450) exibiram que não houve melhora na digestibilidade de gordura com a adição de uma lipase microbiana na dieta de suínos. Hurtado *et al.* (2000) (*Rev. Bras. Zootec.* 29:794-802) falharam em detectar aumento de peso corporal, eficiência alimentar e digestibilidade de energia devido ao uso de uma lipase exógena em leitões. Além disso, eles não relataram nenhum efeito aditivo em qualquer um desses parâmetros, quando a lipase

foi combinada com uma amilase e uma protease. Officer (1995) (*Anim. Feed Sci. Technol.* 56:55-65) relatou que não houve alterações significativas no ganho de peso pelo consumo de ração de leitões pelo uso de duas combinações de enzimas exógenas que eles descreveram como lipase, proteinase, B-glucanase, amilase e celulose, e lipase, B-glucanase, hemi-celulase, pentosanase, celulose, amilase e proteinase.

[012] Em frangos de corte, Meng *et al.* (2004) (*Sci Poult.* 83:1718-1727), quando utilizando uma lipase bacteriana em dietas à base de trigo, não detectaram qualquer efeito da lipase na digestibilidade aparente da gordura, amido, nitrogênio e NSP, bem como AME. Além disso, eles rejeitaram a hipótese de que uma combinação de carboidrases, incluindo a xilanase, glucanase e celulase, em cima da lipase aumentaria os efeitos da lipase na digestibilidade dos nutrientes, reduzindo a viscosidade da digesta e aumentando a digestão e absorção da gordura.

[013] Al- Marzooqi e Leeson (1999) testaram lipases de origem animal e extratos pancreáticos. Embora eles tenham sido capazes de demonstrar a melhora na digestibilidade da gordura e redução no nível de sabões nos níveis fecais quando estes aditivos foram utilizados na dieta, eles também relataram um efeito anoréxico (redução do consumo de ração), que eles explicaram por possíveis contaminações com colecistoquinina neste tipo de extratos. Este fato limita sua utilização na alimentação animal e possíveis melhorias na eficiência de crescimento ou alimentar em animais.

[014] Um dos objetivos da presente invenção é fornecer um suplemento alimentar que forneça uma maior disponibilidade de pelo menos um nutriente ou uma melhoria na energia metabolizável aparente a partir de uma matéria para a alimentação animal.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[015] A presente invenção é baseada na descoberta

surpreendente de que a adição de um suplemento alimentar compreendendo pelo menos uma enzima lipolítica específica e pelo menos uma fitase específica em um alimento para animais resulta na absorção melhorada de pelo menos um nutriente ou mineral em comparação com o uso de enzimas de maneira individual.

[016] De acordo com um aspecto mais amplo da presente invenção, é fornecido um suplemento alimentar composto por:

- i) pelo menos uma enzima lipolítica; e
- ii. pelo menos uma fitase.

[017] Os inventores descobriram surpreendentemente que, ao contrário de relatos anteriores (Mulyantini, NGA *et al Aust. Poult. Sci. Symp*, 17, 305-307 (2005)), a adição de um suplemento alimentar composto por pelo menos uma fitase específica e pelo menos uma enzima lipolítica específica a uma matéria para a alimentação animal para produzir um alimento para animais que resulta em um aumento na disponibilidade de pelo menos um nutriente e/ou um aumento da energia metabolizável aparente (AME).

[018] Embora não querendo se comprometer com a teoria, os inventores têm a hipótese de que esta descoberta surpreendente pode ser devido a ação da enzima lipolítica liberando ácidos graxos livres (AGL) em um estágio precoce na digestão onde o pH é ácido. Estes AGL podem se ligar com o excesso de cálcio para formar sabões no intestino. Há então menos cálcio livre disponível para se ligar ao fitato, aumentando assim a atividade da fitase nas regiões do trato gastrointestinal (TGI) onde o ácido fítico e o cálcio tendem a formar um complexo resistente a fitase. Isso leva ao aumento na liberação e absorção de fosfato. Os complexos de cálcio ácidos graxos livres se dissolvem tardiamente no GIT, resultando em uma absorção aumentada de gordura e cálcio e/ou EMA aumentada.

[019] De acordo com outro aspecto da presente invenção é

fornecido um método para fazer um suplemento alimentar composto por mistura de pelo menos uma enzima lipolítica e pelo menos uma fitase.

[020] De acordo com outro aspecto da presente invenção é fornecido um alimento para animais compreendendo uma matéria para a alimentação animal e o suplemento alimentar ou, pelo menos, uma enzima lipolítica e pelo menos uma fitase de acordo com a presente invenção.

[021] De acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido um método para a produção de uma matéria para a alimentação animal compreendendo a adição de um suplemento alimentar à matéria para a alimentação animal ou, pelo menos, uma enzima lipolítica e pelo menos uma fitase de acordo com a presente invenção.

[022] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um método para aumentar a disponibilidade de pelo menos um dos nutrientes da dieta e/ou aumentar a energia metabolizável aparente (AME) a partir de uma matéria para a alimentação animal compreendendo a adição de um suplemento alimentar ao material alimentar que compreende uma combinação de pelo menos uma enzima lipolítica e pelo menos uma fitase; ou a adição de pelo menos, uma enzima lipolítica e pelo menos uma fitase à matéria para a alimentação animal.

[023] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um método para aumentar a taxa de crescimento de um animal, compreendendo em alimentar o animal com uma quantidade eficaz de um alimento para animais de acordo com a presente invenção.

[024] De acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido o uso de pelo menos uma fitase e pelo menos uma lipase na fabricação de um alimento para animais, para aumentar a disponibilidade de pelo menos um nutriente e/ou aumentar a energia metabólica disponível de uma matéria para a alimentação animal.

[025] Será compreendido que qualquer uma das características preferidas divulgadas no presente documento é considerada igualmente aplicável a qualquer dos aspectos descritos acima, a menos que expressamente indicado de outra forma. Qualquer característica preferida é também considerada como sendo divulgada em combinação com qualquer outra característica preferida divulgada no presente documento.

[026] Para ser eficiente como uma enzima aditiva na alimentação animal, uma fitase tem de combinar uma variedade de propriedades diferentes. A fim de ser capaz de degradar o ácido fítico no ambiente ácido do estômago de um animal ela tem que ser ativa em pH baixo, preferencialmente em uma ampla faixa de valores de pH. Além disso, ela tem que possuir alta atividade específica e alta estabilidade térmica para permitir que a proteína suporte as altas temperaturas comumente usadas na preparação de alimentos, tais como pastilhas de ração.

[027] Também é importante que a enzima tenha ampla especificidade ao substrato, permitindo que ela não só hidrolise o fitato como também produtos intermediários da degradação do fitato como inositol penta-fosfatos, trifosfatos e tetra-fosfatos. Estudos sobre a degradação do fitato em porcos mostram que estes inositol oligofosfatos de outro modo permanecem em grande parte insolúveis no intestino delgado e grosso e, portanto, inacessíveis para fosfatase alcalina produzida pelos animais e microflora intestinal (Schlemmer U. *et al. Arch. Anim. Nutr.* 55, 255 -280 (2001)). Variações nos perfis de especificidade ao substrato de diferentes enzimas foram identificadas. Por exemplo, o inositol-trifosfato gerado pela fitase de *B. subtilis* é essencialmente mais resistente à hidrólise por esta enzima [Kerovuo J. *et al. Biochem J.* 352, 623-628 (2000)]

[028] Em exemplos de realizações preferidas, a fitase é preferencialmente uma fitase de *E. coli* comercializada sob o nome *Phyzyme*

XP™ pela Danisco A/S. Alternativamente, a fitase pode ser uma fitase de *Buttiauxella*, por exemplo, as enzimas fitases ensinadas nos documentos WO 2006/043178, WO 2008/097619, WO 2008/092901 e PCT/US2009/41011 todos os quais são incorporados ao presente pela referência.

[029] Em um exemplo de realização preferido, a fitase compreende uma fitase de *E. coli* e/ou uma fitase de *Buttiauxella sp.* Mais preferivelmente, a fitase compreende um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos como mostrado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-6 ou SEQ ID NO: 13; ou um polipeptídeo compreendendo um ou várias adições, deleções e/ou substituições de aminoácidos em comparação com qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-6 ou SEQ ID NO: 13, ou tenha uma identidade de sequência de pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 99% com a sequência de polipeptídeos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-6 ou SEQ ID NO: 13, ou um polipeptídeo produzido pela expressão de uma sequência de nucleotídeos compreendendo a sequência SEQ ID NO: 11; ou os nucleotídeos 253-1483 da SEQ ID NO: 14 ou uma sequência que difere da SEQ ID NO: 11 ou dos nucleotídeos 253-1483 da SEQ ID NO: 14, devido à degeneração do código genético, ou uma sequência compreendendo uma ou várias adições, deleções e/ou substituições de nucleotídeos em comparação com a sequência SEQ ID NO: 11; ou nucleotídeos 253-1483 da SEQ ID NO: 14; ou uma sequência que tenha pelo menos 70%, 80 %, 90 %, 95%, 98 % ou 99 % de identidade com a SEQ ID NO: 11 ou nucleotídeos 253-1483 da SEQ ID NO: 14.

[030] Em um exemplo de realização preferido, a fitase possui atividade fitase em pelo menos uma faixa de pH de cerca de pH 2,5 a cerca de pH 5,5. Mais preferivelmente, a fitase possui atividade de fitase em pelo menos uma faixa de pH de cerca de pH 2,5 a cerca de pH 3,5 e também na faixa de pH de cerca de 5 a cerca de pH 5,5 quando mensurado pelo ensaio da fitase divulgado no seção Material e Métodos a seguir.

[031] Preferivelmente, a fitase tem um nível de atividade específica de pelo menos 100 FTU/mg de enzima. Mais preferivelmente, pelo menos, 200, 300, 400, 500, 700, 1000 FTU/mg.

[032] Será compreendido que, conforme utilizados no presente, 1 FTU (unidade de fitase) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mmol de ortofosfato inorgânico a partir de um substrato em um minuto nas condições de reação definidas no presente no ensaio de fitase em pH 5,5 descrita na seção Materiais e Métodos.

[033] Em exemplos de realização preferidos, a fitase para uso na presente invenção tem um pH ótimo na faixa de pH 2 - 5,5, preferencialmente 4,0 - 4,5, mantendo pelo menos 50% da atividade máxima na faixa de pH 2,0 - 5,5 e/ou possuindo uma atividade específica acima de 300 FTU/mg.

[034] Preferencialmente, a enzima lipolítica para uso na presente invenção possui uma atividade lipase em pH na faixa de cerca de pH 1,5 a cerca de pH 5,5 quando mensurado pelo ensaio de lipase descrito na seção Materiais e Métodos abaixo. Mais preferivelmente, a enzima lipolítica possui uma atividade lipase em um pH na faixa de cerca de pH 1,5 a cerca de pH 3,5, ou cerca de pH 2,0 a cerca de pH 3,5.

[035] Deve-se compreender que a enzima lipolítica para uso na presente invenção pode ser qualquer enzima lipolítica adequada que, utilizando o ensaio definido no presente, demonstre uma atividade da enzima lipolítica. Preferivelmente, a enzima lipolítica tem um nível de atividade de pelo menos 100 LIPU/mg de enzima. Mais preferivelmente, pelo menos, 200, 300, 400, 500, 700, 1000 LIPU/mg.

[036] Conforme utilizado no presente, uma LIPU (unidade de lipase) é definida como a quantidade de enzima que libera 1 mmol de H^+ por minuto nas condições descritas no ensaio de lipase descrita na seção Material e Métodos abaixo.

[037] Em um exemplo de realização preferido, a enzima lipolítica para uso na presente invenção é derivada do fungo filamentoso *Aspergillus tubingensis* conforme descrito no WO 98/45453.

[038] Preferivelmente, a enzima lipolítica compreende; um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos conforme exibido na SEQ ID NO: 7 ou 8, ou um polipeptídeo compreendendo uma ou várias adições, deleções e/ou substituições de aminoácidos em relação a SEQ ID NO: 7 ou 8, ou um polipeptídeo possuindo pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 99% de identidade a este, ou um polipeptídeo que é produzido pela expressão de uma sequência de nucleotídeos que compreende a sequência SEQ ID NO: 9 ou 10, ou uma sequência que difere da SEQ ID NO: 9 ou 10, devido à degeneração do código genético, ou uma sequência compreendendo uma ou várias adições, deleções e/ou substituições de nucleotídeos em comparação com a sequência SEQ ID NO: 9 ou 10; ou uma sequência que tenha pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98 % ou 99% de identidade com a SEQ ID NO: 9 ou 10.

[039] Alternativamente, a lipase pode ser selecionada a partir do grupo consistindo da lipase ácida de *Pseudomonas gessardii* (Ramani, K. *et al*, J Ind Microbiol Biotechnol (2010) 37:531-535), lipase ácida de *Rhizopus arrhizus* (Kumar, KK. *et al*, Hindustan Antibiot Bull. 1993 fev-maio; 35(1-2):33-42) (SEQ ID NO: 32, 33), lipase ácida de *Penicillium simplicissimum* (Gutarra M.L.E. *et al*, Bioresource Technology 100 (2009) 5249-5254), lipase ácida de *Aspergillus niger* NCIM 1207 (Mhetras N.C. *et al*, Bioresource Technology 100 (2009) 1486-1490, Pel,H.J., *et al*, Nat. Biotechnol. 25 (2), 221-231 (2007)) (SEQ ID NO: 27), lipase gástrica de mamífero a partir de, por exemplo, humano (SEQ ID NO: 17, 18), bovinos (SEQ ID NO: 19, 20), camundongo (SEQ ID NO: 21, 22), rato (SEQ ID NO: 23, 24) e caninos (SEQ ID NO: 25, 26) (Chahinian, H. *et al*, Biochemistry 2006, 45, 993-1001), lipase ácida de mamona (Eastmond, P.J. *The Journal*

of *Biological Chemistry*, 279 (2004); 45540-45545) (SEQ ID NO: 28, 29), e lipase LIP2 de *Yarrowia lipolytica* (Aloulou, A. et al, *Biochimica et Biophysica Acta* 1771 (2007) 228-237) (SEQ ID NO: 30, 31).

[040] Conforme indicado acima, os inventores descobriram que a melhora no desempenho do suplemento alimentar da presente invenção é devido à ação da enzima lipolítica liberando ácidos graxos livres (AGL) em um estágio precoce na digestão. Isso resulta na formação de sabões de cálcio e a redução associada nos complexos cálcio-fitato.

[041] Em um exemplo de realização preferido, a enzima lipolítica para uso na presente invenção é produzida em uma célula de *Trichoderma reesei*, por exemplo, pela expressão de um nucleotídeo possuindo a sequência SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10 em uma célula hospedeira de *T. reesei*.

[042] Em um exemplo de realização ainda mais preferido, o suplemento alimentar de acordo com a presente invenção compreende:

i) uma enzima lipolítica que é uma enzima lipolítica caracterizada por pelo menos uma das seguintes características: -

a) uma enzima lipolítica que possui atividade lipase em um pH na faixa de cerca de pH 1,5 a cerca de pH 3,5 quando mensurado pelo ensaio de lipase divulgado no presente;

b) uma enzima lipolítica que compreende um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos conforme exibido na SEQ ID NO: 7 ou 8 ou um polipeptídeo possuindo pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, ou 99% de identidade a estas sequências;

c) uma enzima lipolítica que é produzida pela expressão de uma sequência de nucleotídeos que compreende a sequência SEQ ID NO: 9 ou 10, ou uma sequência que difere da SEQ ID NO: 9 ou 10 devido à degeneração do código genético, ou uma sequência que possui pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, ou 99% de identidade com a SEQ ID NO: 9 ou 10; e

ii) uma fitase que é caracterizada por pelo menos uma das seguintes características: -

d) uma fitase bacteriana;

e) uma fitase que possui atividade fitase quando mensurada pelo ensaio de fitase descrito no abaixo na presente invenção em um pH na faixa de cerca de pH 2,5 a cerca de pH 3,5;

f) uma fitase que compreende um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos conforme exibido em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-6 ou SEQ ID NO: 13; ou um polipeptídeo possuindo pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, ou 99% de identidade com estas sequências;

g) uma fitase que é produzida pela expressão de uma sequência de nucleotídeos compreendendo a sequência SEQ ID NO: 11 ou os nucleotídeos 253-1483 da SEQ ID NO: 14 ou uma sequência que difere da SEQ ID NO: 11 ou dos nucleotídeos 253-1483 da SEQ ID NO: 14 devido a degeneração do código genético; ou uma sequência que possui pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, ou 99% de identidade com a SEQ ID NO: 11 ou com os nucleotídeos 253-1483 da SEQ ID NO: 14.

[043] Em um exemplo de realização preferido, o suplemento alimentar compreende enzimas lipolíticas e fitase possuindo uma razão de atividade lipase (mensurada em unidades de lipase (LIPU)) para atividade fitase (mensurada em unidades de fitase (FTU)) na faixa de cerca de 1:5 a cerca de 12:1, preferencialmente, em uma razão de cerca de 1:3 a cerca de 3:1, e mais preferencialmente em uma razão de cerca de 1:1 a cerca de 3:1, conforme definido pelos ensaios de lipase e fitase em pH 5,5 descritos abaixo.

[044] De preferência, pelo menos um nutriente na dieta cuja disponibilidade é aumentada é selecionado a partir do grupo compreendendo; fósforo, cálcio, aminoácidos, gorduras e/ou amido. Preferencialmente, a disponibilidade é melhorada no trato ileal e/ou todo trato gastrointestinal.

[045] Será compreendido pelo técnico hábil no assunto que a enzima lipolítica e fitase para uso na presente invenção podem ser fornecidas de forma independente tanto em composições líquidas como em composições sólidas/granuladas.

[046] Preferencialmente, quando a dita enzima está na forma líquida, a dita enzima está no meio no qual a enzima foi secretada após a cultura de uma célula compreendendo a dita enzima. Preferencialmente o dito meio é livre de células (ou seja, a(s) célula(s) foi(foram) separada(s) do meio). Preferencialmente o dito meio é concentrado. Será compreendido que o meio pode ser granulado para proporcionar uma composição sólida de enzima.

[047] Será ainda evidente que o suplemento alimentar, ou pelo menos, uma enzima lipolítica e pelo menos uma fitase de acordo com a presente invenção, pode ser fornecido sob a forma de uma solução ou como um sólido - dependendo da utilização e/ou modo de aplicação e/ou o modo de administração.

[048] Em um exemplo de realização, o suplemento alimentar ou, pelo menos, uma enzima lipolítica e pelo menos uma fitase de acordo com a presente invenção, está em uma formulação líquida adequada para consumo, e preferencialmente tal composição líquida contém um tampão, sais, sorbitol e/ou glicerol.

[049] Em um exemplo de realização alternativo, o suplemento alimentar, ou pelo menos uma enzima lipolítica e pelo menos uma fitase de acordo com a presente invenção, pode ser fornecido como uma ou mais células compreendendo a dita enzima lipolítica e/ou fitase.

[050] Em um exemplo de realização o suplemento alimentar é granulado ou co-granulado com outras enzimas.

[051] Preferencialmente, o suplemento alimentar compreende adicionalmente pelo menos um veículo fisiologicamente aceitável.

[052] O veículo fisiologicamente aceitável é preferivelmente selecionado a partir de pelo menos um dentre: maltodextrina, calcário (carbonato de cálcio), ciclodextrina, trigo ou um componente do trigo, sacarose, amido, antiespumante, Na₂SO₄, Talco, PVA e misturas destes.

[053] Em uma exemplo de realização, a fitase e/ou enzima lipolítica é seca sobre o veículo fisiologicamente aceitável.

[054] Em exemplos de realizações preferidos, o suplemento alimentar pode compreender pelo menos uma enzima adicional. Em exemplos de realizações preferidos, a enzima alimentar adicional é selecionada a partir do grupo que consiste de enzimas envolvidas no metabolismo do amido, degradação de fibra, metabolismo de lipídeos, proteínas ou enzimas envolvidas no metabolismo do glicogênio, acetil esterases, aminopeptidases, amilases, arabinases, arabinofuranosidases, carboxipeptidases, catalases, celulases, quitinases, quimosina, cutinase, deoxirribonucleases, epimerases, esterases, galactosidases, glucanases, glucan lisases, endoglucanases, glucoamilases, glicose-oxidases, glicosidases, incluindo β -glicosidase, glucuronidases, hemicelulases, hexose oxidases, hidrolases, invertases, isomerases, lacases, liases, manosidases, oxidases, oxidoredutases, pectato liases, pectina-acetil-esterases, pectina depolimerases, pectina-metil-esterases, enzimas pectinolíticas, peroxidases, fenoloxidases, poligalacturonases, proteases, ramno-galacturonases, ribonucleases, taumatina, transferases, proteínas de transporte, transglutaminases, xilanases, hexose oxidase (D- hexose: O₂-oxidoreductase, EC 1.1.3.5) β -glucanase, α -amilase, pectinase, celobiohidrolase, fosfatase ácida e/ou outros, ou combinações destes. Estas incluem enzimas que, por exemplo, modulam a viscosidade dos alimentos.

[055] Em um exemplo de realização preferencial, o suplemento alimentar compreende uma fitase, uma enzima lipolítica, um xilanase e/ou uma amilase. Em um exemplo de realização mais preferido, o suplemento alimentar

compreende uma fitase, uma enzima lipolítica, uma xilanase e uma amilase.

[056] Preferencialmente, a amilase está presente na faixa de 10U/kg a 10000U/kg de ração, e mais preferencialmente, de 100U/kg a 7500U/kg, e ainda mais preferencialmente, de 500U/kg a 5000U/kg. Deve-se compreender que uma U de amilase é a quantidade de enzima que libera 1 mmol de ligações glucosídicas partir de um substrato de polímero de amido reticulado insolúvel em água por min em pH 6,5 e 37 °C.

[057] Preferencialmente, a amilase está presente na faixa de 10U/kg a 10000U/kg de ração, e mais preferencialmente, de 100U/kg a 7500U/kg, e ainda mais preferencialmente, de 500U/kg a 5000U/kg. Será entendido que uma U de xilanase é a quantidade de enzima que libera 0,5 µmol de equivalentes de açúcar redutor (como a xilose pelo método do açúcar redutor DNS [4])) a partir de um substrato xilana de casca de aveia por min em pH 5,3 e 50 °C. (Bailey, MJ Biely, P. e Poutanen, K., *Journal of Biotechnology*, Volume 23, (3), maio de 1992, 257-270).

[058] Será compreendido que o suplemento alimentar pode ser para qualquer animal adequado. Preferencialmente, o animal é um animal monogástrico, por exemplo, ave ou suíno.

[059] Será evidente que o suplemento alimentar pode conter pelo menos uma fitase e pelo menos uma enzima lipolítica em qualquer quantidade adequada. Preferencialmente, o suplemento alimentar compreende pelo menos 0,1% em peso de enzima lipolítica e fitase seja individualmente ou como uma percentagem combinada. Mais preferencialmente, o suplemento alimentar pode compreender, pelo menos, 0,5%; pelo menos 1%, pelo menos 2%, pelo menos 3%, ou pelo menos, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 % em peso de enzima lipolítica e fitase seja individualmente ou como uma percentagem combinada.

[060] Será óbvio para o técnico hábil no assunto que o suplemento alimentar, ou pelo menos uma enzima lipolítica e pelo menos uma

fitase de acordo com a presente invenção, pode também incluir outros componentes, como agentes estabilizantes e/ou agentes de volume e/ou outras enzimas.

[061] Preferencialmente, o suplemento alimentar, ou pelo menos uma enzima lipolítica e pelo menos uma fitase de acordo com a presente invenção, será termicamente estável quando submetida a um tratamento térmico de até cerca de 70 °C; até cerca de 85 °C, ou até cerca de 95 °C. O tratamento térmico pode ser realizado por até cerca de 1 minuto; até cerca de 5 minutos; até cerca de 10 minutos; até cerca de 30 minutos; até cerca de 60 minutos. O termo termicamente estável significa que pelo menos cerca de 75% dos componentes enzima que estavam presentes/ativos no aditivo antes do aquecimento na temperatura especificada ainda estão presentes/ativos após o resfriamento em temperatura ambiente. Preferencialmente, cerca de pelo menos 80% do componente enzima que estavam presentes e ativos no aditivo antes do aquecimento na temperatura especificada ainda estão presentes e ativos após o resfriamento em temperatura ambiente.

[062] O suplemento alimentar, ou pelo menos uma enzima lipolítica e pelo menos uma fitase de acordo com a presente invenção, pode ter uma duração em armazenagem (vida útil) maior que cerca de 30 semanas; maior do que cerca de 40 semanas; maior do que cerca de 50 semanas; maior do que cerca de 1 ano; maior do que cerca de 1,5 anos. A duração em armazenagem (ou vida útil) significa que pelo menos cerca de 80% do componente enzima que estava presente e ativo no aditivo quando foi preparado ainda estão presentes e ativos.

[063] Preferencialmente, o método de preparação de um suplemento alimentar de acordo com a presente invenção compreende uma etapa de mistura que compreende a mistura de pelo menos uma fitase e pelo menos uma enzima lipolítica opcionalmente com pelo menos um veículo

fisiologicamente aceitável.

[064] Em um exemplo de realização particularmente preferido, o suplemento alimentar é homogeneizado para produzir um pó.

[065] Em um exemplo de realização alternativo preferido, o suplemento alimentar é formulado em grânulos, conforme descrito no documento WO2007/044968 (referido como grânulos TPT).

[066] Em outro exemplo de realização preferido, quando o suplemento alimentar é formulado dentro de grânulos, os grânulos compreendem uma barreira de sal hidratado cobrindo o núcleo da proteína. A vantagem de tal revestimento de sal é a termotolerância melhorada, estabilidade de armazenamento melhorada e proteção contra outros aditivos que de outra forma poderiam produzir efeitos adversos sobre a enzima.

[067] Preferivelmente, o sal usado para o revestimento de sal tem atividade de água maior que 0,25 ou umidade constante maior que 60% a 20 °C.

[068] Preferencialmente, o revestimento de sal compreende um Na_2SO_4 .

[069] O método de preparação de um suplemento alimentar pode compreender a etapa adicional de peletização do pó. O pó pode ser misturado com outros componentes conhecidos no estado da técnica. O pó, ou mistura compreendendo o pó, pode ser forçado através de uma matriz e as fibras resultantes são cortadas em *pellets* adequados de comprimento variável.

[070] Opcionalmente, a etapa de peletização pode incluir um tratamento a vapor, o estágio de condicionamento antes da formação dos *pellets*. A mistura compreendendo o pó pode ser colocada em um condicionador, por exemplo, um misturador com injeção de vapor. A mistura é aquecida no condicionador até uma temperatura especificada, tal como 60-100 °C, e uma temperatura típica seria de 70 °C, 85 °C, 90 °C ou 95 °C. O tempo de permanência pode ser variável, ou seja, de segundos a minutos, ou mesmo

horas. Tal como 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos e 1 hora.

[071] Deve ser compreendido que o suplemento alimentar da presente invenção é adequado para a adição em qualquer matéria para a alimentação animal adequada.

[072] Conforme utilizado no presente, o termo “matéria para a alimentação animal” refere-se a matéria-prima básica para ser consumida por um animal. Deve-se compreender ainda que isto pode compreender, por exemplo, pelo menos um ou mais grãos não processados e/ou vegetal processado e/ou material de origem animal, como farelo de soja ou farinha de ossos.

[073] Em alguns exemplos de realização, a matéria para a alimentação animal compreende um ou mais dos seguintes componentes: a) cereais, tais como de grãos pequenos (por exemplo, trigo, cevada, centeio, aveia e combinações destes) e/ou de grãos grandes, tal como o milho ou sorgo; b) produtos à base de cereais, como a farinha de glúten de milho, Grãos Secos de Destilação com Solúveis (DDGS), farelo de trigo, sêmea de trigo, farelo de trigo de segunda escolha (*wheat shorts*), farelo de arroz, casca de arroz, casca de aveia, palmiste, e polpa cítrica; c) proteínas obtidas a partir de fontes como a soja, girassol, amendoim, tremoço, ervilhas, favas, algodão, canola, farinha de peixe, proteína de plasma seco, farinha de carne e osso, proteína de batata, soro de leite, copra e gergelim, d) óleos e gorduras obtidos a partir de fontes vegetais e animais; e) minerais e vitaminas.

[074] Será ainda mais evidente que o suplemento alimentar da presente invenção é particularmente vantajoso quando adicionado a uma matéria para a alimentação animal com alta concentração de fitato.

[075] Conforme usado na presente invenção, o termo “alimento para animais” refere-se uma matéria-prima para a alimentação animal ao qual

um ou mais suplementos alimentares foram adicionados.

[076] Será compreendido pelo técnico hábil no assunto que animais diferentes necessitam de diferentes alimentos para animais, e até mesmo o mesmo animal necessita de alimentos diferentes dependendo da finalidade para o qual o animal é criado. Além disso, será compreendido que, dependendo da matéria-prima usada na matéria para a alimentação animal, o alimento para animais pode ser um alimento com alto teor de fibra ou alimento de baixa fibra.

[077] Preferencialmente, os alimentos para animais compreendem matérias-primas que contem milho, trigo, cevada, relva triticale, centeio, arroz, tapioca, sorgo, e/ou qualquer um dos subprodutos, bem como componentes ricos em proteínas como farelo de soja, farelo de colza, farelo de canola, farelo de semente de algodão, de girassol, subprodutos de animais, e misturas destes. Preferivelmente, o alimento para animais pode compreender gorduras animais e/ou óleos vegetais.

[078] Opcionalmente, o alimento para animais também pode conter minerais adicionais, tais como, por exemplo, cálcio e/ou vitaminas adicionais.

[079] Será evidente para o técnico hábil no assunto que o suplemento alimentar da presente invenção é particularmente benéfico quando utilizado em alimentos para animais compreendendo alto teor de cálcio. Mais especificamente um alimento para animais compreendendo alto cálcio e alto fitato.

[080] Será evidente um técnico hábil no assunto que o nível de cálcio que representa uma dieta rica em cálcio pode variar dependendo do tipo de animal e até mesmo o uso para o qual o animal é criado. Por exemplo, para galinhas poedeiras, uma dieta com > 3% poderia ser uma dieta rica em cálcio. Para frangos de corte e perus, uma dieta com > 1% de Ca poderia ser uma dieta

rica em Ca. Para os propósitos da presente invenção, uma dieta rica em cálcio é considerada como sendo uma dieta compreendendo pelo menos 1-2% de cálcio.

[081] Será ainda mais evidente para um técnico que a dieta rica em fitato é aquela que compreende > 0,90% em peso de ácido fítico.

[082] Conforme definido na presente invenção, um alimento para animais com baixo teor de fibra é um alimento para animais compreendendo uma ou mais matéria-prima para a alimentação animal, que contém um teor máximo de paredes celulares insolúveis em água de cerca de 25%, e/ou um teor máximo de polissacarídeos não amiláceos solúveis de cerca de 4%. Preferivelmente, um teor máximo de paredes celulares insolúveis em água de cerca de 22,5%, cerca de 20%, cerca de 17,5%, cerca de 15%, cerca de 12,5%, e/ou um teor máximo de polissacarídeos não amiláceos solúveis de cerca de 3%, cerca de 2,5%, cerca de 2%, cerca de 1,75%, cerca de 1,5%, cerca de 1,25%.

[083] Em realizações preferidas, o suplemento alimentar, ou pelo menos uma enzima lipolítica e pelo menos uma fitase de acordo com a presente invenção, é misturado com pelo menos uma matéria para a alimentação animal de baixo teor de fibra, por exemplo, farelo de milho, trigo, um subproduto animal ou de soja e/ou qualquer um dos subprodutos para fornecer um alimento para animais com baixo teor de fibra.

[084] Preferencialmente, o alimento para animais é uma mistura de farelo de soja e milho.

[085] Preferencialmente, a matéria para a alimentação animal não é farelo de arroz desengordurado.

[086] Em exemplos de realizações preferidos, o alimento para animais compreende fitase em um nível de cerca de 250 FTU/kg a cerca de 15.000 FTU/kg de alimento (por exemplo, 250 a 10.000 FTU/kg, 400 - 7,500 FTU/kg e também 5 - 500 FTU/kg).

[087] Em exemplos de realizações preferidos, o alimento para animais compreende uma enzima lipolítica em um nível de cerca de 125 LIPU/kg a cerca de 45.000 LIPU/kg (por exemplo, de 125 a 30.000 LIPU/kg, 1000 - 20000 LIPU/kg e também 3000 - 10000 LIPU/kg).

[088] Será facilmente reconhecido pelo técnico do assunto que a fim de que o suplemento alimentar da presente invenção forneça as vantagens reivindicadas, o fitato deve estar presente na matéria-prima ou ração animal. Também será facilmente reconhecido que este fitato pode estar naturalmente presente como um constituinte da matéria para a alimentação animal, ou pode ser adicionado na forma de um suplemento adicional em um nível desejado.

[089] Em outro aspecto é fornecido um método para produção de um alimento para animais. O alimento para animais é normalmente produzido em fábricas de rações nas quais as matérias-primas são primeiramente moídas a uma granulometria adequada e, em seguida, misturadas com aditivos apropriados. Os alimentos para animais podem, em seguida, serem produzidos como uma massa ou grânulo (*pellet*); a etapa posterior envolve tipicamente um método em que a temperatura é elevada a um nível desejado e então o alimento animal é passado através de um molde para produzir os grânulos (*pellets*) de um tamanho específico. Os *pellets* são deixados para resfriarem. Posteriormente aditivos líquidos, tais como gordura e enzima, podem ser adicionados. . A produção de alimento para animais também pode envolver uma etapa adicional que inclui a extrusão ou expansão antes da peletização - em particular por meio de técnicas adequadas, que podem incluir o uso de vapor.

[090] O alimento para animais pode ser um alimento para animais monogástrico, como aves (por exemplo, frangos de corte, galinhas poedeiras, matrizes de frangos de corte, perus, patos, gansos, aves aquáticas) suínos (todas as categorias de idade), animal de estimação (por exemplo, cães e gatos) ou peixe.

[091] Opcionalmente, o alimento para animais pode compreender ainda aditivos. Por exemplo, o cálcio pode ser adicionado ao alimento para animais em qualquer quantidade adequada para complementar a dieta do animal e/ou como um agente de volume. O cálcio pode estar na forma de cálcio orgânico (por exemplo, vegetais de folhas verdes) ou inorgânico (por exemplo, calcário / carbonato de cálcio). Preferencialmente, após a adição do suplemento de cálcio, o alimento para animais irá compreender pelo menos cerca de 0,5% de cálcio. Mais preferivelmente, pelo menos cerca de 0,8%, pelo menos cerca de 1,0%, pelo menos cerca de 2,0%, pelo menos cerca de 3% de cálcio.

[092] O alimento para animais pode conter, pelo menos 0,0001% em peso do suplemento alimentar. Adequadamente, o alimento para animais pode compreender pelo menos 0,0005%; pelo menos 0,0010%; pelo menos 0,0020%; pelo menos 0,0025%; pelo menos 0,0050 %; pelo menos 0,0100%; pelo menos 0,020%, pelo menos 0.100%, pelo menos; pelo menos 0,200%; pelo menos 0,250%; ou pelo menos 0,500% em peso de suplemento alimentar.

[093] Em um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido o uso de pelo menos uma fitase e pelo menos uma enzima lipolítica na fabricação de um alimento para animais para aumentar a disponibilidade de pelo menos um nutriente e/ou aumentar a energia metabólica disponível de uma matéria para a alimentação animal.

[094] Preferencialmente, pelo menos uma fitase e pelo menos uma enzima lipolítica são formuladas como um suplemento alimentar. Mais preferivelmente, o suplemento alimentar é o suplemento alimentar de acordo com a presente invenção.

[095] Em exemplos de realizações preferidos o pelo menos um nutriente é selecionado a partir de fósforo, cálcio, gordura total e/ou aminoácidos.

[096] Conforme utilizado no presente, o termo “aumentando a disponibilidade de pelo menos um nutriente e/ou aumentando a energia metabólica disponível” significa um aumento na quantidade do nutriente ou energia disponível para uso pelo animal que consumiu uma unidade de peso do alimento para animais em comparação com a disponibilidade de nutrientes ou energia disponível a partir de uma unidade de peso da matéria-prima para a alimentação animal ao qual nenhuma fitase e enzima lipolítica ou suplemento alimentar foi adicionado.

[097] Em um exemplo de realização mais preferido, a matéria-prima para a alimentação animal é uma matéria para a alimentação animal que compreende altos níveis de fitato e/ou cálcio.

[098] A invenção será agora descrita com referência às seguintes figuras.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[099] A Figura 1 exibe a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO. 1) da fitase de *Buttiauxella* tipo selvagem.

[0100] A Figura 2 exibe a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO. 2) da fitase de *Buttiauxella* variante.

[0101] A Figura 3 exibe um alinhamento de aminoácidos da fitase de *Buttiauxella* tipo selvagem e 4 fitases variantes de *Buttiauxella* (SEQ ID NOs: 1-5).

[0102] A Figura 4 exibe a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO. 6) de um variante adicional da fitase de *Buttiauxella* denominada BP-11.

[0103] A Figura 5 exibe a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO. 7) de uma enzima lipolítica de *Aspergillus tubingensis* em que o peptídeo sinal endógeno é mostrado em negrito.

[0104] A Figura 6 exibe a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO. 8) de uma enzima lipolítica a partir do *Aspergillus tubingensis* que é a mesma

que a SEQ ID NO. 7, exceto que o peptídeo sinal endógeno foi removido.

[0105] A Figura 7 exibe a sequência de nucleotídeos que codifica uma enzima lipolítica de *Aspergillus tubingensis* (conforme exibido na SEQ ID NO. 7), incluindo a sequência de sinal - a sequência de nucleotídeos é uma sequência de DNA genômico (e foi designada como SEQ ID NO. 9). A sequência sinal é exibida em negrito e os *introns* são mostrados em letras minúsculas.

[0106] A Figura 8 exibe a sequência de nucleotídeos que codifica uma enzima lipolítica de *Aspergillus tubingensis* (conforme exibido na SEQ ID NO. 8), não incluindo a sequência sinal - a sequência de nucleotídeos é uma sequência de DNA genômico (e foi designada como SEQ ID NO. 10). Os *introns* são exibidos em letras minúsculas.

[0107] A Figura 9 exibe a resistência das fitases provenientes da *Buttiauxella*, variantes BP-17, BP-110, BP-111 e BP-112, e da *Phyzyme XP*, *Natuphos*, e *Ronozyme P* contra concentrações crescentes de pepsina.

[0108] A Figura 10 exibe uma representação esquemática da unidade de peletização no Instituto Tecnológico em Kolding.

[0109] A Figura 11 exibe a atividade residual relativa a partir de ensaio de peletização de três variantes de fitase B para uso na presente invenção.

[0110] A Figura 12 exibe a atividade residual relativa quando a *Phyzyme XP*, uma fitase de *E coli* é formulada sobre o trigo integral triturado.

[0111] A Figura 13 exibe os resultados de um estudo em que a fitase foi extraída a partir do produto *Ronozyme* revestido e formulada sobre o trigo integral triturado para estudar a termoestabilidade da molécula de fitase sem proteção.

[0112] As Figuras 14-17 exibem a atividade das fitases para uso na presente invenção e controles contra fitato em vários pHs.

[0113] As Figuras 18 e 19 são cromatogramas de HPLC que

mostram claramente que a fitase a partir de variantes de *Buttiauxella* catalisou a hidrólise do ácido fítico em temperaturas superiores a 85 °C.

[0114] A Figura 20 exibe o pDONR221::lip 3 contendo o DNA genômico da lipase 3 de *Aspergillus tubingensis*.

[0115] A Figura 21 exibe a expressão de lipase final da construção ATlipase3Trex.

[0116] A Figura 22 exibe a sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO. 11) que codifica a fitase de *Buttiauxella* tipo selvagem.

[0117] A Figura 23A exibe os coeficientes de digestibilidade de energia ileal de suínos canulados (EPM = 0,0009). Barras com letras diferentes diferem com um valor de $p < 0,05$.

[0118] A Figura 23B exibe os coeficientes de digestibilidade ileal de proteína bruta de suínos canulados (EPM = 0,0009). Barras com letras diferentes diferem com um valor de $p < 0,05$.

[0119] A Figura 24 exibe os coeficientes de energia digestível do trato total de suínos (EPM = 0,009). Barras com letras diferentes diferem com um valor de $p < 0,05$.

[0120] A Figura 25A exibe a retenção de cálcio do trato total de suínos (EPM = 0,027). Barras com letras diferentes diferem com um valor de $p < 0,05$.

[0121] A Figura 25B exibe a retenção de fósforo do trato total de suínos (EPM = 0,030). Barras com letras diferentes diferem com um valor de $p < 0,05$.

[0122] A Figura 26 exibe a sequência de aminoácidos da fitase de *E. coli* tipo selvagem, incluindo a sequência sinal (SEQ ID NO: 12).

[0123] A Figura 27 exibe a sequência de aminoácidos da fitase de *E. coli* tipo selvagem madura (SEQ ID NO: 13).

[0124] A Figura 28 exibe a sequência de nucleotídeos da fitase

de *E. coli* tipo selvagem (SEQ ID NO: 14).

[0125] A Figura 29 exhibe a produção de ácidos graxos livres a partir de rações de milho-soja quando incubadas com diversas combinações de enzima lipolítica/fitase.

[0126] A Figura 30 exhibe a produção de um complexo de ácido fítico e cálcio resistente a fitase e a reversão pela adição de ácidos graxos livres. A Figura 30A exhibe o efeito de concentrações crescentes de CaCl_2 sobre a atividade da fitase. A Figura 30B exhibe o efeito sobre a atividade da fitase pela adição de ácidos graxos livres na mistura de reação contendo 15 mM deste.

[0127] A Figura 31 exhibe a produção de um complexo de ácido fítico e cálcio resistente a fitase e a reversão pela adição da mistura de reação Lipase contendo lipase. A Figura 31A exhibe o efeito de concentrações crescentes de CaCl_2 sobre a atividade da fitase e a Figura 31B exhibe o efeito da adição da mistura de reação Lipase na mistura de reação fitase contendo 30 mM de CaCl_2 sobre a atividade da fitase.

[0128] A Figura 32 exhibe o perfil de pH da Lipase 3 e lipase pancreática mensuradas em uma dieta de milho-soja.

[0129] A Figura 33 exhibe o coeficiente de digestibilidade ileal de fósforo em frangos de corte. Barras com letras diferentes diferem com um valor de $p < 0,05$.

[0130] A Figura 34 exhibe o coeficiente de digestibilidade ileal de cálcio em frangos de corte. Barras com letras diferentes diferem com um valor de $p < 0,05$.

[0131] A Figura 35 exhibe o coeficiente de retenção de fósforo no trato total em frangos de corte. Barras com letras diferentes diferem com um valor de $p < 0,05$.

[0132] A Figura 36 exhibe o coeficiente de retenção de cálcio no trato total em dois experimentos com frangos de corte. Barras com letras

diferentes diferem com um valor de $p < 0,05$.

[0133] A Figura 37 exhibe a hipótese dos inventores sobre o mecanismo envolvido na interação da lipase e fitase no trato digestivo de aves domésticas. A figura mostra uma representação esquemática do possível mecanismo por trás do efeito sinérgico observado entre a Lipase e a fitase. Devido à ação da Lipase 3 sob condições ácidas, os ácidos graxos livres (AGL) são liberados mais precocemente na digestão em comparação com a situação sem a Lipase 3. Estes AGL podem se ligar com o excesso de cálcio (Ca) para formar sabões no intestino. Há então menos Ca livre disponível para se ligar ao ácido fítico (IP6) e forma o complexo resistente à fitase. Eventualmente, mais IP6 é degradado pela fitase, quando comparado com a situação sem a adição de Lipase 3. Isto leva a um aumento da libertação de fosfato (P) e a subsequente absorção pelo animal. Os complexos AGL-Ca podem se dissolver mais tarde no trato digestivo, resultando no aumento da absorção de gordura e Ca. Se a fitase não está presente para hidrolisar o IP6, este complexo juntamente com o sabão AGL-Ca pode formar um sabão IP6-Ca-AGL insolúvel não degradável, resultando na diminuição da absorção de gordura, Ca e P.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0134] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos utilizados no presente têm o mesmo significado que é comumente compreendido por um técnico hábil no assunto ao qual a presente divulgação pertence. Singleton, *et al.*, “*DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*”, 20 ED., John Wiley and Sons, Nova Iorque (1994), e Hale & Marham, “*THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*”, Harper Perennial, NY (1991) fornecem ao técnico um dicionário geral com muitos dos termos usados na presente divulgação.

[0135] A presente divulgação não é limitada pelos métodos e materiais exemplares divulgados no presente documento, e todos os métodos e

materiais similares ou equivalentes aos aqui descritos podem ser utilizados na prática ou em testes de exemplos de realizações da presente divulgação. Os intervalos numéricos incluem os números que definem o intervalo. Salvo quando indicado de outra maneira, sequências de ácidos nucleicos são escritos da esquerda para a direita na orientação 5' para 3'; as sequências de aminoácidos são escritas da esquerda para a direita na orientação da extremidade amino-para carboxi -terminal, respectivamente.

[0136] Os títulos fornecidos no presente não são limitações dos vários aspectos ou realizações da presente divulgação que pode ser obtida pela referência ao relatório descritivo como um todo. Assim, os termos definidos imediatamente abaixo são definidos de forma mais plena com referência ao relatório descritivo como um todo.

[0137] Os aminoácidos são mencionados no presente documento usando o nome do aminoácido, a sigla de três letras ou a abreviatura de letra única.

[0138] Conforme utilizado no presente, o termo “homólogo” significa que uma entidade possui uma determinada homologia com as sequências de aminoácidos e sequências de nucleotídeos. No presente, o termo “homologia” pode ser equiparado ao termo “identidade”. Adequadamente, “homologia” neste contexto refere-se à porcentagem de identidade das sequências entre duas enzimas após o alinhamento de suas sequências usando algoritmos de alinhamento conforme descrito abaixo de maneira mais detalhada.

[0139] No presente contexto, entende-se que uma sequência de aminoácido homóloga inclui uma sequência de aminoácidos que pode ser pelo menos 75, 80, 81, 85 ou 90% idêntica, e preferencialmente, pelo menos, 95, 96, 97, 98 ou 99% idêntica a outra sequência. Tipicamente, os homólogos compreenderão os mesmos sítios ativos e etc. - por exemplo, assim como a sequência de aminoácido em questão. Embora a homologia também possa ser

considerada em termos de similaridade (ou seja, resíduos de aminoácidos com propriedades químicas/funções semelhantes), no contexto da presente invenção é preferível expressar o termo homologia com relação a identidade de sequência.

[0140] A expressão “fragmento funcional” significa um fragmento do polipeptídeo que mantém as propriedades características de tal polipeptídeo. No contexto da presente invenção, um fragmento funcional de uma enzima fitase é um fragmento que mantém a capacidade de liberação do fosfato a partir do ácido fítico encontrada na proteína inteira.

[0141] Para sequências de aminoácidos e sequências de nucleotídeos, as comparações de homologia podem ser conduzidas visualmente, ou mais geralmente, com o auxílio de programas de comparação de sequências disponíveis. Estes programas para computadores disponíveis no mercado podem calcular a % de homologia entre duas ou mais sequências.

[0142] A % de homologia pode ser calculada sobre sequências contíguas, ou seja, uma sequência está alinhada com a outra sequência e cada aminoácido em uma sequência é comparado diretamente com o aminoácido correspondente na outra sequência, um resíduo de cada vez. Isso é chamado de alinhamento “*ungapped*” (sem lacunas). Normalmente, tais alinhamentos *ungapped* são apenas realizados sobre um número relativamente pequeno de resíduos.

[0143] Embora este seja um método muito simples e consistente, ele não consegue levar em consideração que, por exemplo, em um par de sequências de outra forma idênticas, uma inserção ou deleção fará com que os resíduos de aminoácidos seguintes sejam colocados fora do alinhamento, resultando assim em uma grande redução na % de homologia quando um alinhamento global é executado. Consequentemente, a maioria dos métodos de comparação de sequência é projetada para produzir alinhamentos ideais que levam em consideração possíveis inserções e deleções, sem penalizar

indevidamente a pontuação (escore) de homologia global. Isto é obtido por meio da inserção de *gaps* (lacunas) no alinhamento de sequências para tentar maximizar a homologia local.

[0144] No entanto, estes métodos mais complexos atribuem “*gap penalties*” (ou seja, penalidades para a introdução de lacunas) para cada lacuna presente no alinhamento de modo que, para o mesmo número de aminoácidos idênticos, um alinhamento de sequência com o mínimo de lacunas possível - refletindo o maior parentesco entre as duas sequências comparadas – irá obter uma pontuação mais elevada do que um alinhamento com muitas lacunas. A “penalidade para lacuna afim” (*affine gap cost*) é normalmente usada para penalizar de forma relativamente alta a existência de uma lacuna e atribuir uma penalidade menor para cada resíduo subsequente na lacuna. Este é o sistema de pontuação de lacuna mais usado. Penalidades de lacunas altas, irão, naturalmente, produzir alinhamentos otimizados com menos lacunas. A maioria dos programas de alinhamento permite que as penalidades para lacunas sejam modificadas. No entanto, é preferível usar os valores padrões pré-estabelecidos quando se utiliza tais *softwares* para comparações de sequências. Por exemplo, quando usando o pacote *GCG Wisconsin BestFit* a penalidade de lacuna (*gap penalty*) padrão para sequências de aminoácidos é de -12 por uma lacuna e -4 para cada extensão.

[0145] O cálculo da % de homologia máxima, portanto, em primeiro lugar requer a produção de um alinhamento ótimo, levando em consideração as penalidades para lacuna. Um programa de computador adequado para a realização de tal alinhamento é o pacote *GCG Wisconsin Bestfit* (Devereux *et al* 1984 *Nuc. Acids Research* 12 p387). Exemplos de outros *softwares* que podem realizar comparações de sequências incluem, mas não estão limitados ao, pacote BLAST (vide Ausubel *et al.*, 1999 *Short Protocols in Molecular Biology*, 4^a Ed – Capítulo 18), FASTA (Altschul *et al.*, 1990 *J. Mol. Biol.*

403-410) e a suíte de ferramentas de comparação *GENEWORKS*. Tanto o BLAST quanto o FASTA está disponível para pesquisas *offline* e *online* (vide Ausubel *et al.* 1999, *Short Protocols in Molecular Biology*. páginas 7-58 a 7-60).

[0146] No entanto, para algumas aplicações, é preferível usar o programa *GCG BestFit*. A nova ferramenta, chamada de “*BLAST 2 Sequences*” também está disponível para comparar sequências de proteínas e nucleotídeos (vide, *FEMS Microbiol Lett* 1999 174(2): 247-50; *FEMS Microbiol Lett* 1999 177(1): 187-8 e tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

[0147] Embora a % de homologia final possa ser mensurada em termos de identidade, o processo de alinhamento em si normalmente não é baseado em uma comparação de pares do tipo “tudo ou nada”. Em vez disso, uma matriz de pontuação de similaridade em escala é geralmente usada para atribuir a pontuação para cada comparação de par em par com base na similaridade química ou distância evolutiva. Um exemplo de tal matriz comumente utilizada é a matriz *BLOSUM62* - a matriz padrão para a suíte de programas *BLAST*. Os programas *GCG Wisconsin* usam geralmente valores padrões públicos ou, se fornecido, uma tabela de comparação de símbolos personalizada (consulte o manual do usuário para mais detalhes). Para algumas aplicações, é preferível usar os valores padrões pré-definidos públicos para o pacote *GCG*, ou no caso de outros *softwares*, uma matriz padrão, tal como *BLOSUM62*.

[0148] Alternativamente, a percentagem de homologias pode ser calculada usando o recurso de alinhamento múltiplo no DNASIS® (*Hitachi Software*), com base em um algoritmo, análogo ao CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), *Gene* 73 (1) 237-244).

[0149] Uma vez que o *software* tenha produzido um alinhamento ideal, é possível calcular a % de homologia, e preferencialmente a % de identidade de sequência. O *software* normalmente faz isso como parte da

comparação de sequência e gera um resultado numérico.

[0150] Em um aspecto da presente invenção os seguintes *softwares* e configurações para o cálculo da porcentagem de homologia/identidade de sequência são usados. Para as sequências de aminoácidos o percentual de identidade (homologia) ou “positivos” são calculados pelo *AlignX VectorNTI* (Vector NTI Advance 9.1 da Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, EUA) para cada possível par de sequências de aminoácidos. As configurações são os parâmetros pré-estabelecidos (“*Gap opening penalty*” (ou seja, penalidade por abertura de lacuna) -10, e “*Gap extension penalty*” (ou seja, penalidade por extensão de lacuna) 0.1).

[0151] Para sequências de ácidos nucleicos o percentual de identidade (homologia) ou “positivos” são calculadas pelo programa *AlignX VectorNTI* da Informax Inc. (EUA) para cada possível par de sequências de ácidos nucleicos. As configurações pré-definidas para DNA são: “*Gap opening penalty*” (penalidade por abertura de lacuna): 15; e “*Gap extension penalty*” (penalidade por extensão de lacuna): 6,66. (mesmas configurações para alinhamentos múltiplos).

[0152] Preferencialmente a identidade de aminoácidos (homologia) é calculada sobre a sequência de aminoácido de comprimento total ou ácido nucleico para um polinucleotídeo correspondente que codifica a respectiva sequência de aminoácido de comprimento total.

[0153] As sequências também podem ter deleções, inserções ou substituições de resíduos de aminoácidos que produzem uma alteração silenciosa e resultam em uma substância funcionalmente equivalente. Substituições de aminoácidos deliberadas podem ser feitas com base na similaridade das propriedades de aminoácidos (tais como polaridade, solubilidade, carga, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade e/ou natureza anfipática dos resíduos) sendo, portanto, útil agrupar aminoácidos em conjuntos de grupos

funcionais. Os aminoácidos podem ser agrupados com base nas propriedades de suas cadeias laterais sozinhas. No entanto, é mais útil também incluir dados de mutação. Os conjuntos de aminoácidos assim obtidos parecem estar conservados por razões estruturais. Estes conjuntos podem ser descritos na forma de um diagrama de Venn (Livingstone CD e Barton GJ (1993) "*Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation*" *Comput.Appl Biosci.* 9: 745-756)(Taylor W.R. (1986) "*The classification of amino acid conservation*" *J.Theor.Biol.* **119**; 205-218). Substituições conservadoras podem ser feitas, por exemplo, de acordo com a tabela abaixo, que descreve um diagrama de Venn de agrupamentos de aminoácidos geralmente aceito.

CONJUNTO		SUBCONJUNTO	
Hidrofóbico	F W Y H K M I L V A G C	Aromático	F W Y H
		Alifático	I L V
Polar	W Y H K R E D C S T N Q	Carregado	H K R E D
		Carregado positivamente	H K R
		Carregado negativamente	E D
Pequeno	V C A G S P T N D	Minúsculo	A G S

[0154] A presente invenção também abrange substituições homólogas (substituição e reposição são ambas utilizadas para designar a troca de um resíduo de aminoácido existente por um resíduo alternativo) que podem ocorrer, ou seja, substituições comparáveis (*like-for-like*), tais como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar e etc. Também pode ocorrer uma substituição não homóloga, ou seja, de uma classe de resíduo para outra ou,

alternativamente, a inclusão de aminoácidos não naturais, tais como ornitina (designada a seguir como Z), ornitina ácido diaminobutírico (designada a seguir como B), ornitina norleucina (designada a seguir como O), piriilalanina, tienilalanina, naftilalanina e fenilglicina.

[0155] Também podem ser feitas substituições por aminoácidos não naturais.

[0156] O termo “proteína” conforme utilizado no presente, inclui proteínas, polipeptídeos e peptídeos.

[0157] Os termos “resíduos de aminoácidos equivalentes a”, “aminoácido correspondente a” e equivalentes gramaticais dos mesmos são usados na presente invenção para se referirem a um resíduo de aminoácido de uma proteína que possui posição e efeitos semelhantes aos indicados em uma sequência de aminoácido em particular de uma proteína específica. O técnico hábil no assunto irá reconhecer a equivalência dos resíduos especificados em proteínas comparáveis.

[0158] O termo “propriedade” ou equivalentes gramaticais do mesmo no contexto de um polipeptídeo, conforme utilizado no presente, refere-se a qualquer característica ou atributo de um polipeptídeo que possa ser selecionado ou detectado. Essas propriedades incluem, mas não estão limitadas a, estabilidade oxidativa, especificidade do substrato, atividade catalítica, estabilidade térmica, temperatura e/ou perfil de atividade de pH, estabilidade no processamento de alimentos, e capacidade de ser secretado.

[0159] Conforme utilizado no presente, o termo “sequência de aminoácidos” é sinônimo do termo “polipeptídeo” e/ou “proteína”. Em alguns casos, o termo “sequência de aminoácido” é sinônimo do termo “peptídeo”. Em alguns casos, o termo “sequência de aminoácido” é sinônimo do termo “enzima”.

[0160] A sequência de aminoácido pode ser preparada/isolados a partir de uma fonte adequada, ou pode ser produzida de forma sintética, ou ela

pode ser preparada pelo uso de técnicas de DNA recombinante.

[0161] Os termos “proteína” e “polipeptídeo” são usados de forma alternada na presente invenção. Na presente divulgação e nas reivindicações, são usados os códigos convencionais de uma letra e de três letras para resíduos de aminoácidos. O código de três letras para aminoácidos, tal como definido em conformidade com as normas da comissão IUPAC-IUB (*Biochemical Nomenclature Commission*) (JCBN). É também compreendido que um polipeptídeo pode ser codificado por mais de uma sequência de nucleotídeos devido à degeneração do código genético.

[0162] O termo “sequência sinal” ou “peptídeo sinal” refere-se a qualquer sequência de nucleotídeos e/ou aminoácidos que possa participar na secreção das formas maduras ou precursoras da proteína. Esta definição de sequência sinal é uma definição funcional, devendo incluir todas aquelas sequências de aminoácidos codificadas pela porção N-terminal do gene da proteína que participam na efetivação da secreção da proteína. Elas estão frequentemente, mas não universalmente, ligadas à porção N-terminal de uma proteína ou à porção N-terminal de uma proteína precursora.

[0163] A expressão “fragmento funcional” significa um fragmento do polipeptídeo que mantém as propriedades características de tal polipeptídeo. No contexto da presente invenção, um fragmento funcional de uma fitase ou enzima lipolítica é um fragmento que mantém a capacidade de clivagem encontrada na proteína inteira da fitase ou enzima lipolítica.

[0164] O termo “isolado”, “recuperado” ou “purificado” refere-se a um material que é retirado de seu ambiente original. O termo “substancialmente purificado” significa que o material foi purificado pelo menos a um grau substancial.

[0165] Em um aspecto, a sequência de nucleotídeos ou aminoácidos está preferencialmente na forma isolada. O termo “isolado” significa

que a sequência é substancialmente livre de pelo menos outro componente com o qual a sequência está naturalmente associada na natureza e como é encontrada na natureza.

[0166] Outras definições de termos podem aparecer ao longo do relatório descritivo. Antes de descrever detalhadamente os exemplos de realizações, deve-se compreender que a presente divulgação não se limita aos exemplos específicos descritos e, dessa forma, obviamente, pode variar. Também é preciso entender que a terminologia utilizada no presente é para o propósito de apenas descrever exemplos de realizações específicas, e não se destina a ser limitante do escopo da presente invenção, que será limitada somente pelas reivindicações anexas.

[0167] Quando é fornecido um intervalo de valores, deve-se compreender que cada valor interveniente, da décima unidade do limite inferior, salvo quando o contexto dita claramente de outra forma, entre os limites superior e inferior desse intervalo é também especificamente divulgado. Cada intervalo menor entre qualquer valor declarado ou valor interveniente em um intervalo indicado e qualquer outro valor declarado ou interveniente naquele intervalo indicado é englobado dentro desta divulgação. Os limites superior e inferior destes intervalos menores podem ser independentemente incluídos ou excluídos no intervalo, e cada intervalo quer seja sem limites, com limite inferior e/ou superior que estão incluídos nos intervalos menores também são abrangidos dentro desta divulgação, sujeito a qualquer limite especificamente excluído no intervalo declarado. Quando o intervalo indicado inclui um ou ambos os limites, a exclusão do intervalo de um ou ambos os limites incluídos também são incluídos na presente divulgação.

[0168] Deve-se notar que conforme usado no presente e nas reivindicações anexas, as formas singulares “um”, “uma” e “o” ou “a” inclui os referentes no plural, ao menos que o contexto dite claramente de outra maneira.

Assim, por exemplo, a referência a "um gene" inclui uma pluralidade de tais agentes candidatos, uma referência a "a célula" inclui uma ou mais células e equivalentes destas conhecidas pelos técnicos hábeis no assunto, e assim por diante.

[0169] As publicações discutidas neste documento são fornecidas unicamente por suas divulgações anteriores a data de depósito do presente pedido. Nada neste documento deve ser interpretado como uma admissão de que tais publicações constituem anterioridade para as reivindicações anexas.

[0170] As enzimas para uso na presente invenção podem ser produzidas tanto pela cultura sólida quanto submersa, incluindo processos *batch* (descontínuo), *fed-batch* (descontínuo alimentado) ou de fluxo contínuo. Cultivo é realizado em um meio de crescimento que compreende um meio com sais minerais aquoso, fatores de crescimento orgânicos, carbono e material de fonte de energia, oxigênio molecular, e, claro, um inóculo inicial de uma ou mais espécies de microrganismo(s) específico(s) que será(ão) empregada(s).

[0171] Além da fonte de carbono e energia, oxigênio, nitrogênio assimilável e um inóculo do microrganismo, é necessário fornecer quantidades adequadas em proporções adequadas de nutrientes minerais para garantir o crescimento adequado dos microrganismos, maximizar a assimilação do carbono e fonte de energia pelas células no processo de conversão microbiana, e atingir o rendimento celular máximo com densidade celular máxima nos meios de fermentação.

[0172] A composição do meio aquoso mineral pode variar em um amplo intervalo, dependendo em parte do microrganismo e do substrato empregado, tal como é conhecido no estado da técnica. A meio mineral deve incluir, além do nitrogênio, quantidades adequadas de fósforo, magnésio, cálcio, potássio, enxofre, sódio e, nas formas iônicas assimiláveis solúveis e combinadas adequadas, e também deve estar preferencialmente presente

determinados oligoelementos como o cobre, manganês, molibdênio, ferro, zinco, boro e iodo, e outros, novamente na forma solúvel assimilável adequada, todos conforme conhecidos no estado da técnica.

[0173] A reação de fermentação é um processo aeróbio em que o oxigênio molecular necessário é fornecido por um gás contendo oxigênio molecular, tal como o ar, ar rico em oxigênio, ou mesmo oxigênio molecular substancialmente puro, desde que mantenha o conteúdo do tanque de fermentação com uma pressão parcial de oxigênio adequada e eficaz para auxiliar as espécies de microrganismo a crescer de forma próspera. Na prática, com a utilização de um substrato de hidrocarboneto oxigenado, a necessidade de oxigênio para o crescimento do microrganismo é reduzida. No entanto, o oxigênio molecular deve ser fornecido para o crescimento, uma vez que a assimilação do substrato e o crescimento correspondente dos microrganismos é, em parte, um processo de combustão.

[0174] Embora a taxa de aeração possa variar em uma faixa considerável, a aeração é geralmente conduzida a uma taxa que está na faixa de cerca de 0,5 a 10, e preferencialmente entre cerca de 0,5 a 7, ~ volumes (na pressão empregada e a 25 °C) de gás contendo oxigênio por volume líquido no fermentador por minuto. Esta quantidade baseia-se no ar com conteúdo normal de oxigênio sendo fornecido ao reator, e em termos de oxigênio puro os respectivos intervalos seriam de cerca de 0,1 a 1,7, ou preferencialmente entre cerca de 0,1 a 1,3 volumes (para a pressão empregada e a 25 °C) de oxigênio por volume de líquido no fermentador por minuto.

[0175] A pressão empregada para o processo de conversão microbiana pode variar amplamente. Pressões geralmente estão dentro da faixa de cerca de 0-50 psig, atualmente são preferencialmente usadas pressões de 0 - 30 psig, mais preferencialmente pelo menos uma pressão um pouco maior que a pressão atmosférica, como um balanço entre equipamentos e custo

operacional *versus* a solubilidade de oxigênio alcançada. Pressões maiores que a pressão atmosférica são vantajosas na medida em que tais pressões tendem a aumentar a concentração de oxigênio dissolvido na fermentação aquosa, que por sua vez pode ajudar a aumentar as taxas de crescimento celular. Ao mesmo tempo, isso é contrabalançado pelo fato de que altas pressões atmosféricas fazer aumentar os custos de equipamentos e operacional.

[0176] A temperatura de fermentação pode variar um pouco, mas para fungos filamentosos, como o *Trichoderma reesei*, a temperatura geralmente estará dentro da faixa de cerca de 20 °C a 40 °C, em geral, de preferência na faixa de cerca de 25 °C a 34 °C, dependendo a cepa de microrganismo escolhida.

[0177] Os microrganismos também necessitam de uma fonte de nitrogênio assimilável. A fonte de nitrogênio assimilável pode ser qualquer composto contendo nitrogênio ou composto capaz de liberar nitrogênio em uma forma adequada para utilização metabólica pelo microrganismo. Embora possa ser empregada uma variedade de compostos de fonte de nitrogênio orgânicos, tal como hidrolisados de proteína, usualmente são utilizados compostos contendo nitrogênio mais baratos, como a amônia, hidróxido de amônio, ureia e diversos sais de amônio, tais como fosfato de amônio, sulfato de amônio, pirofosfato de amônio, cloreto de amônio, ou podem ser utilizados vários outros compostos de amônio. O próprio gás de amônia é conveniente para operações em grande escala, e pode ser empregado por meio de borbulhamento através da fermentação aquosa (meio de fermentação) em quantidades adequadas. Ao mesmo tempo, a amônia também pode ser empregada para auxiliar no controle do pH.

[0178] A faixa de pH na fermentação microbiana aquosa (mistura de fermentação) deve estar na faixa exemplar de cerca de 2,0 a 8,0. Com fungos filamentosos, o pH normalmente está dentro da faixa de cerca de 2,5 a 8,0; com o *Trichoderma reesei*, o pH normalmente está dentro da faixa de cerca de 3,0 a

7,0. A preferência da faixa de pH para certos microrganismos são dependentes, até certa ponto, do meio empregado, bem como do microrganismo específico, e, assim, alterar um pouco o pH com a mudança do meio pode ser facilmente determinado pelo técnico hábil no assunto.

[0179] Embora o tempo médio de retenção da mistura de fermentação no fermentador pode variar consideravelmente, dependendo em parte da temperatura de fermentação e da cultura empregada, ele geralmente vai estar dentro do intervalo de cerca de 24 a 500 horas, e preferencialmente cerca de 24 a 400 horas. Preferivelmente, a fermentação é realizada de tal forma que o substrato contendo carbono pode ser controlado como um fator limitante, proporcionando assim uma boa conversão do substrato contendo carbono para as células e evitando assim a contaminação das células com uma quantidade substancial de substrato não convertido. Este último não é um problema quando são utilizados substratos solúveis em água, uma vez que qualquer vestígio é facilmente lavado. Entretanto, pode ser um problema no caso de substratos não solúveis em água, e necessita a adição de etapas de tratamento de produto, tal como etapas de lavagem adequadas. Conforme descrito acima, o tempo para atingir a este nível não é crítico e pode variar de acordo com o microrganismo específico e o processo de fermentação sendo realizado. No entanto, é bem conhecido no estado da técnica modos para se determinar a concentração da fonte de carbono no meio de fermentação, e saber se o nível desejado da fonte de carbono foi ou não alcançado.

[0180] Embora a fermentação possa ser conduzida como uma operação do tipo *batch* (descontínua) ou do tipo contínua, a operação do tipo *fed-batch* (descontínua alimentada) é mais preferida pela facilidade de controle, produção de quantidades de produto uniforme, e utiliza equipamentos mais econômicos. Se desejado, parte ou a totalidade do material de fonte de energia e carbono e/ou parte da fonte de nitrogênio assimilável, como a amônia, pode

ser adicionado ao meio mineral aquoso antes da alimentação do meio mineral aquoso ao fermentador. Cada um dos fluxos introduzidos dentro do reator é preferencialmente controlado em uma taxa predeterminada, ou em resposta a uma necessidade determinável através do monitoramento, tal como a concentração de substrato de carbono e energia, pH, oxigênio dissolvido, oxigênio ou dióxido de carbono nos gases de escape do fermentador, densidade celular mensurável pela transmitância de luz, ou coisa método similar. As taxas de alimentação dos diversos materiais podem ser variadas, de modo a obter uma taxa de crescimento celular tão rápida quanto possível, para ser consistente com a utilização eficiente do carbono e fonte de energia, para, e desse modo, obter um rendimento de células de microrganismos em relação ao custo do substrato tão alto quanto possível.

[0181] Tanto na operação *batch* quanto na operação *fed-batch* preferida, todos os equipamentos, reator, ou meios de fermentação, ou recipiente, tubulações, dispositivos de circulação ou de arrefecimento e similares, são inicialmente esterilizados, geralmente empregando vapor, por exemplo, a aproximadamente 121 °C por cerca de pelo menos 15 minutos. O reator esterilizado é então inoculado com uma cultura do microrganismo selecionado na presença de todos os nutrientes necessários, incluindo o oxigênio e o substrato contendo carbono. O tipo de fermentador empregado não é crítico, embora atualmente seja preferida a operação no *Biolafitte* de 15L (Saint-Germain-en-Laye, França).

[0182] A coleta e purificação das enzimas da presente invenção a partir do caldo de fermentação também podem ser feitas por meio de procedimentos conhecidos no estado da técnica. O caldo de fermentação geralmente contém restos celulares, incluindo células, vários contaminantes sólidos em suspensão e outras biomassas, bem como o produto enzima desejado da presente invenção, que são preferencialmente removidos do caldo

de fermentação por meio de técnicas conhecidas. Processos adequados para essa remoção incluem técnicas convencionais de separação sólido-líquido como, por exemplo, centrifugação, filtração, diálise, microfiltração, filtração a vácuo rotativa, ou outros processos conhecidos para produzir um filtrado livre de células. Pode ser preferível concentrar ainda mais o caldo de fermentação ou o filtrado livre de células utilizando técnicas, como a ultrafiltração, evaporação ou precipitação. A precipitação de componentes proteínicos do sobrenadante ou filtrado pode ser obtida por meio de um sal, por exemplo, sulfato de amônio. A purificação adicional pode opcionalmente ser alcançada por cristalização ou por uma variedade de métodos cromatográficos, por exemplo, cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade ou procedimentos reconhecidos de técnicas similares.

FITASES

[0183] O ácido fítico (mio-inositol hexaquisfosfato) é um componente importante em culturas de cereais, leguminosas e oleaginosas. A sua forma de sal, fitato, é a principal forma de armazenamento de fósforo nessas plantas.

[0184] Conforme utilizado no presente, o termo “fitase” ou “a atividade de fitase” refere-se a uma proteína ou polipeptídeo que é capaz de catalisar a hidrólise do fitato para (1) mio-inositol e/ou (2) mono-, di-, tri-, tetra- e/ou penta-fosfatos deste e (3) fosfato inorgânico. Por exemplo, enzimas possuindo atividade catalítica conforme definido na Comissão de Enzima (*Enzyme Commission*) número EC 3.1.3.8 ou número EC 3.1.3.26.

[0185] Algumas fitases, além do fitato, são capazes de hidrolisar pelo menos alguns dos fosfatos de inositol de graus intermediários de fosforilação.

[0186] Os termos “variante de fitase”, “fitase variante” ou “variante” ou “forma modificada” referem-se a uma enzima fitase com uma

sequência de aminoácidos derivada da sequência de aminoácidos de uma fitase de origem (parental) com uma ou mais substituições, inserções e/ou deleções de aminoácidos, que juntas são denominadas de “mutações”.

[0187] Os termos “fitase parental”, “fitase de origem” ou “enzima parental” referem-se a uma enzima fitase a partir da qual uma fitase variante é derivada. A fitase parental pode ser uma fitase tipo selvagem ou outra variante de fitase. Em particular, na presente invenção, uma “fitase parental” pode ser derivada a partir de uma *Buttiauxella* sp. ou *E. coli*, conforme descrito no documento WO 99/08539 Patentes US 5.876.997, US 6.190.897 e AU 735371 EP 1.003.379 e JP 2001514869 todos os quais são incorporados ao presente pela referência. Adequadamente, a “fitase parental” é derivada a partir da *Buttiauxella* cepa P1-29 depositada sob o número de acesso NCIMB41248 conforme descrito no documento WO2006/043178.

[0188] Os termos “fitase de *E. coli*” e “fitase de *Buttiauxella* sp.” não significa que as enzimas tenham sido obtidas necessariamente a partir de uma fonte de *E. coli* ou *Buttiauxella* sp. Em vez disso, as enzimas preferencialmente possuem as mesmas características funcionais ou sequências das fitases de *E. coli* ou *Buttiauxella* sp. Por exemplo, a fitase de *Buttiauxella* sp. pode ser uma variante derivada de uma *Buttiauxella* sp., mas que não está naturalmente presente na espécie *Buttiauxella*.

[0189] O termo “*Buttiauxella*” refere-se a um gênero de bactérias gram negativas, anaeróbicas facultativas da família *Enterobacteriaceae* spp e *Buttiauxella* SSP incluindo a *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. ferrugutiae*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae* e *B. warmboldiae*. Cepas da espécie *Buttiauxella* estão disponíveis, por exemplo, a partir do banco de culturas norte-americano “*American Type Culture Collection*” (ATCC) e da Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares (DSMZ).

[0190] As fitases de *Buttiauxella* são preferencialmente

identificadas a partir de *Buttiauxella spp* pelo dos métodos descritos no WO 2006/043178.

[0191] Em um exemplo de realização alternativo, a fitase parental (de origem) ou fitase pode ser derivada do *Citrobacter sp.* conforme descrito no WO2006/038062.

[0192] Os termos “fitase tipo selvagem” ou “tipo selvagem”, conforme utilizados no presente, descrevem uma enzima fitase com uma sequência de aminoácidos encontrada na natureza. Especificamente, a fitase de *Buttiauxella* do tipo selvagem é exibida como a SEQ ID NO: 1. A fitase de *E. coli* do tipo selvagem é exibida como SEQ ID NO: 13 (Figura 27).

[0193] O termo “fitase variante” conforme utilizado na presente invenção significa uma enzima fitase com uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos uma substituição, inserção e/ou deleção de aminoácido, quando comparada com a sequência de aminoácidos da fitase da SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 13. Os termos “variante” e “variação” conforme utilizados no presente significam apenas que há uma diferença de sequência entre a sequência de aminoácidos de uma fitase variante e a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou 13, e não significa de forma alguma que uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou 13 ou de qualquer outra fitase serviu como material de partida e/ou tenha sido fisicamente alterada, mutada, modificada ou alterada de outra forma para produzir a variante. Em termos práticos, as variantes de fitase para uso na presente invenção podem ser preparadas por qualquer método, e os técnicos hábeis no assunto estarão prontamente familiarizados com os diversos métodos, alguns dos quais descritos no presente, para fazer as variantes de fitase.

[0194] Exemplos de realização de fitases variantes (por exemplo, as variantes de fitase da *Buttiauxella sp.*) para uso na presente invenção são divulgados nos documentos WO 2006/043178, 2008/097619 e WO

PCT/US2009/41011 todos os quais são especificamente incorporados ao presente pela referência, e descrevem a obtenção de fitases a partir de, ou derivadas de uma *Buttiauxella* sp. parental e fitases que correspondem a uma enzima fitase de *Buttiauxella* sp. Especificamente, o WO 2006/043178 descreve a mutagênese de uma enzima fitase tipo selvagem possuindo a sequência divulgada no dito documento como SEQ ID NO: 3. Diversas mutações preferenciais são ensinadas no WO 2006/043178. A publicação PCT/US2009/41011 ensina mutações preferenciais adicionais. Mutações preferenciais específicas são divulgadas no presente como SEQ ID NO: 2-6, e estas representam:

[0195] Fitase BP-11 (por vezes referida como BP 11) - que é a fitase descrita pelo menos no pedido PCT WO 2006/043178 e que pode ser obtida a partir da Danisco A/S. A sequência de aminoácidos é descrita no presente como SEQ ID NO: 6.

[0196] Fitase BP-17 (por vezes referida como BP 17) - que é a fitase descrita pelo menos no pedido PCT WO 2008/097619 e que pode ser obtida a partir da Danisco A/S. A sequência de aminoácidos é descrita no presente como SEQ ID NO: 3.

[0197] BP-110 (por vezes referida como BP 17 var. 110, ou às vezes é referida como BP17-110 ou BP17 110) - que é a fitase descrita pelo menos no pedido PCT/US2009/41011. A sequência de aminoácidos é descrita no presente como SEQ ID NO: 4.

[0198] BP-111 (por vezes referida como BP 17 var. 111, ou às vezes é referida como BP17-111 ou BP17 111) - que é a fitase descrita pelo menos no pedido PCT/US2009/41011. A sequência de aminoácidos é descrita no presente como SEQ ID NO: 5.

[0199] BP-112 (por vezes referida como BP 17 var. 112, ou às vezes é referida como BP17-112 ou BP17 112) - que é a fitase descrita pelo

menos no pedido PCT/US2009/41011. A sequência de aminoácidos é descrita no presente como SEQ ID NO: 2.

[0200] As sequências de aminoácidos para a BP-11 (SEQ ID NO: 6), BP-17 (SEQ ID NO: 3), BP-110 (SEQ ID NO: 4), BP-111 (SEQ ID NO: 5) e BP- 112 (SEQ ID NO: 2) são apresentadas na Figura 3.

[0201] Quando se fizer referência as SEQ ID NOs: 1-6 e os polipeptídeos compreendendo as SEQ ID NOs: 1-6, contempla-se que a referência também seja feita aos polipeptídeos que são processados co- ou pós-traducionalmente durante a expressão, por exemplo, pela clivagem do peptídeo sinal. A clivagem pós-traducional também pode ocorrer no C-terminal. Portanto, em um exemplo de realização preferido do fragmento eficaz do mesmo (também referido como fragmento funcional do mesmo) é o polipeptídeo maduro produzido pelo hospedeiro nativo ou um hospedeiro de expressão adequado.

[0202] Em outro exemplo de realização, a fitase é caracterizada de modo que ela seja derivada de *Buttiauxella sp.* cepa P1-29 depositada sob número de acesso NCIMB 41248, conforme descrito no WO 2006/043178.

[0203] Os suplementos alimentares de acordo com a presente invenção podem incluir fitases possuindo melhora das características em relação a uma fitase parental resultante da modificação de um ou mais resíduos de aminoácidos na sequência de aminoácidos da fitase parental.

[0204] A enzima fitase melhorada para uso na presente invenção preferencialmente possui uma identidade com a SEQ ID NO: 3 ou um fragmento eficaz desta de mais de 75%, preferencialmente mais de 80%, mais preferencialmente mais de 90%, mais preferivelmente mais de 95 %, 96%, 97%, 98% e preferencialmente mais de 99%. No entanto, é também contemplado que os variantes podem ser heterólogos, (*ou seja*, não homólogos) a SEQ ID NO: 3. Por exemplo, variantes produzidas por técnicas de recombinação, como recombinação exo-mediada, ou por meio de transposição "*family shuffling*", pode

resultar em variantes que embora tenham sido preparadas usando a fitase parental, podem ter menos de 75% de homologia.

[0205] Adequadamente as variantes mostram características de estabilidade melhorada com respeito a qualquer um dos seguintes: estabilidade térmica, a atividade térmica, faixa de pH, estabilidade a pepsina, atividade específica, especificidade do substrato, e especificidade ao substrato mais ampla. Métodos adequados para a determinação dessas características são divulgados no presente.

[0206] O termo “maior estabilidade” no contexto de uma propriedade (tal como a estabilidade em altas temperaturas, menor pH, e etc.) refere-se a uma maior retenção da atividade da enzima ao longo do tempo, em comparação com outra fitase identificada, tal como a de *Buttiauxella*, SEQ ID NO: 1. A menos que outra fitase seja especificamente identificada, o termo “maior estabilidade” quando utilizado no presente, irá se referir a uma maior retenção da atividade da enzima ao longo do tempo em comparação com a fitase da SEQ ID NO: 1.

[0207] Os termos “termicamente estável” e “termoestável” referem-se a fitases da presente divulgação que retêm uma quantidade específica de atividade enzimática após a exposição a uma temperatura elevada. As fitase variantes de acordo com a presente divulgação são consideradas termoestáveis a uma temperatura especificada se a enzima mantiver atividade acima de 50% após a exposição à temperatura especificada por 10 minutos a pH 5,5 em tampão.

[0208] O termo “aumento da atividade térmica” quando se refere a variantes de fitase da presente divulgação, significa que a variante de fitase apresenta a mesma, ou uma quantidade maior de atividade da enzima fitase em temperatura elevada, em comparação com a atividade de outra fitase identificada, tal como a da SEQ ID NO: 1. 1. A menos que outra fitase seja especificamente identificada, o termo

“atividade térmica melhorada” quando usado no presente irá se referir à atividade térmica de uma fitase variante da presente divulgação, em comparação com a atividade térmica da fitase da SEQ ID NO: 1. 1.

[0209] Variantes da presente divulgação, conforme descrito no WO 2006/043178, WO 2008/097619 e PCT/US2009/41011, cujas divulgações são incorporadas ao presente pela referência, são descritas pela seguinte nomenclatura: [resíduo de aminoácido original da SEQ NO ID: 1 / posição do resíduo de aminoácido original na SEQ ID NO: 1 / resíduo de aminoácido substituído]. Por exemplo, na SEQ ID NO: 2, a substituição da treonina (T) pela alanina original (A) na posição 89 da SEQ ID NO: 1 é representado como A89T. Quando uma posição adequada para substituição é identificada sem a sugestão de um aminoácido específico, é preciso compreender que qualquer resíduo de aminoácido pode ser substituído no lugar do resíduo de aminoácido presente na posição. Quando uma fitase variante contém uma deleção em comparação com outras fitases, a deleção é indicada com “*”. Por exemplo, uma deleção na posição A89 da SEQ. ID NO: 1 é representada como A89*. Uma deleção de dois ou mais aminoácidos consecutivos é indicado, por exemplo, como (89-91) *.

[0210] Os termos “derivado” e “obtido a partir de” referem-se não só uma fitase produzida ou produzível por uma cepa do organismo em questão, como também uma fitase codificada por uma sequência de DNA isolado a partir de tal cepa e produzida em um organismo hospedeiro que contenha a dita sequência de DNA. Além disso, os termos referem-se a uma fitase que é codificada por uma sequência de DNA de origem sintética e/ou cDNA e que tem as características de identificação da fitase em questão. Assim, uma fitase que é “derivada de” e “obtida a partir de” uma outra fitase não significa necessariamente que a fitase foi derivada fisicamente ou obtida fisicamente a partir da segunda fitase, mas também pode significar que a fitase em questão foi preparada usando conhecimento ou ideias derivadas a partir do conhecimento

da segunda fitase.

[0211] Especificamente, as melhorias nas características da fitase são direcionadas para a estabilidade da enzima sob as condições de processamento de alimentos e rações, para a estabilidade da enzima durante o trânsito no estômago, e para a atividade enzimática e estabilidade no estômago e/ou trato intestinal de humano ou animal tornando os variantes melhorados particularmente adequados para uso como suplemento alimentar.

[0212] Assim, tais melhorias compreendem entre outros parâmetros, o aumento da estabilidade em temperaturas elevadas, preferencialmente em temperaturas acima de 65 °C, o aumento de estabilidade contra a digestão proteolítica, preferencialmente contra a proteases do trato digestivo, como a pepsina, o aumento da atividade catalítica em pH baixo, preferencialmente atividade catalítica em pH abaixo de 5,5, e a eficiência geral na liberação de grupos fosfato a partir do fitato, e preferencialmente em fosfatos de inositol.

[0213] Portanto, em alguns exemplos de realização a invenção refere-se a suplementos alimentares compreendendo variantes de fitase com características melhoradas que, quando comparadas com a fitase parental, compreendem mutações em um ou mais das posições divulgadas no WO 2006/043178, WO 2008/097619 e PCT/US2009/41011 e/ou nas posições correspondentes em uma fitase homóloga a fitase conforme exibido na sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Estas posições são caracterizadas de modo que a mutagênese destas posições leva a uma melhora nas características das enzimas.

[0214] Variantes com maior estabilidade térmica (diferença de estabilidade térmica) são preferencialmente determinadas pelos métodos divulgados no WO 2006/043178.

[0215] A enzima fitase variante para uso na presente invenção

têm preferencialmente uma diferença de estabilidade térmica (TD) de pelo menos 1,5, mais preferencialmente de 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19 e mais preferencialmente de pelo menos 20.

[0216] Variantes com maior estabilidade proteolítica são preferencialmente determinadas pelos métodos divulgados no WO 2006/043178.

[0217] Preferencialmente a enzima fitase variante para uso na presente invenção possui uma estabilidade proteolítica (atividade residual) de pelo menos 45%, preferencialmente de 50%, 55%, mais preferencialmente de pelo menos 60% ou 65%, mais preferencialmente ainda de pelo menos 70%.

[0218] Preferivelmente a fitase variante para uso na presente invenção possui uma atividade específica superior a 100% da atividade do tipo selvagem em pH 4,0, e preferencialmente superior a 105%, 110%, e mais preferivelmente superior a 114%.

[0219] Em um aspecto, a sequência de aminoácidos está preferencialmente na forma purificada. O termo “purificado” significa que a sequência está em um estado relativamente puro, pelo menos, 1%, 5% puro ou 10% puro, mais preferencialmente pelo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% puro. Em um exemplo de realização preferido, ao se referir a um polipeptídeo, a pureza tal como definido acima é determinada em termos de ser purificada a partir de outros polipeptídeos pela eletroforese SDS-PAGE.

VARIANTES / DERIVADOS

[0220] A presente invenção também abrange o uso de variantes, homólogos e derivados de qualquer sequência de aminoácidos de uma enzima ou de qualquer sequência de nucleotídeos que codifica tal enzima.

[0221] As sequências de aminoácidos variantes podem incluir grupos espaçadores adequados que podem ser inseridos entre quaisquer outros dois resíduos de aminoácidos da sequência, incluindo grupos alquila, tais como

grupos metila, etila ou propila, além de espaçadores de aminoácidos como resíduos de glicina ou β -alanina. Uma forma de variação adicional envolve a presença de um ou mais resíduos de aminoácidos na forma peptóide, e será bem compreendido pelos técnicos hábeis no assunto. Para que não restem dúvidas, “a forma peptóide” é usada para se referir a resíduos de aminoácidos variantes em que o grupo substituinte carbono alfa está no átomo de nitrogênio do resíduo ao invés do carbono. Processos para a preparação de peptídeos na forma peptóide são conhecidos no estado da técnica, por exemplo, Simon RJ *et al. PNAS* (1992) 89 (20), 9367-9371 e DC Horwell, *Trends Biotechnol.*(1995) 13 (4), 132-134.

OUTROS COMPONENTES

[0222] O suplemento alimentar da presente invenção pode ser usado em combinação com outros componentes ou veículos.

[0223] Veículos adequados para enzimas alimentares incluem maltodextrina, calcário (carbonato de cálcio), ciclodextrina, trigo ou um componente de trigo, sucrose, amido, agente antiespumante, Na_2SO_4 , Talco, PVA e misturas destes. Além disso, há uma série de técnicas de encapsulamento, incluindo aquelas baseadas em revestimentos com gordura/cera, adição de gomas vegetais e etc.

[0224] Exemplos de outros componentes incluem um ou mais dos seguintes: espessantes, gelificantes, emulsionantes, ligantes, modificadores de cristais, adoçantes (incluindo adoçantes artificiais), modificadores de reologia, estabilizantes, antioxidantes, corantes, enzimas, transportadores, veículos, excipientes, diluentes, agentes lubrificantes, aromatizantes, corantes, agentes de suspensão, desintegrantes, ligantes de granulação e etc. Esses outros componentes podem ser naturais. Esses outros componentes podem ser preparados pelo uso de técnicas químicas e/ou enzimáticas.

[0225] Conforme utilizado no presente o termo “agente

espessante ou gelificante” conforme utilizado no presente refere-se a um produto que evita a separação retardando ou impedindo o movimento de partículas, tanto de gotículas de líquidos imiscíveis como de ar ou sólidos insolúveis.

[0226] O termo “estabilizante”, conforme usado no presente é definido como um ingrediente ou combinação de ingredientes que protege o produto (por exemplo, um produto alimentar) da modificação ao longo do tempo.

[0227] O termo “emulsificante” conforme utilizado no presente refere-se a um ingrediente (por exemplo, um ingrediente de produtos alimentares) que impede a separação de emulsões.

[0228] Conforme utilizado no presente o termo “ligante” refere-se a um ingrediente (por exemplo, um ingrediente alimentar) que liga o produto em conjunto por meio de uma reação física ou química.

[0229] O termo “modificador de cristal” conforme utilizado no presente refere-se a um ingrediente (por exemplo, um ingrediente alimentar) que afeta a cristalização de uma gordura ou água.

[0230] “Transportadores” ou “veículos” designam materiais adequados para a administração de compostos e incluem qualquer material conhecido no estado da técnica, como, por exemplo, qualquer tipo de líquido, gel, solvente, diluente líquido, solubilizante, ou similar, que seja atóxico e que não interaja com qualquer componente da composição de forma deletéria.

[0231] Exemplos de veículos nutricionalmente aceitáveis incluem, por exemplo, grão, água, soluções de sal, álcool, silicone, ceras, vaselinas, óleos vegetais, e similares.

[0232] Exemplos de outros excipientes incluem um ou mais dos seguintes: celulose microcristalina e outras celulosas, lactose, citrato de sódio, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio dibásico, glicina, amido, lactose e polietileno glicóis de alto peso molecular.

[0233] Exemplos de outros desintegrantes incluem um ou

mais dos seguintes: amido (preferencialmente de milho, batata ou amido de tapioca), glicolato de amido sódico, croscarmelose sódica e alguns silicatos complexos.

[0234] Exemplos de ligantes de granulação podem incluir um ou mais dos seguintes: polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), hidroxipropilcelulose (HPC), sacarose, maltose, gelatina e acácia.

[0235] Exemplos de agentes lubrificantes incluem um ou mais dos seguintes: estearato de magnésio, ácido esteárico, gliceril behenato e talco.

[0236] Exemplos de diluentes incluem um ou mais dos seguintes: água, etanol, propilenoglicol e glicerina, e combinações destes.

[0237] Os outros componentes podem ser usados simultaneamente (por exemplo, quando eles estão juntos em uma mistura ou mesmo quando eles são entregues por vias diferentes) ou sequencialmente (por exemplo, eles podem ser entregues por vias diferentes).

[0238] Conforme utilizado no presente a expressão “componente adequada para o consumo animal ou humano” significa um composto que é ou pode ser adicionado à composição da presente invenção como um suplemento que pode ser nutricionalmente benéfico, um substituto de fibra ou ter um efeito geral benéfico para o consumidor.

[0239] A título de exemplo, os componentes podem ser prebióticos, como alginato, xantana, pectina, goma de alfarroba (LBG), inulina, goma guar, galacto-oligossacarídeos (GOS), fruto-oligossacarídeos (FOS), lactosucrose, oligossacarídeos de soja, palatinose, isomalto-oligossacarídeos, gluco-oligossacarídeos e xilo-oligossacarídeos.

ENZIMAS LIPOLÍTICAS

[0240] Enzimas lipolíticas (CE 3.1.1.3), que podem ser definidas como carboxilesterases que catalisam a hidrólise de acilgliceróis, são enzimas muito importantes do ponto de vista fisiológico como uma das três

principais enzimas digestivas, juntamente com as amilases e proteases. Elas hidrolisam lipídeos em glicerol e ácidos graxos, mas também podem funcionar em reações de esterificação ou transesterificação.

[0241] Em exemplos de realizações preferidos, a enzima lipolítica para uso na presente invenção é uma enzima lipolítica derivada do fungo filamentoso *Aspergillus tubingensis* conforme divulgado no WO 98/45453 e depositado sob os termos do Tratado de Budapeste com o NCIMB de 24 de Fevereiro de 1997, sob o número de acesso 40863. Deve-se compreender que a enzima lipolítica pode ser derivada do *Aspergillus*, ou alternativamente, pode ser produzida por meios recombinantes em outro organismo, tal como a *E. coli*.

[0242] Preferencialmente, a enzima lipolítica compreende um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos exibida na SEQ ID NO: 7 ou 8 ou um polipeptídeo possuindo pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 99% de identidade com a dita enzima, ou um polipeptídeo que é produzido pela expressão de uma sequência de nucleotídeos que compreende a sequência SEQ ID NO: 9 ou 10, ou uma sequência que difere da SEQ ID NO: 9 ou 10 devido à degeneração do código genético, ou uma sequência que tem pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 99% de identidade com a SEQ ID NO: 9 ou 10.

[0243] Deve ser compreendido que qualquer definição geral das características divulgadas com relação às fitases pode ser igualmente aplicada às enzimas lipolíticas e, por uma questão de concisão não serão repetidas aqui.

[0244] Em um exemplo de realização preferido, a enzima lipolítica para uso na presente invenção é produzido em uma célula de *Trichoderma reesei* conforme divulgado no presente.

[0245] O método de produção de uma enzima lipolítica, compreendendo as etapas de:

(i) fornecimento de uma célula de *Trichoderma reesei* compreendendo:

a) pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica compreendendo a sequência de aminoácidos exibida como a SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 8 ou uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7 ou 8; e/ou

b) pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica em que a sequência de nucleotídeos compreende a sequência nucleotídica exibida como SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10 ou uma sequência de nucleotídeos que possui pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10; e/ou

c) pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica em que a sequência de nucleotídeos compreende uma sequência nucleotídica que hibridiza com a SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10 ou uma sequência de nucleotídeos que possui pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10; ou é complementar a qualquer uma destas sob condições estridentes; e

d) pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica em que a sequência de nucleotídeos é idêntica à sequência de nucleotídeos exibida como SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10, exceto pela degeneração do código genético; e

(ii) cultivo das células em condições que permitam a expressão da(s) dita(s) sequência(s) de nucleotídeos heteróloga(s) que codifica(m) a dita enzima lipolítica.

[0246] Será compreendido que, tal como definido no presente documento, o termo “condições estridentes” refere-se a lavagem a. 50 °C e 0.2 x SSC {1xSSC = 0,15 M de NaCl, 0,015 M de citrato de Na₃ em pH 7,0}.

[0247] Será compreendido que estas condições também

podem ser elevadas para condições altamente estridentes que são definidos aqui como lavagens a 65 °C e 0.1xSSC {1xSSC = 0,15 M de NaCl, 0,015 M de citrato de Na₃; pH 7,0}.

[0248] Alternativamente, é fornecido um método para a produção de uma enzima lipolítica compreendendo as etapas de:

(i) transfecção ou modificação de uma célula de *Trichoderma reesei* com:

a) pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica compreendendo a sequência de aminoácidos exibida como a SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 8 ou uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7 ou 8; e/ou

b) pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica em que a sequência de nucleotídeos compreende a sequência nucleotídica exibida como SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10 ou uma sequência de nucleotídeos que possui pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10; e/ou

c) pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica em que a sequência de nucleotídeos compreende uma sequência nucleotídica que hibridiza com a SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10 ou uma sequência de nucleotídeos que possui pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10; ou é complementar a qualquer uma destas sob condições estridentes; e

d) pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica em que a sequência de nucleotídeos é idêntica à sequência de nucleotídeos exibida como SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10, exceto pela degeneração do código genético; e

(ii) cultivo das células em condições que permitam a expressão da(s)

dita(s) sequência(s) de nucleotídeos heteróloga(s) que codifica(m) a dita enzima lipolítica.

[0249] Além disso, é fornecido um método para a produção de uma enzima lipolítica compreendendo as etapas de:

(i) transfecção ou modificação de uma célula de *Trichoderma reesei* com:

a) pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica compreendendo a sequência de aminoácidos exibida como a SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 8 ou uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7 ou 8; e/ou

b) pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica em que a sequência de nucleotídeos compreende a sequência nucleotídica exibida como SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10 ou uma sequência de nucleotídeos que possui pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10; e/ou

c) pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica em que a sequência de nucleotídeos compreende uma sequência nucleotídica que hibridiza com a SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10 ou uma sequência de nucleotídeos que possui pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10; ou é complementar a qualquer uma destas sob condições estridentes; e

d) pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica em que a sequência de nucleotídeos é idêntica à sequência de nucleotídeos exibida como SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10, exceto pela degeneração do código genético; e

(ii) repetindo a etapa (i) na célula para transfectar sequencialmente ou modificar a célula com pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga

adicional conforme definido em (i)(a), (i)(b) ou (i)(c); (por exemplo, como uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica compreendendo a sequência de aminoácidos exibida como SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 8 ou uma sequência de aminoácidos que tem identidade de sequência, de pelo menos 40%, com a SEQ ID NO: 7 ou 8); e

(iii) cultivo das células em condições que permitam a expressão da(s) dita(s) sequência(s) de nucleotídeos heteróloga(s) que codifica(m) a dita enzima lipolítica.

[0250] A *Trichoderma reesei* é capaz de produzir as enzimas lipolíticas em rendimentos significativamente elevados.

[0251] Além disso, as enzimas lipolíticas produzidas pela metodologia divulgada na presente invenção não são hiperglicosiladas e, portanto, possuem boa atividade enzimática.

[0252] Bradner *et al.* (Em *Current Genetics*, 44: 224-230, (2003)) utilizou a *Trichoderma reesei* como organismo hospedeiro para expressão em suas buscas por enzimas lipolíticas desconhecida anteriormente. Uma enzima lipolítica a partir de um *Penicillium allii* isolado da Antártida foi clonada e expressa em *Trichoderma reesei*. Bradner *et al.* concluíram que os métodos descritos seriam úteis para a prospecção de genes de enzimas lipolíticas potencialmente novos, mas nenhuma sugestão foi feita sobre o *T. reesei* poder ser utilizado para a sobre expressão de proteínas.

[0253] Também divulgado em outro aspecto, está um método para a produção de uma enzima lipolítica compreendendo as etapas de:

(i) fornecimento de uma célula de *Trichoderma reesei* transformada ou transfectada compreendendo pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica;

(ii) cultivo das células em pH 4 a 5,5 em condições que permitam a expressão da(s) dita(s) sequência(s) nucleotídicas heteróloga(s) que codifica(m) a

dita enzima lipolítica.

(iii) isolamento, purificação ou concentração da enzima em um meio com pH 5,5 a 6,5.

[0254] Neste aspecto, a enzima lipolítica preferencialmente:

a) compreende uma sequência de aminoácidos exibida como SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 8 ou compreende uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7 ou 8, e/ou

b) é codificada por uma sequência nucleotídica que compreende a sequência exibida como SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10; ou compreende uma sequência nucleotídica que tem pelo menos 70% de identidade de sequência com a sequência SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10; e/ou

c) é codificada por uma sequência nucleotídica que compreende uma sequência de nucleotídeos que hibridiza com a SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10; ou compreende uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 70% idêntica com a sequência SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10; ou é complementar a qualquer uma destas sequências sob condições estridentes; e/ou

d) pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica na qual a sequência de nucleotídeos é idêntica à sequência de nucleotídeos exibida como SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10, exceto pela degeneração do código genético.

[0255] Adequadamente, pode haver pelo menos uma sequência de nucleotídeos heterólogas que codifica a enzima lipolítica na célula *Trichoderma reesei*. Deve haver duas ou mais cópias (ou seja, cópias múltiplas), ou cada sequência de nucleotídeos heterólogas que codifica a enzima lipolítica de acordo com a presente invenção na célula *Trichoderma reesei*. Cada sequência de nucleotídeos heterólogas está associada e está sob o controle de um promotor. Adequadamente cada sequência de nucleotídeos heterólogas

pode ter um promotor independente associado a ele e estar sob o controle desse promotor. Os promotores podem ser iguais ou diferentes.

[0256] Assim, a célula de *Trichoderma reesei* pode compreender ou ser transfectadas ou transformadas com pelo menos duas sequências de nucleotídeos heterólogas que codifica a enzima lipolítica.

[0257] Adequadamente, a (ou cada) sequência de nucleotídeos heteróloga pode compreender uma sequência de nucleotídeos que codifica um peptídeo sinal, em que tal sequência de nucleotídeos que codifica o dito peptídeo sinal está operacionalmente ligado a sequência de nucleotídeos que codifica a dita enzima lipolítica. Se houver várias sequências de nucleotídeos heterólogas e quando mais de uma possuir uma sequência sinal associada a esta, então as sequências sinais pode ser a mesma ou diferentes.

[0258] Adequadamente a enzima lipolítica pode compreender um peptídeo sinal endógeno ou exógeno. Quando o peptídeo sinal é endógeno - isso significa que o peptídeo sinal é aquele que está naturalmente ligado com a enzima lipolítica quando produzido naturalmente. Por exemplo, o peptídeo sinal pode ser o peptídeo sinal no *Aspergillus tubingensis*, que está naturalmente ligado com a enzima lipolítica quando encontrado no *Aspergillus tubingensis*.

[0259] O termo “heterólogo” conforme utilizado no presente significa que é não ocorre naturalmente na célula de *Trichoderma reesei*. Em outras palavras, é exógeno para a célula de *Trichoderma reesei*. Por exemplo, o termo “sequência de nucleotídeos heteróloga” conforme utilizado no presente significa que a sequência de nucleotídeos não ocorre naturalmente na célula de *Trichoderma reesei*.

[0260] Em outras palavras, a sequência de nucleotídeos é exógeno para a célula *Trichoderma reesei*. O termo também inclui cópias múltiplas da sequência de ocorrência natural, como tal, várias cópias adicionais poderiam ser heterólogas.

[0261] A sequência de nucleotídeos heterólogos pode ser obtida ou a partir de um microrganismo, particularmente um fungo.

[0262] A sequência de nucleotídeos heterólogos pode ser obtida a partir de *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus tubingensis*.

[0263] Em exemplos de realização preferidos dos aspectos descritos acima, a dita célula de *Trichoderma reesei* tem pelo menos dois genes suprimidos que codificam enzimas não lipolíticas.

[0264] É fornecida ainda uma enzima lipolítica obtenível através dos métodos da presente invenção.

[0265] Também é fornecida uma célula de *Trichoderma reesei* transformada ou transfectada compreendendo:

a) pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma proteína enzima lipolítica possuindo pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7 ou 8; e/ou

b) pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica em que a sequência de nucleotídeos compreende a sequência nucleotídica exibida como SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10 ou uma sequência de nucleotídeos que possui pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10; e/ou

c) pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica em que a sequência de nucleotídeos compreende uma sequência nucleotídica que hibridiza com a SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10 ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 70% idêntica com a sequência SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10; ou é complementar a qualquer uma destas sob condições estridentes; e

d) pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica uma enzima lipolítica em que a sequência de nucleotídeos é idêntica à sequência de nucleotídeos exibida como SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10, exceto

pela degeneração do código genético; e

em que a dita célula de *Trichoderma reesei* tem pelo menos dois genes suprimidos que codificam enzimas não lipolíticas.

[0266] Preferencialmente, a dita célula de *Trichoderma reesei* de acordo com qualquer um dos aspectos descritos anteriormente tem pelo menos três genes suprimidos que codificam enzimas não lipolíticas.

[0267] Preferencialmente, a dita célula de *Trichoderma reesei* de acordo com qualquer um dos aspectos descritos anteriormente tem pelo menos quatro genes suprimidos que codificam enzimas não lipolíticas.

[0268] “Suprimido” significa que a célula não expressa a enzima não lipolítica relevante no mesmo nível que a célula não transformada/transfectada. Em alguns exemplos de realização, “suprimido” significa que a célula não expressa a enzima não lipolítica relevante. A supressão pode ser provocada por técnicas conhecidas no estado da técnica, tal como por deleções.

[0269] Preferencialmente, pelo menos um dos genes que codifica uma enzima não lipolítica que está suprimido é um gene da celulase.

[0270] Preferencialmente, pelo menos dois dos genes que codificam uma enzima não lipolítica que está suprimido são genes da celulase.

[0271] Um exemplo de pelo menos um dos genes que codifica uma enzima não lipolítica que está suprimido é um gene que codifica uma celobiohidrolase (por exemplo, CBHI ou CBHII).

[0272] Outro exemplo de pelo menos um gene que codifica uma enzima não lipolítica que está suprimido é um gene que codifica uma endoglucanase (por exemplo, EGI e EGII).

[0273] Em alguns exemplos de realização, a célula de *Trichoderma reesei* é uma célula em que um ou ambos os genes de codificação da celobiohidrolase (CBHI e CBHII) e/ou um ou ambos os genes de codificação

da endoglucanase (EGI e EGII) estão deletados ou interrompidos.

[0274] Adequadamente a célula de *Trichoderma reesei* pode ser uma célula não geneticamente modificada (*no-GMM*) ou derivada desta, por exemplo, uma derivada da cepa RL-P37. Adequadamente a célula de *Trichoderma reesei* pode ser uma derivada da cepa RL-P37, que é produzida usando o método descrito no Exemplo 7.

[0275] Em alguns exemplos de realização, a sequência de nucleotídeos heteróloga pode codificar uma enzima lipolítica compreendendo uma sequência de aminoácidos que tenha pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade, com a sequência SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO. 8.

[0276] Em alguns exemplos de realização, a sequência de nucleotídeos heteróloga pode codificar uma enzima lipolítica compreendendo uma sequência nucleotídica possuindo pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade de sequência com a sequência SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO. 10.

[0277] Preferencialmente, a sequência de nucleotídeos heteróloga codifica uma enzima lipolítica compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade, com a sequência SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO. 8.

[0278] Preferencialmente, a sequência de nucleotídeos heteróloga codifica uma enzima lipolítica e compreende uma sequência de nucleotídeos com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade de sequência com a sequência SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO. 10.

[0279] A identidade sequência de aminoácidos de uma série

de enzimas lipolíticas para a enzima lipolítica de *Aspergillus tubingensis* tendo a sequência mostrada na SEQ ID NO: 9 (também denominada de lipase 3 no presente) são apresentados na Tabela 1 abaixo.

TABELA 1

ENZIMAS LIPOLÍTICAS COM A IDENTIDADE DE SEQUÊNCIA PARA A ENZIMA LIPOLÍTICA DE
ASPERGILLUS TUBINGENSIS (LIPASE 3).

Enzimas lipolíticas de diferentes fungos	Nº De Acesso	% de identidade de sequência de aminoácidos
<i>A. niger</i> CBS 513.88	XP_001397501.1	93
<i>Aspergillus niger</i>	ABG73613.1	93
<i>Aspergillus niger</i>	ABG37906.1	93
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSCA4	XP_681315.1	61
<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	XP_001276337.1	57
<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	XP_001266329.1	60
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	XP_748138.1	59
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	XP_001818694.1	56
<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	XP_001218444.1	54
<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	CAP96359.1	55
<i>Aspergillus niger</i>	ABG73614.1	54
<i>Aspergillus niger</i>	XP_001393532.1	53
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	O59952.1	50
<i>Penicillium marneffe</i> ATCC 18224	XP_002147144.1	49
<i>Aspergillus oryzae</i> R	XP_001824529.1	44

Enzimas lipolíticas de diferentes fungos	Nº De Acesso	% de identidade de sequência de aminoácidos
<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	XP_001796872.1	45
<i>Penicillium cyclopium</i>	P61869.1	42
<i>Penicillium camemberti</i> .	1TIA_A.	42

[0280] A célula hospedeira de *Trichoderma reesei* pode ser qualquer célula de *Trichoderma reesei*. A célula pode ser considerada como sendo uma célula de *Trichoderma reesei* do tipo selvagem. A célula de *Trichoderma reesei* pode ser uma em que o(s) gene(s) que codifica(m) uma ou mais celobiohidrolases secretadas (CBHI ou CBHII) foi(foram) deletados ou interrompidos para que não fossem expressos. Adequadamente a célula de *Trichoderma reesei* pode ser uma célula não geneticamente modificada ou derivada desta, por exemplo, uma derivada da cepa RL-P37. Adequadamente a célula de *Trichoderma reesei* pode ser uma derivada da cepa RL-P37, que é produzida usando o método descrito no Exemplo 10.

[0281] A enzima pode ser produzida em um fermentador que se pode compreender cerca de 3 litros a cerca de 20 litros de meio de cultura. Em outro exemplo de realização, a presente invenção é realizada como uma fermentação em escala de 10 a 16 litros, e preferencialmente de 14 litros. Em um exemplo de realização, a fermentação é preferencialmente realizada com mais de cerca de 12 litros, e preferencialmente mais do que cerca de 14 litros.

[0282] A célula hospedeira de *Trichoderma reesei* é preferencialmente adequada para uso na fermentação em grande escala.

[0283] Em exemplos de realização preferidos, a produção de enzima lipolítica é realizada em escala comercial. A este respeito, a fermentação

é realizada em uma escala de fermentação de aproximadamente mais de 50.000 litros, e preferencialmente uma escala de fermentação maior do que cerca de 80.000 litros, e mais preferencialmente uma escala de fermentação maior do que cerca de 200.000 litros.

[0284] Em um exemplo de realização a proteína total produzida pelo método é bem superior a cerca de 20 g/litro.

[0285] Da proteína total produzida a maior parte é a enzima lipolítica desejada. Em um exemplo de realização a proteína total secretada produzida compreende pelo menos 50% da enzima lipolítica desejada. Em um exemplo de realização a proteína total secretada produzida compreende pelo menos 60% da enzima lipolítica desejada. Em um exemplo de realização a proteína total secretada produzida compreende pelo menos 70% da enzima lipolítica desejada. Em um exemplo de realização a proteína total secretada produzida compreende pelo menos 80% da enzima lipolítica desejada.

[0286] Adequadamente o método pode compreender a seleção de transformantes que foram selecionados para a produção da enzima lipolítica (produtores de grande quantidade da enzima desejada são preferencialmente selecionados).

[0287] Em um exemplo de realização adequado, o método pode compreender uma primeira fase da transformação em que uma célula de *Trichoderma reesei* é transformada com pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica a enzima lipolítica definida no presente, a seleção de transformantes que foram selecionados para a produção da enzima lipolítica (produtores de grande quantidade da enzima desejada são preferencialmente selecionados), e uma segunda etapa de transformação (ou seja, etapa de retransformação) de um transformante selecionado com pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga que codifica a enzima lipolítica definida na presente invenção, seguido por outra etapa de seleção de

novos transformantes que foram selecionados para a produção da enzima lipolítica (em que os produtores de grande quantidade da enzima desejada são preferencialmente selecionados).

[0288] Em alguns exemplos de realização, a enzima lipolítica para uso na presente invenção pode ser glicosilada. Em alguns exemplos de realização, a enzima lipolítica pode ser N-glicosilada no N32 (quando numeradas usando a SEQ ID NO: 8) ou em uma posição equivalente para outras enzimas lipolíticas de acordo com a invenção. Este aspecto pode dar vantagens significativas de modo que a atividade da enzima não é interrompida ou reduzida pela glicosilação da enzima. Sem querer se comprometer com a teoria, a redução na atividade da enzima lipolítica pode ser observada quando ela é produzida em outros hospedeiros, tais como *A. tubingensis* e acredita-se que isso ocorra devido ao excesso de glicosilação da enzima, pelo menos no sítio N242.

[0289] A enzima lipolítica produzida pelo método divulgado na presente invenção é, portanto, distinguível daquela a partir da qual a enzima lipolítica é produzida em outros hospedeiros, por exemplo, *A. tubingensis*, por causa do grau de glicosilação da enzima, particularmente no sítio N32. Em alguns exemplos de realização da presente invenção a enzima tem glicosilação, pelo menos, no sítio N32.

[0290] Uma enzima lipolítica adequada pode ser produzida com um peptídeo sinal. Em outras palavras, a sequência de nucleotídeos heteróloga à utilizada na presente invenção compreende uma parte dela que codifica um peptídeo sinal.

[0291] O peptídeo sinal pode ser usado para direcionar a secreção da enzima lipolítica através de uma membrana celular específica. As sequências de peptídeo sinal podem ser endógenas ou exógenas para a sequência que codifica a enzima lipolítica. Por exemplo, o peptídeo sinal pode

ser o peptídeo sinal que é endógena para a enzima lipolítica do *Aspergillus tubingensis*. Alternativamente, a sequência de codificação do peptídeo sinal pode ser obtida (ou é obténível) a partir de um gene da celobiohidrolase de *Trichoderma reesei*.

[0292] No entanto, pode ser usada qualquer sequência de codificação do peptídeo sinal de escolha capaz de direcionar a enzima lipolítica expressa na via de excreção de uma célula de *Trichoderma reesei*.

[0293] Quando nos referimos a melhorar um ou mais dos seguintes: expressão da enzima lipolítica, glicosilação da enzima lipolítica, atividade enzimática e/ou rendimento este é comparado com métodos convencionais de expressão desta enzima lipolítica. Por exemplo, é fornecida uma expressão melhorada da enzima lipolítica, glicosilação da enzima lipolítica, atividade enzimática e/ou rendimento em comparação com a produção da enzima lipolítica em outro organismo hospedeiro (ou seja, um organismo hospedeiro que não a *T. reesei*). Especificamente, há uma expressão melhorada da enzima lipolítica, glicosilação da enzima lipolítica, atividade enzimática e/ou rendimento da enzima lipolítica pela presente invenção (ou seja, produzida na célula *Trichoderma reesei*) em comparação com a expressão da mesma enzima lipolítica em uma célula de *Aspergillus tubingensis* (por exemplo, conforme ensinado no WO98/45453, incorporado ao presente pela referência).

[0294] O termo “glicosilação melhorada” conforme utilizado no presente significa que, preferencialmente, a glicosilação ocorre no N32 (quando numeradas usando a SEQ ID NO: 8). Sem querer se comprometer com a teoria, em algumas situações, a enzima lipolítica produzida em células hospedeiras que não a *T. reesei* (e particularmente em *Aspergillus tubingensis* (por exemplo, conforme ensinado no WO98/45453)) pode ser glicosilada (ou hiperglicosilada), particularmente no N242. Portanto, a enzima lipolítica produzida em células hospedeiras que não a *T. reesei* e particularmente em *Aspergillus tubingensis*

(por exemplo, conforme ensinado no WO98/45453) pode ser glicosilada tanto no sítio N32 quanto no N242. No entanto, e sem querer se comprometer com a teoria, o sítio N242 está na vizinhança de um dos resíduos de sítio ativo, ou seja, His258 da SEQ ID NO: 8. Assim, acredita-se que a glicosilação (ou hiperglicosilação) no sítio N242 pode levar a uma redução da atividade (ou seja, atividade da lipase) da enzima. A enzima lipolítica da presente invenção não possui essa redução na atividade. A glicosilação da enzima lipolítica da presente invenção podem ocorrer no sítio N32 que está distante dos resíduos de sítio ativo, tais como o His258.

[0295] O termo “atividade enzimática melhorada” conforme utilizado no presente, significa que a atividade lipase é a mesma ou maior do que a atividade da enzima lipolítica produzida naturalmente pelo *Aspergillus tubingensis*.

[0296] Por “atividade da enzima” queremos dizer, pelo menos, atividade de lipase. Atividade da enzima (atividade de lipase, por exemplo) pode ser mensurada utilizando os protocolos pertinentes estabelecidos abaixo na seção Exemplos.

[0297] Foi surpreendentemente descoberto que a enzima lipolítica produzida de acordo com o método divulgado na presente invenção é de fácil isolamento a partir do meio em que ela foi excretada - ou seja, o caldo de cultura (fermentação) - como níveis de expressão elevados são obtidos.

[0298] Assim, o método pode envolver uma ou mais das seguintes etapas para o meio em que a enzima lipolítica foi secretada após a cultura da célula: diluição do meio (de preferência com água); separação da(s) célula(s) a partir do meio; concentração do meio (preferencialmente quando o dito meio está livre de células); granulação do dito meio (preferencialmente quando o dito meio está livre de células).

[0299] O método também pode envolver as seguintes etapas

para o meio no qual a enzima foi secretada após a cultura da célula: diluição do meio (de preferência com água); separação da(s) célula(s) a partir do meio; concentração do meio (preferencialmente quando o dito meio está livre de células); granulação do dito meio (preferencialmente quando o dito meio está livre de células).

[0300] O método também pode envolver a adoção das seguintes etapas para o meio no qual a enzima foi secretada após a cultura da célula: diluição do meio (de preferência com água); separação da(s) célula(s) a partir do meio; concentração do meio (preferencialmente quando o dito meio está livre de células); e granulação do dito meio (preferencialmente quando o dito meio está livre de células).

[0301] Preferencialmente, o método envolve as seguintes etapas para o meio no qual a enzima foi secretada após a cultura da célula: diluição do meio com água; separação da(s) célula(s) a partir do meio; concentração do meio em que o dito meio está livre de células; granulação do dito meio em que o dito meio está livre de células.

[0302] Em um aspecto preferido, o método envolve as seguintes etapas para o meio no qual a enzima foi secretada após a cultura da célula: diluição do meio com água; separação da(s) célula(s) a partir do meio; concentração do meio em que o dito meio está livre de células; e opcionalmente a granulação do dito meio em que o dito meio está livre de células.

[0303] Preferencialmente a enzima lipolítica é precipitada para fora da solução no caldo de fermentação. Preferencialmente, a enzima lipolítica precipitada é resolubilizada pelo ajuste do pH. Preferencialmente, o pH é ajustado a um pH acima do pH do caldo de fermentação.

[0304] Além das vantagens mencionadas acima, outra vantagem da enzima produzida pelo método é que ele permite a produção em escala comercial da enzima lipolítica. O método permite que a enzima lipolítica

seja produzida em um alto rendimento.

[0305] Uma vantagem da enzima lipolítica divulgada no presente documento é que foi surpreendentemente descoberto que com ela é possível ir diretamente da etapa de transformação e etapa de seleção (ou seja, a partir da placa de microtitulação) diretamente para a fermentação em grande escala (por exemplo, fermentação de pelo menos 14 litros). Isto é surpreendentemente possível porque a etapa de seleção (particularmente os resultados da placa de microtitulação) são altamente preditivas do bom desempenho na fermentação em grande escala. Isto contrasta com os métodos convencionais, onde muitas vezes é necessário cultivar a cepa em frascos antes de ir para a fermentação em maior escala. Isto tem vantagens significativas na redução do tempo de produção e/ou simplificação do processo global e/ou redução de custos.

[0306] Uma outra vantagem é que os métodos descritos na presente invenção fornecem uma expressão maior/aumentada e/ou um rendimento melhorado da enzima lipolítica em comparação com métodos convencionais de expressão desta enzima lipolítica. Por exemplo, é fornecida uma expressão maior/aumentada e/ou com melhor rendimento da enzima lipolítica em comparação com a produção da enzima lipolítica em outro organismo hospedeiro (isto é, um organismo hospedeiro que não o *T. reesei*). Em particular, existe uma expressão aumentada e/ou um rendimento melhorado da enzima lipolítica (ou seja, produzida na célula *Trichoderma reesei*) em comparação com a expressão da mesma enzima lipolítica em uma célula de *Aspergillus tubingensis* (por exemplo, conforme ensinado no WO98/45453, incorporado ao presente pela referência).

[0307] Uma vantagem adicional é que a enzima lipolítica produzida em conformidade com os métodos divulgados na presente invenção é de fácil produção e isolamento e/ou purificação e/ou concentração.

[0308] Uma vantagem adicional é que a enzima lipolítica produzida de acordo com o método divulgado é de fácil resolubilização.

[0309] Uma vantagem adicional é que a enzima lipolítica produzida de acordo com o método divulgado pode ser usada como um granulado ou como uma solução.

ENZIMA LIPOLÍTICA

[0310] O termo “enzima lipolítica” conforme utilizado na presente invenção significa uma enzima com atividade de hidrólise do triacilglicerol (classificada como CE 3.1.1.3).

[0311] Adequadamente, a enzima lipolítica para uso na presente invenção pode exibir uma ou mais das seguintes atividades adicionais: atividade glicolipase (EC 3.1.1.26), atividade fosfolipase A2 (EC 3.1.1.4), atividade fosfolipase A1 (EC 3.1.1.32) ou atividade fosfolipase B (EC 3.1.1.5). O termo “atividade de glicolipase”, conforme utilizado no presente abrange a “atividade galactolipase”.

ISOLADA

[0312] Em um aspecto, a enzima lipolítica para uso na presente invenção está preferencialmente na forma isolada. O termo “isolado” significa que a enzima lipolítica é pelo menos substancialmente livre de outro componente com o qual a enzima lipolítica naturalmente está associada na natureza e como é encontrada na natureza. O termo “isolada” pode significar que a enzima lipolítica é pelo menos substancialmente livre de pelo menos um outro componente no meio de cultura na qual ela é produzida. A enzima lipolítica da presente invenção pode ser fornecida em uma forma na qual está substancialmente livre de um ou mais contaminantes com o qual a substância poderia estar associada, ou a qual a enzima pode ser produzida.

[0313] Assim, por exemplo, ela pode ser substancialmente livre de célula(s) ou um ou mais polipeptídeo(s) e/ou molécula(s) de ácido nucleico potencialmente contaminante(s). A enzima lipolítica pode ser isolada através da separação da(s) célula(s) a partir do caldo durante ou depois da fermentação,

para que a enzima lipolítica permaneça no caldo. A enzima lipolítica pode ser isolada, sujeitando o caldo de fermentação à separação de células por meio da filtração a vácuo.

PURIFICADA

[0314] Em um aspecto, a enzima lipolítica para uso na presente invenção está na forma purificada. O termo “purificado” significa que o dado componente está presente em um nível elevado. O componente é desejavelmente o componente predominantemente presente em uma composição. Preferencialmente, está presente em um nível de pelo menos cerca de 60%, ou pelo menos cerca de 65%, ou pelo menos cerca de 70%, ou pelo menos cerca de 75%, ou pelo menos cerca de 80% do dito nível que está sendo determinado em uma base peso seco/peso seco em relação à composição total sob consideração. Para alguns exemplos de realização o valor é de pelo menos cerca de 85% do dito nível que está sendo determinado em uma base peso seco/peso seco com relação à composição total sob consideração.

CONCENTRADA

[0315] Em um aspecto, a enzima lipolítica para uso na presente invenção é preferencialmente utilizada como um concentrado. O concentrado pode ser uma forma concentrada do meio em que a enzima foi excretada. Preferencialmente, o concentrado pode ser uma forma concentrada do meio em que a enzima foi secretada e na qual a(s) célula(s) foram removidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. ENSAIO DE LIPASE EM PH 5,5

[0316] Conforme usado na presente invenção, 1 LIPU (unidade de lipase) é definida como a quantidade de enzima que libera 1 mmol de H^+ por minuto nas condições descritas abaixo.

[0317] 5% (v/v) de substrato tributirina é preparado pela mistura 15,00 ml de tributirina, 50,00 ml de agente emulsificante e 235 ml de água

destilada por 20 segundos em um homogeneizador. O pH do substrato é ajustado para aprox. 5,4 com NaOH 0,5 M.

[0318] O agente emulsificante é preparado misturando 17,9 g de NaCl, 0,41 g de KH₂PO₄, 400 ml de água destilada e 450 ml de glicerol em um becker de 2000 ml. Sob agitação vigorosa é adicionado 6,0 g de goma arábica e a agitação continua até que a goma arábica esteja completamente dissolvida. A solução é transferida para um balão volumétrico de 1000 ml e preenchida até à marca com água destilada.

[0319] Para amostras secas: em um balão volumétrico é dissolvida uma quantidade de enzima calculada para dar uma solução final de aproximadamente 3,5 LIPU/ml na metade da diluição final e submetida a agitação magnética por 20 min.

[0320] Depois a agitação é feito o ajuste da diluição final com água destilada. Qualquer diluição adicional deve ser feita com água destilada. As amostras em solução são diluídas diretamente em água destilada e 25,00 mL de substrato é ajustado a 30,0 °C.

[0321] O pH é ajustado para 5,50 com NaOH/HCl

[0322] Enquanto sob agitação, é adicionado 2,00 mL de amostra, e inicia-se imediatamente o titulador *pH-stat*.

[0323] A titulação é interrompida após 6 minutos.

[0324] Calcular inclinação da curva de titulação. A curva de titulação é calculada a partir de dados entre 3 e 6 min. A curva deve estar no intervalo de 0,1-0,2 mL/min.

[0325] A atividade da enzima (LIPU/g) é calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{LIPU/g} = \frac{\text{ml/min.} \times N \times 1000 \times F \times \text{fator para tributirina}}{A \times 2}$$

$$A \times 2$$

ml/min.: inclinação da curva de titulação

N : normalidade de NaOH

F : Diluição da amostra

A : amostra pesada em Gram

2 : ml de amostra

2. ENSAIO DE LIPASE EM PH 3,5

[0326] 1 LPLU (unidade de lipase em pH baixo) é definido como a quantidade de enzima que produz 1 microequivalente de ácidos graxos livres por minuto nas condições descritas abaixo.

[0327] Substrato Trioctanoato: Trioctanoato glicerol 0,15%, Triton X-100 13%, NaCl 0,3%, e 120 mM de Glicina-HCl, pH 3,5. Os substratos foram preparados pela mistura de todos os componentes seguida pela agitação durante uma hora.

[0328] A solução da amostra de enzima é diluída em 50 mM de Glicina-HCl, pH 3,5.

[0329] O ensaio é realizado usando um analisador automatizado da Konelab (Thermo, Vantaa, Finlândia). 50 µl de substrato trioctanoato é equilibrado a 30 °C por 3 min antes de ser misturado com 10 µl de solução de amostra da enzima I, e incubado por 6 min a 30 °C. Ácidos graxos livres na mistura de reação forma mensurados usando o kit NEFA-HR (2) (WAKO Chemicals GmbH). 110 mL do reagente R1 do kit NEFA é adicionado à mistura de reação e incubado por 3 min a 30 °C antes da adição de 55 mL do reagente R2 do kit NEFA. A incubação é continuada por mais 4,5 min a 30 °C antes da OD₅₂₀ nm ser mensurada. O teor de ácidos graxos livres é calculado a partir de uma curva padrão preparada a partir do kit NEFA Standard (WAKO Chemicals GmbH).

[0330] 1 LPLU corresponde a 0,24 LIPU para a lipase de *Aspergillus tubingensis* (Fig. 5, SEQ ID NO. 7).

2. ENSAIO DE FITASE

[0331] Conforme utilizado no presente 1FTU (unidade de fitase)

é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mmol de ortofosfato inorgânico a partir de um substrato em um minuto nas condições de reação definidas no presente.

PRINCÍPIO:

[0332] A fitase é incubada com fitato de sódio, o que resulta na liberação de fosfatos inorgânicos. O fosfato inorgânico cria complexos corados com o reagente molibdato-vanadato que, dessa forma se torna amarelo. A cor amarela do complexo é mensurada no espectrofotômetro a 415 nm.

[0333] A quantificação da atividade é feita por um método absoluto usando uma curva padrão de fosfato.

Reagentes:

1.1 tampão acetato (pH 5,5) 0,25 M **1000**
mL

[0334] Dissolver:

30,02 g de acetato de sódio – Trihidratado (18,10 g de acetato de sódio - anidrato),

0,147 g de cloreto de sódio - dihidratado

1,76 g de ácido acético 100% (= 1,677 mL, densidade, = 1,0498 g/mL) em aprox. 900 mL de água;

[0335] Ajustar o pH para 5,5 com ácido acético 4 M (22,9 mL de ácido acético concentrado em 100,0 mL de água deionizada) e transferir a solução para um balão volumétrico de 1000 mL.

[0336] Adicionar 1 mL de Tween 20 a 10% e ajustar a solução para 1000 mL com a adição de água deionizada.

1.2 Dihidrogenofosfato de potássio 18 mM **1000**
mL

[0337] Solução estoque utilizada para curva padrão.

[0338] KH_2PO_4 seco a 60 °C durante a noite em uma estufa.

[0339] Pesar 2,45 g de KH_2PO_4 seco e diluir em tampão acetato (1,1). Ajustar para 1000,0 mL.

1.3 solução de fitato (substrato) 7,5 mM 250 mL

[0340] Dissolver:

2,10 g ($\pm 0,05$ g) de fitato de sódio, deca hidratado (ácido fítico) em 200 mL de tampão acetato.

[0341] Utilizar o termostato para manter a solução a 37 °C em banho-maria.

[0342] A 37 °C pH é ajustado para pH 5,5 pela adição de 4 M de ácido acético (24 g = 22,9 mL de ácido acético concentrado em 100,0 mL de água deionizada).

[0343] Ajuste para 250,0 mL pela adição de tampão acetato.

[0344] Um fator de correção de substrato pode ser necessário quando se mudar para outro lote de ácido fítico.

[0345] O fator de correção para ácido fítico Sigma P0109, lote 057K0049 é definida como 1,00

1.4 solução de ácido nítrico 24,5% 200 mL

[0346] (Para solução de vanadato de amônio)

[0347] 75 mL de ácido nítrico (65%) é adicionado a 100 mL de água, sob agitação contínua.

[0348] A solução é transferida para um balão volumétrico de 200 mL e ajustado com água deionizada.

1.5 solução de amônio 25% 50 mL

[0349] (Para a solução Heptamolibdato de amônio)

[0350] 40 mL de uma solução de amônio a 32% é ajustada para 50 mL com água.

1.6 solução de heptamolibdato de amônio 10% 250

mL

[0351] (Para reagente de cor/bloqueio)

[0352] Dissolver:

25 g heptamolibdato de amônio – tetrahidratado em 225 mL de água. A solução precisa ser aquecida para dissolver o heptamolibdato de amônio antes de adicionar a solução de amônia.

[0353] Adicionar 2,5 mL de solução de amônia (25%) (ver 1.5), desligar o aquecimento e deixe em agitador até estar totalmente dissolvido.

[0354] Quando resfriado a solução é transferida para um balão volumétrico de 250 mL, ajustado com água deionizada e misturada.

1.7 solução de vanadato de amônio 0,24% 250 mL

[0355] (Para reagente de cor/bloqueio)

[0356] Dissolver 0,5875 g de vanadato de amônio em 100 mL de água pré-aquecida a 60 °C. Adicionar lentamente 5 mL de solução de ácido nítrico 24,5%, sob agitação contínua.

[0357] Quando resfriado a solução é transferida para um balão volumétrico de 250 mL, ajustado com água deionizada e misturada.

1.8 Reagente de Cor / bloqueio 200 mL

[0358] Deve ser preparado imediatamente antes da utilização.

[0359] Pipetar 50 mL de solução de heptamolibdato de amônio (10%) em um balão volumétrico de 200 mL seguido de 50 mL de solução de vanadato de amônio (0,24%). Pipetar 33 mL de ácido nítrico 65%, sob agitação contínua. Ajuste para 200,0 mL pela adição de água deionizada e misturar.

Condições de reação

pH = 5.5

Temperatura de incubação = 37°C ±
0,1°C

Tempo de incubação = 60 minutos

Elaboração de uma curva padrão de fosfato (método absoluto)

[0360] Uma curva padrão usando o tampão KH_2PO_4 (1.2) é preparado. O padrão é diluído com tampão acetato.

$C_{\text{diluição}} = 0,0 \text{ mM}; 0,5 \text{ mM}; 1,0 \text{ mM}; 1,5 \text{ mM}; 2,0 \text{ mM}; 2,5 \text{ mM}; 3,0 \text{ mM}; 4,0 \text{ mM}$

[0361] Usar a seguinte equação:

$$C_{\text{solução estoque}} * V_{\text{solução estoque}} = C_{\text{diluição}} * V_{\text{diluição}}$$

$$V_{\text{solução estoque}} = (C_{\text{diluição}} * V_{\text{diluição}}) / C_{\text{solução estoque}}$$

Onde, C = concentração e V = volume

Concentração de fosfato final em mM	volume de KH_2PO_4 (18 mM) em um balão volumétrico de 50 mL	Volume de tampão acetato
0	0,0 mL	50,0 mL
0,5	1,4 mL	48,6 mL
1,0	2,8 mL	47,2 mL
1,5	4,2 mL	45,8 mL
2,0	5,6 mL	44,4 mL
2,5	6,9 mL	43,1 mL
3,0	8,3 mL	41,7 mL
4,0	11,1 mL	38,9 mL

[0362] 1,00 mL de amostra da curva padrão é misturada com 2,00 mL de reagente de cor/bloqueio seguido de 2,00 mL de solução Fitato. As amostras são incubadas em temperatura ambiente por 5-10 minutos, e a OD é mensurada (conforme foi feito com as amostras após a incubação).

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA:

[0363] 1A: Produtos líquidos (cerca de 5.500 FTU/g): 1 g de amostra é pesada em um balão volumétrico de 100 ml, o peso é anotado embaixo do mesmo, e o balão volumétrico é preenchido com tampão acetato.

[0364] 1B: Produtos secos (fitase formuladas apenas em veículo trigo/amido): 1 g de produto é pesado em um copo de vidro tipo beaker. 100 mL de tampão acetato são adicionados usando um dispensador ou proveta graduada. A amostra é agitada em um agitador magnético por 20 minutos. O extrato é filtrado através de um filtro de vidro.

[0365] 1C: Produtos secos (grânulos revestidos com um revestimento externo hidrofóbico): produtos secos: 1 g de produto é pesado em um copo de vidro tipo becker. 100 mL de tampão acetato são adicionados usando um dispensador ou proveta graduada. A amostra é agitada em um agitador magnético por 20 minutos. O extrato é deixado para a resolução, o produto revestido não deve ser filtrado através de um filtro de vidro.

[0366] 2: Preparar a diluição adicional da amostra. A faixa de OD preferida é de 0,4 -1,6. Se a concentração da amostra não é conhecida, os níveis de diluições típicos para trazer a atividade para dentro da faixa de ensaio são mostrados abaixo.

[0367] A atividade das amostras deve ser de aproximadamente 0,0300 U/mL.

[0368] As diluições devem ser preparadas imediatamente antes da determinação.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE:

[0369] Todas as amostras são analisadas ao mesmo tempo - controles, brancos e amostras. O ensaio deve ser executado em um fluxo contínuo.

[0370] **Todas as determinações são feitas como**

determinações em duplicatas ou triplicatas.

[0371] Um branco é incluído no início de cada série.

[0372] Um controle é incluído em cada série de tubos (controle de fitase ou amostra *Phyzyme XP* de atividade conhecida).

[0373] Amostras cegas: 1,00 mL de cada amostra é misturada com 2,00 mL de reagente de cor / bloqueio seguido de 2,00 mL de solução Fitato. As amostras são incubadas em temperatura ambiente por 60 minutos, centrifugadas e mensuradas com o restante das amostras.

AMOSTRAS:

1. Extrair 1,00 mL da amostra diluída ou controle 2 ou 3 vezes em tubos de plástico. Para brancos retirar 1,00 mL de tampão acetato.

2. Colocar a solução de fitato (substrato) em banho-maria a 37,0 °C por um período mínimo de 5 minutos até que equilibrado a 37 °C.

3. Incubar as amostras em banho-maria a 37,0 °C por exatamente 5 minutos.

4. Adicionar 2,00 mL de solução de fitato equilibrado para as amostras com um intervalo de tempo de exatamente 5 segundos.

5. Incubar em banho-maria a 37,0 °C por exatamente 60 minutos.

6. Adicionar 2,00 mL do reagente de cor/bloqueio, novamente com um intervalo de tempo de 5 segundos, colocar uma tampa e misturar virando de cabeça para baixo por 5 vezes.

7. Centrifugar por 10 min a 3500 rpm.

8. Mensurar em 415 nm. Ajustar o espectrofotômetro em zero com água desmineralizada.

[0374] Cálculo da atividade

[0375] OD do branco tem de ser $\leq 0,13$, se não a análise tem de ser repetida.

[0376] Gravar os dados em uma folha Excel

[0377] Fazer uma curva padrão e uma linha de tendência no

Excel:

a) eixo y = OD₄₁₅

b) eixo x = mM de fosfato

c) a inclinação (α) tem que estar dentro de 0,36-0,38

d) a interceptação (β) não deve exceder _0,02 _

e) o coeficiente de correlação (R^2) deve ser $\geq 0,99$

[0378] A atividade da fitase é calculada da seguinte forma:

$$\text{Atividade (FTU/g)} = \frac{((\text{OD}_{\text{amostra}} - \text{OD}_{\text{branco}}) - \beta) * \text{DF}}{\text{Tempo de incubação} * \alpha * W_{\text{amostra}}}$$

$$\text{Tempo de incubação} * \alpha * W_{\text{amostra}}$$

OD_{amostra} = significa absorbância média da amostra de enzima

OD_{branco} = significa absorbância média do branco para a enzima

DF = fator de diluição para a amostra

Tempo de incubação = 60 minutos

W_{amostra} = peso da amostra ou controle

α = inclinação da curva padrão

β = intercepto da curva padrão

ENSAIO DE FITASE EM PH 3,5

[0379] Isso ensaio é idêntico ao ensaio de fitase em pH 5,5, com as seguintes substituições:

[0380] **1,1 tampão de ensaio**, Glycine-HCL pH 3,5 (usado em vez de 1,1 tampão acetato pH 5,5):

250 ml glicina 0,2 M é misturada com 130 mL de HCl 0,2 M e 500 mL de água deionizada. O pH é ajustado para 3,5 com HCl 0,5 M ou NaOH 0,5 M. A solução é transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e ajustada para 1000ml por meio da adição de água deionizada.

[0381] 1,3 Solução de fitato (substrato) 7,5 mM (em 250 ml total):

[0382] Dissolver 2,10 g ($\pm$ 0,05 g) de fitato de sódio, deca hidratado (ácido fítico) em 200 mL de tampão de ensaio (glicina HCl pH 3,5).

[0383] Utilizar o termostato para manter a solução a 37 °C em banho-maria.

[0384] A 37 °C o pH é ajustado para pH 3,5 pela adição de HCl 4 M ou 4 M NaOH.

[0385] Ajuste para 250,0 mL pela adição de tampão de ensaio (pH 3,5). O balão contendo a solução precisa ser envolto em papel alumínio.

[0386] Prazo de validade: duas semanas

[0387] Um fator de correção de substrato pode ser necessário quando se mudar para outro lote de ácido fítico.

[0388] O fator de correção para o ácido fítico de lote 128H1234 (Sigma P-3168) é definido como 1,00.

[0389] Todas as diluições de enzimas e fosfato no método é feito com tampão de ensaio Glicina-HCl pH 3,5 em vez de tampão acetato pH 5,5

Exemplos

EXEMPLO 1

INTRODUÇÃO

[0390] Para ser eficiente como uma enzima aditiva em alimentos ou ração animal, uma fitase tem de combinar uma variedade de propriedades diferentes. A fim de ser capaz de degradar o ácido fítico no ambiente ácido do estômago de um animal ela tem que ser ativa em pH baixo, preferencialmente em uma ampla faixa de valores de pH. Além disso, ela tem que possuir alta atividade específica e alta estabilidade térmica para permitir que a proteína suporte as altas temperaturas comumente usadas na preparação de alimento para animais, tais como *pellets* de ração.

[0391] Também é importante que a enzima tenha ampla

especificidade de substrato permitindo que ela não só hidrolise o fitato como também produtos intermediários da degradação do fitato como inositol penta-fosfatos, tetra-fosfatos e tri-fosfatos. Estudos sobre a degradação do fitato em porcos mostram que estes oligofosfatos inositol permanecem em grande parte insolúveis no intestino delgado e grosso e, portanto, inacessíveis para fosfatase alcalina produzida pelo animal e microflora do intestino. Variações nos perfis de especificidade ao substrato de diferentes enzimas foram identificadas. Por exemplo, o inositol-trifosfato gerado pela fitase de *B. subtilis* são essencialmente mais resistentes à hidrólise por esta enzima.

[0392] Adequadamente estes variantes mostram características melhoradas com relação a qualquer um dos seguintes: estabilidade térmica, faixa de pH, estabilidade à pepsina, atividade específica, a especificidade mais ampla ao substrato. Métodos adequados para a determinação dessas características são divulgados no presente.

[0393] Especificamente, as melhorias nas características da fitase são direcionadas para a estabilidade da enzima sob as condições de processamento de alimentos e rações, para a estabilidade da enzima durante o trânsito no estômago, e para a atividade enzimática e estabilidade no estômago e/ou trato intestinal de humano ou animal tornando os variantes melhorados particularmente adequados para uso como suplemento alimentar. Assim, tais melhorias compreendem entre outros parâmetros, o aumento da estabilidade em temperaturas elevadas, preferencialmente em temperaturas acima de 65 °C, o aumento de estabilidade contra a digestão proteolítica, preferencialmente contra a proteases do trato digestivo, como a pepsina, o aumento da atividade catalítica em pH baixo, preferencialmente atividade catalítica em pH abaixo de 5,5, e a eficiência geral na liberação de grupos fosfato a partir do fitato, e preferencialmente em fosfatos de inositol.

[0394] Melhorias nas características de fitase são direcionadas

para o uso no processamento de alimentos e rações, bem como para o uso como um aditivo para alimentos e produtos para alimentação animal. Em particular, as melhorias são direcionadas para a estabilidade sob as condições de processamento de alimentos e rações, para a estabilidade durante o trânsito no estômago, e para a atividade e estabilidade no estômago e/ou trato intestinal humano ou animal. Tais melhorias compreendem entre outros parâmetros, o aumento da estabilidade em temperaturas elevadas, preferencialmente em temperaturas acima de 65 °C, o aumento de estabilidade contra a digestão proteolítica, preferencialmente contra a proteases do trato digestivo, o aumento da atividade catalítica em pH baixo, preferencialmente atividade catalítica em pH abaixo de 5,5, e a eficiência geral na liberação de grupos fosfato a partir do fitato.

[0395] O aumento da estabilidade a temperaturas elevadas é quantificado pela temperatura de inativação da enzima. A temperatura de inativação é definida como a temperatura na qual a atividade residual de uma enzima fitase após incubação durante um certo período, seguido do resfriamento até a temperatura ambiente é de 50% da atividade residual da mesma enzima fitase incubada pelo mesmo período, nas mesmas condições em temperatura ambiente. As diferenças de termoestabilidade são as diferenças em °C entre as temperaturas de inativação de duas enzimas.

EXEMPLO 2

ESTABILIDADE À PEPSINA

[0396] Resistência à pepsina em pH 2 das fitases de *Buttiauxella*, variantes BP-17, BP-110, BP-111, BP-112, e *Phyzyme XP* em comparação com *Natuphos* (BASF), e *Ronozyme P* (Novozymes / DSM).

MATERIAIS E MÉTODOS

Tampões:

[0397] Tampão de incubação de pepsina: 0,1 M de Glicina-HCl, pH 2,0, 3 mg/ml de BSA, 2,9 mg de cloreto de sódio anidro/mL, 0,73 mg de

cloreto de cálcio/mL. Para soluções com pepsina, o tampão de incubação está preparado para conter 500, 1000, 3000, 6000, ou 10.000 U/ml de pepsina (Sigma P-7000, 10.000 U/mg corresponde a 27 mg/ml), respectivamente. Uma unidade de pepsina é definida como a quantidade de enzima que irá produzir um ΔOD_{280} de 0,001 por min em pH 2,0 a 37 ° C, mensurado como produtos TCA-solúveis usando hemoglobina como substrato (*Food Chemical Codex*).

[0398] Tampão de ensaio de fitase: tampão acetato 250 mM, pH 5,5

[0399] Tampão de ensaio de Fitase com BSA: tampão acetato 250 mM, pH 5,5, com 3mg/ml BSA

Resistência contra concentrações crescentes de pepsina:

[0400] As configurações para todas as enzimas foram as mesmas: Seis amostras com enzima foram preparadas (em duplicatas): Quatro amostras com quantidades crescentes de pepsina em solução tampão (pH 2), uma amostra sem pepsina, mas em tampão de incubação (pH 2), e uma amostra controle positivo com a enzima em tampão de ensaio com BSA (pH 5,5).

[0401] Para cada amostra, 900 mL tampão de incubação, sem ou com quantidades crescentes de pepsina ou 900 mL tampão de ensaio foram misturados com 100 mL de solução enzimática seguido pela incubação a 40 °C. Após a incubação por 120 min, 100 µl foi retirado e misturado com 900 µL de tampão de ensaio. As amostras foram analisadas imediatamente quanto a fitase em pH 5,5 contra a curva padrão de fosfato, conforme descrito pelo projeto de norma internacional ISO ISO/DIS 30024.

RESULTADOS

RESISTÊNCIA À PEPSINA

[0402] Todas as variantes de *Buttiauxella* mostraram uma excelente estabilidade em relação a pepsina em pH 2. Em contraste, a atividade do *Natuphos* foi drasticamente reduzida já em uma concentração de pepsina de 500

U/ml, com atividade ainda mais reduzida encontrando um platô de cerca de 45% de recuperação em uma concentração de pepsina de 3000 U/ml. A recuperação de *Ronozyme P* foi ainda pior, com uma redução na recuperação de menos de 20% a uma concentração de pepsina de apenas 500 U/mg (Fig. 9A).

[0403] A Figura 9 exibe a resistência das fitases provenientes da *Buttiauxella*, variantes BP-17, BP-110, BP-111 e BP-112, e da *Phyzyme XP*, *Natuphos*, e *Ronozyme P* contra concentrações crescentes de pepsina. Os dados são relativos à incubação em pH 2 sem pepsina. A: todos os pontos de dados, B: mesmos dados, mas mostrando apenas recuperações maiores que 70%.

Nível de Pepsina	BP-17	BP-17 v. 110	BP-17 v. 111	BP-17 v112	Phyzyme XP	Natuphos	Ronozyme P, nova
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
500	87%	96%	98%	85%		61%	19%
1000	81%	98%	96%	85%		51%	16%
3000	82%	96%	94%	84%	93%	44%	17%
6000	82%	92%	89%	80%	89%	45%	18%
10000	86%	95%	94%	79%	98%	46%	21%

[0404] Tabela 1. Mesmos dados, tal como apresentado na Figura 9.

[0405] Existem pequenas diferenças entre os variantes de *Buttiauxella*, onde o BP-17 var.110 apresenta melhor estabilidade com atividade de 95% depois de duas horas de incubação na maior concentração de pepsina, 10.000 U/mL (Fig. 9B). Em comparação, a BP-17 mostrou uma recuperação de cerca de 85% após duas horas de incubação.

[0406] As fitases de *Buttiauxella* também exibiram estabilidade

excelente ao ácido. Comparando a atividade mensurada em pH 5,5 após duas horas de incubação e tanto em pH 2 quanto em pH 5.5 foi demonstrado que as quatro fitases de *Buttiauxella* não perderam atividade durante o período de incubação de 2 horas em pH 2 enquanto a Phyzyme XP, Natuphos, e a nova Ronozyme P exibiram redução ligeiramente significativa na atividade (Tabela 2).

	BP-17	BP-17 v. 110	BP-17 v. 111	BP-17 v112	Phyzyme XP	Natuphos	Ronozyme P, nova
Tampão de ensaio	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
pH2, sem pepsina	101%	102%	106%	120%	83%	90%	67%

[0407] Tabela 2. A atividade mensurada em pH 5,5 após a incubação em tampão em pH 2 ou pH 5,5 por duas horas. Os números são relativos à atividade das amostras incubadas em pH 5,5.

RESUMO DE DADOS

[0408] As fitases de *Buttiauxella* variantes de acordo com a presente invenção exibiram mais de 75% de recuperação após 2 horas de incubação em 10000 U/ml de pepsina pH 2, a 37 °C, em comparação com a atividade de amostras incubadas nas mesmas condições, mas sem a presença da pepsina.

EXEMPLO 3

RECUPERAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

[0409] Avaliação da recuperação da atividade enzimática

[0410] Materiais e Métodos

[0411] Aqui, nós avaliamos a recuperação da atividade da enzima após a peletização da enzima formulado com trigo. A enzima é pulverizada sobre trigo granulado e seca antes de ser misturada com ração

seguido pelo processo de peletização.

[0412] As enzimas líquidas foram formuladas sobre o trigo integral triturado e secas a um teor de matéria seca de aproximadamente 90%. A inativação das enzimas durante o estresse térmico no processo de peletização foi testada usando uma unidade de granulação no Instituto Tecnológico em Kolding (esquemáticamente apresentado na Figura 10). A amostra teste é adicionada a 10 kg de pré-mistura e misturada por 10 min. Então 10 kg de pré-mistura foi adicionado a 150 kg de ração (misturador horizontal de grande porte) e misturado por 15 min antes do condicionamento/vapor. A ração é tratada por 30 seg. a 90 °C/95 °C antes de granulação. A temperatura é mensurada na saída do misturador em cascata. Imediatamente após a saída da prensa de peletização os *pellets* são resfriados à temperatura ambiente.

[0413] A atividade da fitase foi mensurada de acordo com a metodologia recitada na presente invenção.

[0414] A atividade da fitase é de 5 unidades por gm na massa de ração antes da peletização.

RESULTADOS

[0415] Os resultados são apresentados nas Figuras 11 a 13.

[0416] Na Figura 11, são divulgados os resultados dos ensaios de peletização de três variantes de *Fitase B* de acordo com a presente invenção. As enzimas foram formuladas sobre o trigo integral triturado e secas para um teor de água aproximado de 10%. Aqui, a recuperação da atividade da fitase após a peletização para a BP-17 var 111 é de 90% a 90 °C em comparação com uma recuperação de 19% a 90 °C para a BP 17.

[0417] Com relação as enzimas *Phyzyme XP*, uma fitase *E coli* foi formulada sobre o trigo integral triturado. Os resultados são exibidos

na Figura 12. Aqui, a recuperação da atividade da fitase após a peletização a 90 °C a partir dos três lotes de *Phyzyyme XP* formulada sobre o trigo integral triturado é de 47%.

[0418] A *Ronozyme* também foi testada. O produto é vendido em uma versão revestida, para proteger a enzima do calor no processo de peletização. Neste ensaio a fitase foi extraída do produto revestido e formulada sobre o trigo integral triturado para estudar a termoestabilidade da molécula de fitase sem a proteção. Os resultados são exibidos na Figura 13.

Resumo de dados

[0419] As fitases de variantes de *Buttiauxella* da presente invenção formuladas sobre o trigo mostram mais de 70% de recuperação após serem peletizadas a 90 °C.

EXEMPLO 4

DEGRADAÇÃO DE ÁCIDO FÍTICO

Resultados a partir de um estudo de degradação de ácido fítico pela fitase

Soluções:

[0420] Três tampões diferentes foram usados na incubações. Eles foram os seguintes:

250mM de acetato, pH 5,5;

250 mM de acetato M pH 3,5; e

250 mM de HCl de glicina pH 2.5.

Todas as fitases usadas na incubações foram diluídas em tampão de ensaio para o nível da enzima a 1 U/ml.

[0421] A solução de substrato fitato usada na incubação é de 1% de Fitato (tampão 1g/100ml).

[0422] O substrato é preparado no mesmo tampão utilizado para a diluição das fitases para manter o nível de pH constante na reação.

[0423] A reação é bloqueada pela adição de HCl 1M.

Incubação

[0424] Os volumes de incubação são: 1,5 ou 3,0 ml de Fitato + 0,25 ml de enzima + 3,25 ou 1,75 ml de tampão a 37 °C, em um volume total de 5,0 ml.

[0425] Sub-amostras de 0,5 ml são tomadas em momentos diferentes (0, 30, 60 e 90 min).

[0426] Um tubo tipo *ependorf* é preparado com 0,2 ml de HCl 1M para cada sub-amostra antes da sub-amostragem. Misturando o sub-amostra da incubação com HCl a reação enzimática é encerrada. Cada sub-amostra de 0,7 ml é armazenada a 4 °C até a análise por HPLC.

Método de HPLC

[0427] Análise de fitato e isômeros de inositol foi feita por cromatografia iônica de alta performance (HPIC). Este método foi descrito por Skoglund e Carlsson *et al.* (*J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997), 451-436 5. *J. Agric. Food Chem*, 46 (1998), 1877-1882;. E *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001), 11695-1701. A coluna utilizada foi um trocador de ânions fortes (4 x 250mm) da Dionex com uma pré-coluna de 4 x 50 mm. Solvente A, água MilliQ, solvente B, HCl 1N preparado em água. O gradiente é de 2,5% para B 49% em 30 min, seguida de 3 min de condições isocráticas a 50% e 2 min de condições isocráticas a 2,5% a uma velocidade de fluxo de 0,8 ml/min. Cada execução é de 35 min. É possível reduzir a execução para 25 minutos totais e pelo fato da fitase não produzir tantos isômeros IP isso é teoricamente possível. O eluente ficou derivatizado em linha com uma solução de água contendo 0,1% de Fe (NO₃)₃.9H₂O e 2% de ácido perclórico (HClO₄) a uma velocidade de fluxo de 0,4 ml/min. Fitato e isômeros IP foram detectados a 290 nm como um pico positivo. Isto é devido à formação do complexo fitato-Fe³⁺-ClO₄⁻. A solução de ácido perclórico a 60% foi comprado da Sigma.

Resultados

[0428] Os resultados são apresentados nas Figuras 14 a 17.

Resumo de dados

[0429] Todas as enzimas da presente invenção apresentam características favoráveis.

[0430] As fitases da presente invenção quebraram o fitato em todos os níveis de pH testados.

[0431] As enzimas da presente invenção são muito ativas em pH 5,5.

[0432] A BP 110 e BP 111 exibiram atividade semelhantes em pH 2,5 e 3,5.

[0433] BP 110 e BP 111 quebraram todos os fitato adicionados às incubações após 90 min em tanto em pHs 2,5 como em pH 3,5

[0434] A BP112 quebra 75% do fitato adicionado nas incubações após 90 min tanto em pH 2,5 como em pH 3,5.

[0435] As enzimas da presente invenção apresentam características melhores do que a *Ronozyme* e *Natuphos* em pH 2,5 (vide, pelo menos a Figura 17) (concentração de enzimas é maior do que a observada nas Figuras 14-16, assim a BP17 de *Buttiauxella* está lá como referência.)

EXEMPLO 5

HIDRÓLISE DE ÁCIDO FÍTICO EM UM LIQUEFEITO

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÍTICO

[0436] Teor de ácido fítico: O ácido fítico foi extraído de uma amostra, ajustando o pH da suspensão de 5% (se é uma amostra seca) para pH 10 e, em seguida, foi determinado por um método de HPLC utilizando uma coluna de troca iônica. O ácido fítico foi eluído da coluna usando um sistema de gradiente de NaOH. O teor de ácido fítico no líquido foi então calculado através da comparação com um padrão de ácido fítico.

RESULTADOS

[0437] Foi estudado o efeito da temperatura na hidrólise do ácido fítico do milho integral triturado liquefeito a partir de um processo de liquefação de moagem a seco convencional (fonte: Illinois River Energy, Monroe, Illinois) por diferentes variantes de fitase BP termoestáveis, ou seja, BP110, BP111 e BP112 foram estudadas. O pH de um ds (“sólido seco”) de 32% o milho integral triturado liquefeito ds foi ajustado para um pH de 5,0. e colocado em um banho de água e mantido a 85 °C e 89 °C.

[0438] Após o equilíbrio da temperatura, a BP-fitase foi adicionada em 4,0 FTU/gds. milho. As amostras foram, então, tomadas em 20 minutos e a reação enzimática foi bloqueada pela adição de 10 mM de hidróxido de sódio (diluído 1-10 vezes). As amostras diluídas foram, então, filtradas e analisadas por HPLC para seu perfil de derivados de fitato (IP1 a IP6).

[0439] Os cromatogramas de HPLC nas Figuras 18 e 19 exibiram claramente que a fitase de todas as três variantes catalisou a hidrólise do ácido fítico em temperaturas superiores a 85 °C.

[0440] O teor de ácido fítico (ácido fítico (IP6) e intermediários IP1 a IP5) em milho integral triturado liquefeito é cerca de 1,7% ds. Milho e os dados na Figura 18 demonstram que mais de 95% do ácido fítico foi hidrolisado pela fitase termoestável sob as condições atuais de liquefação. Significativamente, o perfil de HPLC das amostras incubadas a 89 °C mostrou que a variante BP-111 da fitase apresentou maior termoestabilidade da fitase em relação ao outras duas variantes (vide Figura 19; BP-110 e BP-112).

EXEMPLO 6

EXPRESSÃO DA LIPASE 3 DE ASPERGILLUS TUBINGENSIS EM TRICHODERMA REESEI

1. CONSTRUÇÃO DE EXPRESSÃO E CEPA UTILIZADA PARA A TRANSFORMAÇÃO

[0441] O plasmídeo de DNA pDONR™ 221 obtido a partir da Invitrogen (catálogo no.12536-017) foi usado como o vetor doador. O

pDONR221::lip 3 contendo o DNA genômico da lipase 3 de *Aspergillus tubingensis* (Figura 20) foi re combinado para o vetor de destino *T. reesei* gateway pTrex3G (descrito em detalhes no documento WO 05/001036), resultando na construção de expressão final ATlipase3Trex (Figura 21).

[0442] O cassete de expressão continha as regiões promotora e terminadora do gene celobiohidrolase 1 (cbh1) de *T. reesei*. Também continha o gene *amdS* da acetamidase de *Aspergillus nidulans* como marcador de seleção para a transformação da *T. reesei*.

[0443] O DNA genômico da lipase 3 de *Aspergillus tubingensis* codifica uma enzima lipase 3 lipolítica possuindo a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 7.

[0444] O termo “lipase 3”, quando utilizado na presente invenção refere-se a uma enzima lipolítica compreendendo a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 8, tal como a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 7. A SEQ ID NO: 7 contém a sequência sinal; e a SEQ ID NO: 8 é a proteína lipase madura sem a sequência sinal.

[0445] A cepa utilizada para a transformação foi a *Trichoderma reesei*, um derivado da cepa não geneticamente modificada: RL-P37 a partir da qual os genes que codificam as duas celobiohidrolases secretadas, CBHI e CBHII, e duas das endoglucanases secretadas, EGI e EGII, foram deletados.

O vetor de expressão pTrex3g.

[0446] A seguir é descrita a construção do vetor pTrex3g que pode ser usado para expressar os genes da presente invenção.

[0447] Este vetor é baseado no vetor de *E. coli* pSL1180 (Pharmacia Inc., Piscataway, NJ, EUA) que é um vetor baseado em fagomídeo pUC118 (Brosius, J. (1989) *DNA* 8:759) com um sítio de clonagem múltipla estendido contendo 64 sequências hexâmeros de reconhecimento de enzimas de restrição. Ele foi projetado como um vetor de destino Gateway (Hartley, JL, Temple,

GF e Brasch, MA (2000) *Genome Research* 10:1788-1795) para permitir a inserção usando a tecnologia *Gateway* (Invitrogen) de qualquer quadro de leitura aberto desejado entre as regiões do promotor e terminador do gene *cbh1* de *T. reesei*. Ele também contém o gene *amdS* de *Aspergillus nidulans* para uso como marcador de seleção na transformação de *T. reesei*.

[0448] Os detalhes da pTrex3g são os seguintes. O vetor é de 10,3 kb de tamanho.

[0449] Estão inseridos na região de poliligante do pSL1180 os seguintes segmentos de DNA:

1. Um segmento de 2.2 bp de DNA da região promotora do gene *cbh1* de *T. reesei*.

2. O quadro de leitura *Gateway* de 1,7 kb; Um cassete adquirido da Invitrogen que inclui os sítios de recombinação attRI e attR2 em cada extremidade que flanqueia o gene de resistência ao cloranfenicol (CmR) e o gene *ccdB*.

3. Um segmento de 336 bp de DNA da região terminadora do gene *cbh1* de *T. reesei*.

4. Um fragmento de DNA de 2,7 kb contendo o gene *amdS* de *Aspergillus nidulans* com seu promotor nativo e regiões terminadoras.

2. TRANSFORMAÇÃO DE *T. REESEI* COM DELEÇÃO QUÁDRUPLA DA CEPA

HOSPEDEIRA.

[0450] A construção de expressão, ATlipase3Trex, contendo o gene da lipase 3 de *A. tubingensis* foi transformado em uma cepa de *T. reesei* utilizando eletroporação ou transformação por biobalística de bombardeamento de partículas usando o sistema *PDS-1000 Helium* (Cat BioRad. No. 165-02257). Os produtos da PCR contendo apenas DNA de fungos ou plasmídeo de expressão inteiro foram usados para gerar transformantes pela transformação por biobalística e eletroporação.

A. TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO

[0451] A cepa hospedeira de *T. reesei* para ser transformada foi cultivada até a esporulação total em placas PDA durante 5 dias. Os esporos de duas placas foram coletados com 1,2 M de sorbitol e filtrados através de *miracloth* para a retirada do ágar. Os esporos foram transferidos para um tubo tipo falcon de 50 ml e lavados por centrifugação repetida de 5 a 6 vezes com 50 ml de água. Os esporos foram ressuspensos em um volume pequeno (menos de 2x o volume do sedimento), utilizando a solução de sorbitol 1,2 M. A suspensão de esporos foi então mantida em gelo. 90 µl da suspensão de esporos foi aliquoteada na cuveta de eletroporação (E-shot, cuveta de eletroporação padrão de 0,1 centímetros da Invitrogen). 10-20 µL da construção de DNA (plasmídeo da Figura 4 ou produto da PCR) foram adicionados à suspensão de esporos e a eletroporação foi fixada em 16kV/cm, 25µF, 50Ω. Após a eletroporação, a suspensão de esporos foi deixada no gelo, ressuspensa em 5 partes de sorbitol 1M e 1 parte de YEPD, e deixado para germinar pela incubação a 28 °C com agitação de 250 rpm durante a noite. No dia seguinte, os germinantes foram semeados em placas de ágar contendo acetamida. Os transformantes foram escolhidos e transferidos individualmente para placas de ágar acetamida.

B. Transformação pelo bombardeio de partículas (transformação por biobalística)

[0452] Uma suspensão de esporos de uma cepa com deleções quádruplas de *T. reesei* foi preparada. 200 µl da suspensão de esporos foi espalhada no centro de placas de acetamida com meio mínimo (MM). (Placas de acetamida MM tinham a seguinte composição: 0,6 g/l de acetamida; 1,68g/l de CsCl; 20g/l de glicose; 20g/l de KH₂PO₄, 0,6 g/l de CaCl₂ 2H₂O; 1 ml/l solução de oligoelementos 1000x; 20g/l de ágar noble, e pH5,5. A solução oligoelementos 1000x continha 5,0 g/l de FeSO₄ 7H₂O; 1,6 g/l de MnSO₄; 1,4g/l de ZnSO₄ 7H₂O e 1,0 g/l de CoCl₂ 6H₂O. A suspensão de esporos foi deixada

para secar sobre a superfície do meio acetamida MM por 1 hora em capela estéril. A transformação foi realizada seguindo as instruções do fabricante. 60mg de partículas de tungstênio foram colocadas em um tubo de microcentrífuga. 1ml de etanol foi adicionado e deixado em repouso por 15 segundos. O etanol foi removido e as partículas foram lavadas três vezes com dH₂O estéril antes de ser adicionado 250 µl de glicerol estéril 50% (v/v). 25 µl da suspensão de partículas de tungstênio foram colocadas em um tubo de microcentrífuga. Enquanto agitado continuamente em um *vortex*, os seguintes foram adicionados: 5 µl (100-200 ng/µl) de plasmídeo DNA, 25 µl de CaCl₂ 2,5 M e 10 µl de espermidina 0,1 M. As partículas foram centrifugadas por 3 segundos. O sobrenadante foi removido e as partículas foram lavadas com 200 µl de etanol 100% e centrifugadas por 3 segundos. O sobrenadante foi removido. 24µl.

[0453] Etanol 100% foi adicionado e misturado por pipetagem, então alíquotas de 8 µl de partículas foram removidas e colocadas no centro dos discos microcarregadores que foram mantidos em um dessecador. Quando a solução de tungstênio/DNA secou o disco microcarregador foi colocado na câmara de bombardeio junto com a placa de acetamida MM com esporos e o processo de bombardeio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Após o bombardeamento dos esporos plaqueados com partículas de DNA tungstênio, as placas foram incubadas a 28 °C. As colônias transformadas foram transferidas para placas com meio acetamida MM fresco e incubadas a 28 °C.

3. CRESCIMENTO DE TRANSFORMANTES EM PLACAS DE MICROTITULAÇÃO

[0454] Após 5 dias de crescimento em placas de acetamida MM, os transformantes obtidos por eletroporação ou por transformação por biobalística exibindo morfologia estável foram inoculados em 200 µl de meio definido com glicose/soforose em placas de microtitulação de 96 poços. O

meio definido com glicose/soforose (por litro) consiste de 5g de NH_4SO_4 , 33 g de tampão PIPPS de, 9g de Ácidos Casamino, 4,5 g de KH_2PO_4 , 1g de CaCl_2 (anidro), 1g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 5,5 ajustado com NaOH 50% com H_2O milli-Q para trazer a um volume de 966,5 mL. Após a esterilização, foram adicionados os seguintes: 5 mL de Mazu, 26 mL de Glicose/Sofrose 60% e 400X de traço de metais *T. reesei* 2,5 mL. A placa de microtitulação foi incubada em uma câmara de crescimento com oxigênio a 28 °C durante 5 dias.

EXEMPLO 7

[0455] As células hospedeiras para expressão adequadas para uso na presente invenção podem ser uma cepa da *T. reesei* em que os genes que codificam a celobiohidrolase I (CBHI, Cel7a), celobiohidrolase II (CBHII, Cel6a), endoglucanase I (EGI, Cel7b), e endoglucanase II (EGII, Cel5a) foram inativadas pela deleção ou interrupção usando técnicas de genética molecular. Esta cepa (cepa com deleção quádrupla) é útil como um hospedeiro para a superexpressão dos genes que codificam outras proteínas secretadas pela *T. reesei*.

[0456] Preferencialmente as células hospedeiras adequadas para uso na presente invenção podem ser derivadas de uma célula de *Trichoderma reesei* da cepa RL-P37 usando os métodos descritos no WO 2005/001036 e US28026376 A1.

[0457] Uma cepa de *T. reesei* adequada para uso na presente invenção pode ser derivada da cepa disponível publicamente de *T. reesei* RL-P37. A *T. reesei* cepa RL-P37 pode ser modificado para formar a *T. reesei* cepa 1A52 conforme descrito no WO 05/001036. A *T. reesei* cepa 1A52 pode ser modificada, conforme descrito na US 20080026376 para formar uma célula *T. reesei* utilizável na presente invenção.

[0458] A RL-P37 pode ser modificada para formar a *T. reesei*

cepa 1A52 conforme descrito abaixo.

[0459] A cepa hospedeira de *T. reesei* usada pode ser derivada da cepa publicamente disponível RL-P37, que foi utilizada para a fabricação de preparações comerciais de celulase pela Genencor International, Inc. A derivação e caracterização desta cepa foi publicada anteriormente (Sheir-Neiss, G. e Montenecourt, BS (1 984) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20:46-53; Patente US 4.797.361). É uma cepa mutante que superproduz celulase que foi obtida como resultado de diversas etapas de mutagênese da cepa do tipo selvagem (QM6a).

1) Isolamento de uma cepa mutante *pyr4*.

[0460] A fim de preparar uma cepa RL-P37 para transformação com DNA plasmidial foi necessário isolar um derivado possuindo uma mutação nula no gene *pyr4*.

[0461] O gene *pyr4* codifica a descarboxilase-5'-monofosfato orotidina, uma enzima necessária para a biossíntese de uridina. O inibidor do ácido 5-fluoroorótico (FOA) tóxico é incorporado na uridina por células do tipo selvagem e, portanto, envenena as células. No entanto, as células defeituosas do gene *pyr4* são resistentes a esse inibidor, mas exigem a uridina para o crescimento. É, portanto, possível selecionar cepas mutantes para *pyr4* usando o FOA. Na prática, esporos de *T. reesei* cepa RL-P37 foram semeados sobre a superfície de um meio solidificado contendo 2 mg/ml de uridina e 1,2 mg/ml de FOA. Colônias espontaneamente resistentes ao FOA apareceram dentro de três a quatro dias. Os mutantes resistentes ao FOA que necessitavam de uridina para o crescimento foram identificados. A fim de identificar os mutantes que tinham protoplastos com gene *pyr4* especificamente defeituosos foram gerados e transformados com um plasmídeo contendo um gene *pyr4* do tipo selvagem (Smith, JL, Bayliss, FT e Ward, M. (1991) *Curr. Genet.* 19:27-33). OS protoplastos após a transformação foram semeados em meio sem uridina. O subsequente crescimento de colônias transformadas demonstrou a complementação de um gene *pyr4* defeituoso pelo gene *pyr4* de origem plasmidial. Desta forma a cepa

GC69 foi identificada como um mutante para *pyr4* da cepa RL-P37.

2) Construção de um plasmídeo criado para deletar o gene que codifica CBHI.

[0462] O gene *cbhl*, que codifica a proteína CBHI, foi clonado a partir do DNA genômico da cepa RL-P37 por hibridização com uma sonda de oligonucleotídeos desenvolvida em função da sequência publicada para este gene (Shoemaker, S., Schweickart, V., Ladner, M., Gelfand, D., Kwok, S., Myambo, K. e Innis, M. (1983) *Biotechnology* 1:691-696). O gene *cbhl* reside sobre um fragmento *Pst*I de 6,5 kb e foi inserido no sítio *Pst*I do pUC4K (Pharmacia Inc., Piscataway, NJ, EUA), substituindo o gene de resistência a canamicina desse vetor. O plasmídeo resultante, pUC4K::*cbh1*, foi então cortada com *Hind*III e o maior fragmento foi isolado e religado para formar o pUC4K::*cbh1*ΔH/H. Este procedimento removeu toda a sequência codificadora de *cbhl* e aproximadamente 1,2 kb da sequência flanqueadora a 5' e 1,2 kb da sequência flanqueadora 3'. Aproximadamente 1 kb de DNA flanqueador permaneceu em ambas extremidades do fragmento *Pst*I original. O gene *pyr4* da *T. reesei* foi clonado como um fragmento de 6,5 kb *Hind*III de DNA genômico no pUC18 para formar o pTpyr2 (Smith, JL, Bayliss, FT e Ward, M. (1991) *Curr. Genet.* 19:27-33). O plasmídeo pUC4K::*cbh1*ΔH/H foi cortado com *Hind*III e as extremidades foram desfosforilada com fosfatase alcalina intestinal bezerro. Este DNA foi ligado com o fragmento de 6,5 kb *Hind*III contendo o gene *pyr4* para formar o pΔCBHI*pyr4*.

[0463] A digestão do pΔCBHI*pyr4* com *Eco*RI liberou um fragmento maior que consistia das regiões flanqueadoras do *locus cbh1* em ambas as extremidades com o gene *pyr4* substituindo a sequência de codificação de *cbh1* no centro. O único DNA neste fragmento que não foi derivado da *T. reesei* foi um fragmento de 21 pb derivado do sítio múltiplo de clonagem do pUC4K.

3) Deleção do gene *cbh1* de *T. reesei*.

[0464] Protoplastos isolados de micélio da cepa GC69 foram transformados com o plasmídeo digerido EcoRI p Δ CBHlpyr4 usando métodos descritos por Smith *et al.*, 1991. Transformantes estáveis foram obtidos e aqueles a partir dos quais o gene *cbh1* foi excluído foram identificados conforme descrito abaixo.

[0465] O DNA total foi isolado a partir dos transformantes e digerido com *Pst*I, submetido a eletroforese em gel de agarose e submetido a um *blotting* em papel de filtro. O filtro foi então hibridizado com p Δ CBHlpyr4 marcado com P³² e o padrão de hibridização foi observado por autoradiografia. Esta sonda hibridizou com os genes *cbh1* e *pyr4* nativos em uma cepa não transformada. Em um transformante (a cepa P37P Δ CBHl) foi observado um padrão de hibridização que poderia ser previsto se um evento de integração de *cross-over* duplo tivesse ocorrido. Ou seja, o gene *cbh1* foi deletado pela integração de uma única cópia do fragmento EcoRI maior obtido a partir do p Δ CBHlpyr4 no *locus cbh1* da cepa RL-P37.

[0466] A análise por *Southern* também foi realizada conforme descrito acima, exceto que a sonda utilizada foi a plntCBHl radiomarcada. Este plasmídeo consiste de um vetor pUC contendo um fragmento BglII de 2 kb do *locus cbh1* dentro da região que foi deletada no pUC4K::cbh1 Δ H/H. Este plasmídeo hibridiza no *locus cbh1* da cepa GC69 mas não hibridiza com o DNA da cepa P37P Δ CBHl. Isso confirma que o gene *cbh1* foi deletado e que o fragmento de DNA pUC a partir do p Δ CBHlpyr4 não foi incorporado pela cepa deletada.

[0467] A análise de proteínas secretadas pela separação em géis de focalização isoeletrica mostrou que a proteína CBHl não foi produzida pela cepa P37P Δ CBHl.

4) Geração de um mutante do P37P Δ CBHl, *pyr4* nulo.

[0468] Esporos dos transformantes (P37PΔCBH1), que foram submetidos a deleção do gene *cbh1* foram espalhados em meio contendo FOA. Um derivado deficiente de *pyr4* deste transformante foi posteriormente obtido usando os métodos descritos na seção anterior. Esta cepa deficiente de *pyr4* foi designada de P37PΔCBHIPyr⁻26. A análise *Southern* demonstrou que uma deleção espontânea havia ocorrido quando a cepa P37PΔCBHIPyr⁻26 foi selecionada. Esta deleção removeu completamente o gene *pyr4* que tinha integrado no *locus cbh1* na cepa P37PΔCBH1, bem como DNA flanqueador a partir do *locus cbh1* para além da extensão do fragmento *PstI* de 6,5 kb do DNA genômico que foi originalmente clonado.

5) Construção de um vetor projetado para deletar o gene *cbh2*.

[0469] O gene *cbh2* de *T. reesei*, que codifica a proteína CBHII, foi clonado como um fragmento *EcoRI* de 4,1 kb de DNA genômico (Chen *et al.*, 1987, *Biotechnology* 5:274-278). Este fragmento de 4.1 kb foi inserido entre os sítios *EcoRI* do pUC4XL. O último plasmídeo é um derivado de pUC (construído por RM Berka, *Genencor International Inc.*), que contém um sítio múltiplo de clonagem com um padrão simétrico de sítios de endonucleases de restrição dispostos na seguinte ordem demonstrada. *EcoRI*, *BamHI*, *SacI*, *SmaI*, *HindIII*, *XhoI*, *BglII*, *Clal*, *BglII*, *XhoI*, *HindIII*, *SmaI*, *SacI*, *BamHI*, *EcoRI*. O plasmídeo, pΔCBHII foi construído no qual um 1,7 kb da região central deste clone *cbh2*, entre um sítio *HindIII* (a 74 pb do sítio de iniciação da tradução CBHII 3') e um sítio *Clal* (a 265 pb do último códon de CBHII 3'), foi removido e substituído por um fragmento de DNA de 1,6 kb *HindIII*-*Clal* contendo o gene *pyr4* de *T. reesei* obtido da seguinte forma. O gene *pyr4* de *T. reesei* foi retirado do pTpyr2 em um fragmento de 1,6 kb *NheI*-*SphI* e inserido entre os sítios *SphI* e *XbaI* do pUC219 (derivado do pUC119 através da expansão do sítio múltiplo de clonagem para incluir sítios de restrição para *BglII*, *Clal* e *XhoI*; Wilson *et al.* 1989, 77:69 *Gene* 78) para criar o p219M (Smith *et al.*, 1991, *Curr. Genet.*19:27-33). O gene *pyr4*

poderia então ser removido como um fragmento *HindIII*-*Clal* com sete bp de DNA em uma extremidade e seis bp de DNA na outra ponta derivada a partir do sítio de clonagem múltiplo e inserido nos sítios *HindIII* e *Clal* do gene *cbh2* para formar o plasmídeo p Δ CBHII.

[0470] A digestão deste plasmídeo com *EcoRI* libera um fragmento de 0,7 kb do DNA flanqueador a partir do *locus cbh2* em uma extremidade, 1,7 kb de DNA flanqueador a partir do *locus cbh2* na outra extremidade no gene *pyr4* de *T. reesei* no meio. Os únicos DNAs neste fragmento que não foram derivados de *T. reesei* foram os fragmentos de 6 bp e 7 pb do sítio de clonagem múltiplo pUC219 em cada extremidade do gene *pyr4*.

6) Deleção do gene *cbh2* a partir da estirpe P37P Δ CBHIPyr⁻26

[0471] Os protoplastos de cepa P37P Δ CBHIPyr⁻26 foram gerados e transformados com a digestão com *EcoRI* do p Δ CBHII de acordo com os métodos descritos no item 3 acima. Os transformantes estáveis foram cultivados em frascos para agitação e a proteína no sobrenadante da cultura foi examinada por focalização isoeletrica. Um transformante (designado P37P $\Delta\Delta$ CBH67) foi identificado que não produziu qualquer proteína CBHII (nem CBHI).

[0472] O DNA foi extraído a partir da cepa P37P $\Delta\Delta$ CBH67, digerido com *EcoRI* e *Asp718*, e submetido a eletroforese em gel de agarose. O DNA deste gel foi submetido ao método de *blotting* em uma membrana de filtro e hibridizado com p Δ CBHII marcado com P³². O fragmento *EcoRI* de 4,1 kb contendo o gene *cbh2* tipo selvagem foi observado no DNA a partir de uma cepa controle não transformada. Em contrapartida, na cepa P37P $\Delta\Delta$ CBH67 a banda única de 4,1 kb foi eliminada e substituída por duas bandas de aproximadamente 0,9 e 3,1 kb. Este é o padrão esperado se uma cópia única do fragmento de *EcoRI* maior a partir do p Δ CBHII foi integrado precisamente no *locus* de *cbh2* e deletado o gene *cbh2*.

[0473] As mesmas amostras de DNA foram também digeridas com *EcoRI* e análise *Southern* foi realizada conforme descrito anteriormente. Neste exemplo, a sonda foi plntCBHII marcada com P³². Este plasmídeo contém uma porção da sequência que codifica o gene *cbh2* de dentro do segmento de DNA *cbh2* que foi deletado no plasmídeo pPΔCBHII. Não foi observada hibridização com o DNA a partir da cepa P37PΔCBH67 confirmando que o gene *cbh2* foi deletado e que o fragmento do plasmídeo pUC de pPΔCBHII não haviam sido incorporado por esta cepa.

7) A seleção de um mutante *pyr4* nulo de cepa P37PΔΔCBH67.

[0474] Esporos dos transformantes (P37PΔΔCBH67), que foi deletado para ambos *cbh1* e *cbh2* foram espalhados em meio contendo FOA. Um derivado deficiente de *pyr4* deste transformante foi subsequentemente obtido usando os métodos descritos na seção 1 acima.

[0475] Esta cepa deficiente de *pyr4* foi designada de P37PΔCBH67Pyr⁻¹. A análise *Southern* demonstrou que uma deleção espontânea havia ocorrido quando a cepa P37PΔΔCBH67Pyr⁻¹ foi selecionada.

[0476] Esta deleção removeu completamente o gene *pyr4* que tinha integrado no *locus cbh2* na cepa P37PΔCBH67, bem como DNA flanqueador a partir do *locus cbh2* para além da extensão do fragmento *EcoRI* de 4,1 kb do DNA genômico que foi originalmente clonado. Os fragmentos curtos (6 pb e 7 pb) de DNA obtidos a partir do sítio de clonagem múltiplo pUC219 que estavam presentes em ambas as extremidades do gene *pyr4* também foram removidos do genoma por esta deleção.

8) Construção de um plasmídeo projetado para interromper o gene *egl2*.

[0477] O gene *egl2*, que codifica EGII (anteriormente referido como EGIII por alguns), foi clonado a partir da *T. reesei* e a sequência de DNA publicado (Saloheimo et al, 1988, *Gene* 63: 11-21). Nós obtivemos o gene a

partir da cepa RL-P37 como um fragmento *Pst*I-*Xho*I de aproximadamente 4 kb de DNA genômico inserido entre os sítios *Pst*I e *Xho*I do pUC219. O gene *pyr4* de *T. reesei*, presente em um fragmento *Sal*I de 2,7 kb do DNA genômico obtido a partir de pTpyr2, foi inserido em um sítio *Sal*I dentro da sequência de codificação EGLL para criar o plasmídeo pEGII::P-1. Isso resultou na interrupção da sequência de codificação de EGLL mas sem a deleção de qualquer sequência. O plasmídeo, pEGII::P-1, pode ser digerido com *Hind*III e *Bam*HI para produzir um fragmento linear de DNA derivado exclusivamente de *T. reesei* exceto por 5 pb em uma extremidade e 16 pb na outra extremidade sendo que ambos são derivados do sítio múltiplo de clonagem do pUC219.

9) Interrupção do gene *egl2* da cepa P37PΔCBH67Pyr⁻¹.

[0478] A cepa P37PΔΔCBH67Pyr⁻¹ foi transformada com pEGII::P-1, que havia sido previamente digerida com *Hind*III e *Bam*HI e os transformantes estáveis foram selecionados. O DNA total foi isolado a partir dos transformantes e a análise *Southern* foi usada para identificar cepas nas quais o fragmento de DNA plasmidial contendo os genes *egl2* e *pyr4* havia sido integrado no *locus egl2* e, conseqüentemente, interrompeu a sequência codificadora de EGLL. A análise *Southern* foi realizada utilizando como sonda um fragmento DNA *Pst*I de *T. reesei* de aproximadamente 4 kb contendo o gene *egl2*. Quando o DNA isolado a partir da cepa P37PΔΔ67P⁻¹ foi digerido com *Pst*I para análise *Southern*, o *locus egl2* foi posteriormente visualizado como uma banda única de kb 4 no autoradiografia. Entretanto, em um transformante com interrompimento do gene *egl2*, esta banda foi perdida e foi substituída por duas novas bandas conforme esperado. Quando o DNA foi digerido com *Bgl*II ou *Eco*RV o tamanho da banda correspondente ao gene *egl2* aumentou de tamanho em aproximadamente 2,7 kb (o tamanho do fragmento *pyr4* inserido) entre a cepa P37PΔΔ67P⁻¹ não transformada e os transformantes com o gene *egl2* interrompido. Estes últimos transformantes, agora com deleções para os genes

cbhl, *cbh2* e *egl2*, foram designados como cepa B31. A análise *Southern* confirmou ainda que o fragmento de DNA pUC do pEGII::P-1 não foi incorporado a esta cepa.

10) A seleção de um mutante *pyr4* nulo de cepa B31.

[0479] Esporos dos transformantes (B31), com deleções para os genes *cbhl*, *cbh2* e *egl2* foram semeados em meio contendo FOA. Um derivado deficiente de *pyr4* deste transformante foi subsequentemente obtido usando os métodos descritos na seção 1 acima. Esta cepa deficiente de *pyr4* foi designada B31 P6. A análise *Southern* demonstrou que uma deleção espontânea havia ocorrido quando a cepa B31P6 foi selecionada. Esta deleção removeu a maior parte do gene *pyr4* que havia sido integrada no *locus egl2* na cepa B31, mas não se estendeu para o DNA flanqueador do *locus egl2*.

11) Construção de um plasmídeo projetado para deletar o gene *egl1*.

[0480] O gene *egl1* de *T. reesei* foi clonado e a sequência de DNA do gene foi publicada (Penttilä *et al*, 1986, *Gene* 45; 253-263; Arsdell *et al*, 1987, *Biotechnology* 5:60-64). Obtemos este gene a partir da *T. reesei* cepa RL-P37 como um fragmento de DNA genômico *HindIII* de 4,2 kb inserido no sítio *HindIII* do pUC100 (um derivado do pUC18 com um oligonucleotídeo inserido no sítio múltiplo de clonagem acrescentando sítios de restrição para *BglII*, *ClaI* e *XhoI*) para formar o pUCEGI. Um fragmento *EcoRV* de aproximadamente 1 kb que se estende desde uma posição próxima do meio da sequência codificadora de EGI até uma posição além da extremidade 3' da sequência codificadora foi removido e substituído por um fragmento de DNA *scal* de *T. reesei* de 3,5 kb contendo o gene *pyr4* obtido do pTpyr2. O plasmídeo resultante foi denominado de pΔEGI.

[0481] O plasmídeo, pΔEGI poderia ser digerido com *HindIII* para liberar um fragmento de DNA que compreende apenas de DNA genômico de *T. reesei* possuindo um segmento do gene *egl1* em ambas extremidades e o

gene *pyr4*, substituindo parte da sequência codificadora de EGI, no centro.

12) A deleção do gene *ea1* na cepa B31P6.

[0482] Duas formas de p Δ EGI foram construídas, que diferiam apenas na orientação do gene *pyr4* no que diz respeito às regiões flanqueadoras de *egl1*. A cepa B31P6 foi transformada com uma mistura de ambas as formas do plasmídeo após elas terem sido digeridas com *HindIII*. O DNA total foi extraído de transformantes estáveis, digerido com *HindIII* e submetidos a análise *Southern*. A sonda utilizada foi a pUCEGI radiomarcada. A hibridização foi observada em um fragmento de DNA de 4,2 kb da cepa B31P6 representando o gene *egl1* recuperado. Um transformante (cepa 1A52) foi identificado no qual este fragmento de 4,2 kb não estava mais presente, mas havia sido substituído por um fragmento de aproximadamente 6,8 kb. Este é o padrão esperado se o fragmento *HindIII* maior do p Δ EGI foi integrado precisamente conforme previsto no *locus egl1* levando a deleção de parte da sequência codificadora de EGI e a inserção de *pyr4* nesta posição. Usando um plasmídeo pUC como uma sonda para análise *Southern* foi confirmado que o fragmento de DNA pUC do p Δ EGI não havia sido incorporado na cepa 1A52.

[0483] A *T. reesei* cepa 1A52 pode ser modificada para formar uma célula *T. reesei* utilizável na presente invenção.

EXEMPLO 8

DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES DE DIETAS SUPLEMENTADAS COM UMA COMBINAÇÃO DE FITASE E LIPASE JUNTAMENTE COM AMILASE E XILANASE EM LEITÕES CANULADOS.

[0484] Este ensaio foi realizado na Universidade de Illinois, EUA.

MATERIAIS E MÉTODOS

[0485] Foram avaliados a energia ileal e a digestibilidade da proteína, digestibilidade de energia do trato total, e retenção de Ca e P do trato

total de dietas baseadas em farelo de milho/soja suplementadas com lipase em cima de uma fitase, amilase e xilanase combinadas em leitões canulados cirurgicamente. Os tratamentos consistiram de:

[0486] Controle positivo. Dieta adequada de nutrientes.

[0487] Controle negativo. Reduzida em 150 kcal de DE/kg de ração, 0,15% de cálcio e 0,12% de P disponível em relação ao controle positivo.

[0488] Fitase (500 FTU/kg).

[0489] Fitase (500 FTU/kg), amilase (1800 u/kg) e xilanase (2000 U/kg).

[0490] Fitase (500 FTU/kg), amilase (1800 u/kg), xilanase (2000 U/kg) e lipase (3000 LIPU/kg).

[0491] Doze suínos machos castrados foram aleatoriamente distribuídos em um delineamento experimental quadrado latino 6 x 6 duplicado com seis dietas e 6 períodos por cada quadrado. Porcos foram identificados individualmente por marcas auriculares.

[0492] As formulações da dieta e composição calculadas para o controle positivo e controle negativo são apresentadas na Tabela 3. As dietas foram misturadas pela suplementação com os produtos enzima ao controle negativo (NC) em detrimento de amido de milho. A dieta basal foi à base de milho, farelo de soja, DDGS de milho. Óxido de cromo a 0,4% foi adicionado às dietas como marcador indigestível.

TABELA 3

FORMULAÇÃO DA DIETA NUTRICIONAL E ESPECIFICAÇÕES

Ingrediente	PC	NC
	------(%)-----	
	--	
Milho	51,05	57,05
Farelo de soja 48%	24,00	21,75

Ingrediente	PC	NC
	------(%)-----	
	--	
DDGS	3,50	3,50
Soro de leite, seca	12,00	12,00
Farinha de peixe	4,00	4,00
Óleo de soja	3,00	0,00
Amido ou enzima	0,05	0,05
Fosfato bicálcico	0,85	0,10
Calcário	0,60	0,60
Sal	0,40	0,40
Lisina-HCl	0,20	0,20
DL-metionina	0,00	0,00
L-treonina	0,05	0,05
Pré-mistura ¹	0,30	0,30
<i>Total</i>	100,00	100,00
Composição de nutrientes		
calculada		
DE (kcal/kg)	3,570	3,420
NE (kcal/kg)	2,500	2,360
Amido	31,12	34,70
NSP	8,87	9,05
CP (%)	20,54	19,97
Gordura bruta (%)	6,16	3,40
Cálcio (%)	0,81	0,64
Av. fósforo (%)	0,40	0,28
Lisina Dig. (%)	1,19	1,14
Metionina Dig. (%)	0,32	0,32

Ingrediente	PC	NC
	------(%)-----	
	--	
AAST Dig. (%)	0,66	0,65
Treonina Dig. (%)	0,74	0,71

[0493] ¹ Fornece as seguintes quantidades de vitaminas por quilograma de dieta completa: Vitamina A, 10.990 UI, vitamina D3, 1648 UI, vitamina E, 55 UI, vitamina K, 4,4 mg; tiamina, 3,3 mg; riboflavina, 9,9 mg; piridoxina, 3,3 mg; vitamina B12, 0,044 mg; ácido D-pantotênico, 33 mg; niacina, 55 mg, ácido fólico, 1,1 mg; biotina, 0,17 mg; Cu, 16 mg na forma de sulfato de cobre; Fe, 165 mg na forma de sulfato de ferro; I, 0,36 mg na forma de iodato de potássio, Mn, 44 mg como sulfato de manganês; Se, 0,3 mg como selenito de sódio, e Zn, 165 mg de óxido de zinco.

[0494] Todos os suínos utilizados neste estudo foram provenientes do acasalamento da linhagem de 337 javalis e C22 fêmeas (*Empresa Pig Improvement*, Franklin, KY). Foram usados suínos machos castrados com um peso inicial médio de 12,5 kg (DP = 2.15). Os suínos foram cirurgicamente acoplados a uma cânula T no íleo distal. Após a cirurgia, os suínos foram alojados em baias individuais. Os animais foram alimentados com a dieta pós-desmame convencional até o início do experimento. A alimentação foi fornecida em níveis diários de três vezes a necessidade de manutenção estimada para a energia (ou seja, 106 kcal/kg BW^{0,75}). A disponibilidade de ração foi ajustada no início de cada período, quando os porcos BWs foram registrados.

[0495] Os produtos enzima foram administrados por via oral misturados com uma dieta por 7 dias em cada período: 4 dias de adaptação, 1 dia para coleta de fezes, e 2 dias para coleta da digesta ileal. As amostras de digesta ileal foram coletadas por 8 h no d 6 e 7. Resumidamente, um saco

plástico foi anexado a cânula usando uma braçadeira e a digesta que fluiu para dentro do saco foi coletada. Os sacos foram removidos sempre que eles foram preenchidos com digesta, ou pelo menos uma vez a cada 30 minutos. As amostras coletadas foram armazenadas a -20 °C para prevenir a degradação bacteriana de aminoácidos na digesta. Na conclusão do experimento, amostras ileais congeladas foram deixadas para descongelar à temperatura ambiente, misturadas no animal e dieta, e uma subamostra foi coletada para a análise química. As amostras da digesta ileal foram liofilizadas e finamente moídas antes da análise química.

[0496] Amostras do íleo foram analisadas quanto a matéria seca (procedimento 930,15; AOAC, 2005). A concentração de energia bruta nas amostras do íleo foi mensurada usando uma bomba de calorimetria (calorímetro Parr 6300, Parr Instruments Co., Moline, IL). O conteúdo Cr das dietas e amostras de digesta ileal foram mensurados utilizando um método ICP (procedimento 990,08; AOAC, 2005) depois preparação da amostra como cinza úmida usando ácido nítrico perclórico (procedimento 968.088D; AOAC, 2005). Estes valores foram utilizados para calcular os coeficientes de digestibilidade ileal. As amostras de fezes foram secas em forno de ar forçado e finamente moídas antes da análise. Estas amostras foram analisadas quanto a matéria seca (MS), energia bruta, proteína bruta, Ca e P.

[0497] Os dados foram analisados como um delineamento quadrado latino usando o procedimento PROC MIXED do SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). O modelo incluiu o tratamento dietético, período animal e bloqueio. As médias foram separadas usando testes-t pareados. Cada animal foi considerado a unidade experimental para todos os cálculos. Um nível alfa de 0,05 foi utilizado para a determinação da significância estatística.

RESULTADOS

[0498] A digestibilidade de energia ileal (Fig. 23A) não

aumentou com a adição de fitase em comparação com o controle negativo, mas aumentou em 2,95% e 9,28% com a adição de fitase + xilanase + + amilase e fitase + xilanase + amilase + lipase, respectivamente. Essas alterações indicam um efeito de 6,3% que foi puramente devido à adição da lipase em sobre um fundo de fitase + xilanase + amilase. Da mesma forma, a digestibilidade ileal da proteína bruta não aumentou com a suplementação de fitase em comparação com a dieta controle negativo (Fig. 23B), mas a suplementação de fitase + xilanase + amilase aumentou significativamente a digestibilidade da proteína bruta em relação ao controle negativo (5,6%) e a suplementação de fitase (+4,0%). A suplementação adicional de lipase sobre a fitase + xilanase + amilase aumentou ainda mais a digestibilidade da proteína bruta em relação ao controle negativo (10,7%), a suplementação de fitase (9,1%) e fitase + xilanase + amilase (4,9%).

[0499] Em relação ao trato total (Fig. 24), nem a inclusão de fitase, nem a fitase + xilanase + amilase afetou a digestibilidade de energia. A redução da diferença do ileal em relação as fezes com inclusão de fitase + xilanase + amilase não foi surpreendente, já que a atividade microbiana no intestino grosso tende a anular diferenças iniciais na digestibilidade da energia em suínos. Em contraste, a adição de lipase a esta combinação apresentou maior coeficiente de digestibilidade de energia fecal do que os outros tratamentos, o que sugere a liberação e absorção de nutrientes que de outra forma não seriam digeridos pelos microrganismos, mesmo no intestino grosso. A combinação de fitase + xilanase + amilase + lipase aumentou a digestibilidade de energia total do aparelho em 4,7% em comparação com a ração controle negativo.

[0500] Incrementos relativos na retenção de Ca total (Fig. 25A) e P (Fig. 25B) das dietas com fitase (+32% e +293%), fitase + xilanase + amilase (+36% e +323%) e fitase + xilanase + amilase + lipase (+45% e +334%,

respectivamente) também foram evidentes no presente estudo, em comparação com a dieta controle negativo. Embora mudanças na digestibilidade de Ca e P com a inclusão da fitase fossem esperadas, melhorias adicionais com a adição de xilanase + amilase + lipase indicaram um papel importante da lipase no aumento da retenção de Ca e P das dietas com fitase, amilase e xilanase. Estes incrementos foram significativamente maiores quando comparados com a ração controle e fitase sozinha, o que demonstra um efeito aditivo da lipase na retenção de Ca e P.

[0501] Em conclusão, a adição de lipase sobre a fitase + amilase + xilanase aumentou a digestibilidade de energia e proteína no íleo, e a digestibilidade de energia no trato total em comparação ao controle negativo, a adição de fitase e fitase + amilase + xilanase. De maneira similar, a adição de lipase em cima de fitase + xilanase + amilase aumentou a retenção de Ca e P do trato total em relação ao controle negativo, e dietas com adição de fitase. Exemplos *in vitro* contidos nesta patente indicam que estes incrementos de digestibilidade causados pela adição da lipase são principalmente devido a um aumento da atividade da fitase promovida pela competição da lipase pelo cálcio na dieta.

EXEMPLO 9

PRODUÇÃO DE ÁCIDO GRAXOS LIVRES NA DIETA DE MILHO-SOJA EM CONDIÇÕES

ÁCIDAS

Resultados de um estudo de produção de ácidos graxos livres em dieta de milho-soja pela lipase

[0502] Amostras de ração são incubadas a 40 °C com diferentes combinações de lipases e fitases em □ pH 2,8.

REAGENTES

[0503] Os reagentes apropriados e suas concentrações foram os seguintes. tampão de ensaio da Fitase: 0,25 M de acetato de sódio, 1 mM de CaCl₂, 0,01% Tween 20, pH 5,5. Solução de Pepsina: HCl a 0,75 M contendo

2000 U/ml de pepsina (Sigma P7000). A amostra de ração utilizada foi uma dieta de milho - soja básica contendo 60,01% de milho, 31,52% de farelo de soja 48,4% de óleo de soja, 0,4% de sal, 0,2% de DL Metionina, 1,16% de calcário, 1,46% de fosfato bicálcico, e 1,25% de mistura de vitamina.

ENZIMAS

[0504] Lipase 3 conforme descritos na presente invenção. *Phyzyme* conforme descrito na presente invenção. lipase TfulII é uma cutinase bacteriana da *Thermobifida fusca* (Tfu_0883; NCBI número de adesão YP_288944.1) expressa em *Bacillus subtilis*. A TfulII foi analisada utilizando o ensaio de Lipase conforme descrito em materiais e métodos. Além disso, a enzima foi analisada utilizando o mesmo ensaio, no entanto, as condições de pH foram alteradas para pH 7,0 em vez de pH 5.5. A atividade da lipase mensurada em pH 7,0 é descrita como LIP7U, usando a mesma definição, tal como descrito no ensaio de Lipase em materiais e métodos. A relação entre a atividade da lipase mensurada em pH 5,5 (LIPU) e pH 7,0 (LIP7U) foi encontrado como sendo de 1:1,4.

[0505] A *Ronozyme P-CT* e *Natuphos* são fitases fúngicas disponíveis comercialmente. As amostras foram obtidas como produtos secos. 1 g da amostra foi inicialmente ressuspenso em 50 ml de tampão de ensaio e a fitase extraída com um agitador magnético por 20 min. A mistura da extração foi preenchida até um volume final de 100 ml com tampão do ensaio de fitase e filtrado através de um filtro de fibra de vidro. A atividade da fitase dos extratos finais foi mensurada de acordo com o ensaio de fitase descrito em Materiais e Métodos.

[0506] As amostras de lipase foram diluídas em H₂O para uma atividade enzimática de 30 LIPU/ml para Lipase 3 e 30 LIPU/ml para TfulII.

[0507] As amostras de fitase foram diluídas em tampão do ensaio de fitase para uma atividade enzimática de 5 FTU/ml.

INCUBAÇÃO IN VITRO EM PH ÁCIDO

[0508] As seguintes combinações de enzimas foram avaliadas na incubação *in vitro*: Lipase 3, Lipase 3 + *Ronozyme P*, Lipase 3 + *Natuphos*, Lipase 3 + *Phyzyme*, *Tfulll*, *Tfulll* + *Ronozyme P*, *Tfulll* + *Natuphos*, *Tfulll* + *Phyzyme*, e sem lipase ou fitase.

[0509] Para cada incubação, um g de amostra de ração foi pesada em um tubo de 50 ml com tampa de rosca. Foram adicionados 100 µl de cada solução enzimática respectiva seguido pela adição de 1 mL de H₂O no total aos respectivos tubos. Em seguida, 0,5 ml de solução de pepsina foi adicionada a cada tubo e o conteúdo foi cuidadosamente misturado. Cinco bolinhas de vidro foram adicionadas antes das amostras serem incubadas a 10 °C em banho-maria sob agitação por 45 min. Após a incubação os tubos foram centrifugados por 10 min a 3500 rpm. O pH do sobrenadante para a incubação “sem lipase e sem fitase” foi mensurado. Finalmente, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e colocadas no liofilizador durante a noite. Todas as incubações foram realizadas em duplicata.

MEDIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES

[0510] A quantidade de ácidos graxos livres produzidos durante a incubação foi mensurada usando um kit NEFA-HR (2) (WAKO Chemicals GmbH). As amostras foram colocadas em temperatura ambiente e foram adicionados 20 ml de etanol 96%. As amostras foram ressuspensas manualmente antes da mistura em uma roda giratória por 1 hora em temperatura ambiente. Após a incubação os tubos foram centrifugados por 10 min a 3500 rpm. O sobrenadante foi diluído cinco vezes em etanol 96% antes dos ácidos graxos livres na amostra serem mensurados. 110 µL de reagente R1 do kit NEFA foi equilibrado por 5 minutos a 37 °C antes da adição de 15 µl de amostra diluída, e a mistura de reação foi incubada a 37 °C por 10 minutos. 55 µL do reagente R2 do kit NEFA foi adicionado e a incubação continuou por mais 10 minutos a

37 °C antes da OD₅₂₀ nm ser mensurada. O teor de ácidos graxos livres é calculado a partir de uma curva padrão preparada a partir do kit NEFA Standard (WAKO Chemicals GmbH).

RESULTADOS

[0511] Os resultados da medição de ácidos graxos livres são apresentados na Figura 29. Esta figura exhibe a produção de ácidos graxos livres na dieta de milho-soja. A quantidade de produção de ácidos graxos livres (AGL) é corrigida pelo valor do branco sem a adição de lipase ou fitase. O pH da incubação sem lipase e sem fitase foi mensurado como sendo pH 2,8 e considerada representativo de todas as incubações neste exemplo. Isso demonstra que as incubações foram feitas sob condições muito ácidas. A lipase 3, isoladamente ou em combinação com *Phyzyme*, *Natuphos* ou *Ronozyme P* exibiu uma liberação significativa de AGL em comparação com todas as amostras com Tfull, sozinho ou em combinação com *Phyzyme*, *Natuphos*, ou *Ronozyme P*. Isso mostra claramente que a Lipase 3 poderia ser muito eficaz na hidrólise de gordura no ambiente ácido do estômago de um porco ou moela de uma galinha.

EXEMPLO 10

EFEITO DA ADIÇÃO DE CÁLCIO À MISTURA DE ENSAIO E EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES SOBRE A ATIVIDADE DA FITASE PARA UM ENSAIO CONTENDO CaCl₂

[0512] Resultados a partir de um estudo da formação do complexo ácido fítico-cálcio com o aumento da concentração de cálcio e recuperação da atividade fitase pela adição de ácido graxos livres.

ANTECEDENTES

[0513] O ácido fítico pode facilmente formar quelatos com minerais divalentes como o cálcio. Este complexo fitato-mineral pode existir como precipitados insolúveis ou como complexos solúveis e pode, potencialmente, ser resistente à hidrólise pela fitase. Os ácidos graxos livres podem funcionar potencialmente como um quelante competitivo, através da

formação de sabões de Ca, resultando na formação diminuída de formas de ácido fítico resistentes à fitase e concomitante aumento no fitato-P liberado.

REAGENTES

[0514] Os reagentes apropriados e suas concentrações foram os seguintes. Tampão de ensaio: 0,25 M de acetato de sódio, 3% de Triton X-100 (p/v), pH 5,5. Solução de Fitato: 9,1 mM de ácido fítico na forma de hidrato de sal de sódio (Sigma P0109) em tampão de ensaio. Solução CaCl_2 : 0,3 M de CaCl_2 em tampão de ensaio. Solução de AGL: 40,8 mg/ml da mistura ácido palmítico / ácido esteárico (Sigma 09586) dissolvido em etanol 96%. Etanol: etanol 96%.

ENZIMAS

[0515] *Phyzyme* conforme descrito na presente invenção. A *Ronozyme P-CT* e *Natuphos* são fitases fúngicas disponíveis comercialmente. BP17 conforme descrito na presente invenção. As amostras foram obtidas como produto seco. 1 g da amostra foi inicialmente ressuspenso em 50 ml de acetato de sódio 0,25 M, CaCl_2 1 mM, 0,01% de Tween 20, pH 5,5 e extraído com um agitador magnético por 20 min. A mistura de extração foi preenchida com 100 ml com 0,25 M de acetato de sódio, 1 mM de CaCl_2 , 0,01% de Tween 20, pH 5,5 e filtrado através de um filtro de fibra de vidro. A atividade da fitase dos extratos finais foi mensurada de acordo com o ensaio de fitase descrito em Materiais e Métodos.

[0516] As amostras de fitase foram diluídas em 0,25 M de acetato de sódio, 1 mM de CaCl_2 , 0,01% de Tween 20, pH 5,5 para uma atividade enzimática de 0,3 FTU/ml.

HIDRÓLISE DE ÁCIDO FÍTICO PELA FITASE:

[0517] 0,5 ml de etanol foi misturado com 1,4 ml de tampão de ensaio e 1 ml de solução de fitato em um tubo de ensaio de 12 ml. A mistura foi equilibrada em banho-maria a 37 °C por 5 min antes que a reação fosse iniciada pela

adição de 0,1 ml de solução de fitase. Para a medição do branco, 0,1 ml de tampão de ensaio foi adicionado ao invés da solução de fitase. Após 1 hora de incubação a 37 °C a reação foi interrompida pela adição de 0,75 ml de HCl 2,5 M. Todas as incubações foram realizadas em duplicata.

HIDRÓLISE ÁCIDO FÍTICO PELA FITASE COM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE CaCl_2

[0518] O volume apropriado da solução de CaCl_2 , foi misturado a um tubo de ensaio 12 ml com 0,5 ml de etanol, 1 mL de solução de fitato e tampão de ensaio para um volume final de ensaio de 3 ml. A mistura foi equilibrada em banho-maria a 37 °C por 5 min antes que a reação fosse iniciada pela adição de 0,1 ml de solução de fitase. Para a medição do branco, 0,1 ml de tampão de ensaio foi adicionado ao invés da solução de fitase. Após 1 hora de incubação a 37 °C a reação foi interrompida pela adição de 0,75 ml de HCl 2,5 M. Todas as incubações foram realizadas em duplicata.

HIDRÓLISE ÁCIDO FÍTICO PELA FITASE NA PRESENÇA DE 15 MM DE CaCl_2 E COM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE AGL

[0519] O volume apropriado da solução de AGL foi misturado a um tubo de ensaio de 12 ml com etanol para um volume de 0,5 ml. Foram adicionados 0,15 ml da solução de cálcio, 1 ml da solução de fitato e tampão de ensaio para um volume final de ensaio de 3 ml. A mistura foi equilibrada em banho-maria a 37 °C por 5 min antes que a reação fosse iniciada pela adição de 0,1 ml de solução de fitase. Para a medição do branco, 0,1 ml de tampão de ensaio foi adicionado ao invés da solução de fitase. Após 1 hora de incubação a 37 °C a reação foi interrompida pela adição de 0,75 ml de HCl 2,5 M. Todas as incubações foram realizadas em duplicata.

MEDIÇÃO DA ATIVIDADE DA FITASE

[0520] A concentração de fosfato inorgânico nas amostras de hidrólise foram mensuradas utilizando o reagente fósforo (*Thermo Scientific*) no analisador Konelab. 180 µL de reagente fósforo foi misturado com amostra de 5 µL e incubado por 4 minutos a 37 °C antes da medição em OD₃₄₀ nm. O teor de fosfato foi

calculado usando o calibrador *sCal Konelab* e o controle *Nortrol Konelab Control* (Thermo Scientific). A atividade da fitase foi calculada como fosfato inorgânico liberado pela subtração da medição do branco a partir do resultado. Todas as atividades foram calculadas em relação à amostra sem a presença de CaCl_2 .

RESULTADOS

[0521] A Figura 30 exibe a produção de um complexo de ácido fítico e cálcio resistente a fitase e a reversão pela adição de ácidos graxos livres. A Figura 30A exibe o efeito de concentrações crescentes de CaCl_2 sobre a atividade da fitase. A Figura 30B exibe o efeito da adição de ácidos graxos livres na mistura de reação contendo 15 mM deste sobre a atividade da fitase.

[0522] Os resultados da hidrólise do ácido fítico com o concentração crescente de CaCl_2 são apresentados na FIGURA 30A. A diminuição da atividade da fitase com o aumento da concentração de CaCl_2 é observada para todas as quatro fitases. Para a *Phyzyme*, BP17, e *Ronozyme P* a atividade reduzida começa em 5mM de CaCl_2 , enquanto *Natuphos* teve um aumento na atividade a partir de 5 mM e uma redução da atividade a partir de 15 mM de CaCl_2 . Aos 20 mM de CaCl_2 nenhuma atividade fitase é observada para o *Phyzyme*, BP17, e *Ronozyme P*, indicando que em concentrações de CaCl_2 acima de 20 mM todo ácido fítico é ligado em um complexo resistente contra, pelo menos a hidrólise de *Phyzyme*, BP17 e *Ronozyme P*. Para o *Natuphos* uma redução significativa na atividade da fitase é observada em 30 mM de CaCl_2 , apesar de uma concentração de 60 mM de CaCl_2 parecer ser necessária para ligar todo ácido fítico em um complexo resistente à hidrólise contra o *Natuphos*. Os resultados sobre a atividade da fitase da *Phyzyme*, BP17, e *Ronozyme P* pela adição de ácidos graxos livres na mistura de reação contendo 15 mM de CaCl_2 é apresentado na Figura 30B. Quando é adicionado ácido graxos livres na mistura de reação contendo 15 mM de CaCl_2 , as fitases recuperam

a atividade cada vez mais com quantidades crescentes de ácidos graxos livres. Pequenas diferenças entre os três fitases em resposta à concentração de ácidos graxos livres é observada, embora todas as três tenham recuperado 100% da atividade em uma concentração de 25 mM de ácidos graxos livres. Isto demonstra claramente que ácidos graxos livres podem se ligar competitivamente ao cálcio e, desse modo, tem a capacidade de prevenir a formação de um complexo ácido fítico-cálcio resistente a fitase. Os ácidos graxos livres podem ser adicionados como um componente único, tal como demonstrado aqui, ou podem ser formados pela ação de uma lipase em um substrato de triglicérides.

EXEMPLO 11

Incubação Da Lipase Seguida Pelo Ensaio De Fitase - Efeito Da Adição De Cálcio À Mistura De Ensaio E Efeito Da Adição Da Mistura De Reação Da Lipase à um Ensaio Contendo CaCl_2 Sobre A Atividade Da Fitase

[0523] Resultados a partir de um estudo da formação do complexo ácido fítico-cálcio com o aumento da concentração de cálcio e recuperação da atividade fitase pela adição de ácido graxos livres produzido pela Lipase 3.

ANTECEDENTES

[0524] No exemplo 11 o efeito sobre a atividade da fitase pela adição de ácidos graxos livres à uma mistura de reação da fitase contendo 15 mM de CaCl_2 foi descrito. Neste exemplo, um experimento similar é realizado, embora os ácidos graxos livres sejam produzidos pela Lipase 3. Uma emulsão de triglicérides é incubada com a Lipase 3, uma fração desta mistura é posteriormente adicionada à mistura de reação da fitase contendo 30 mM de CaCl_2 e o efeito sobre a atividade da fitase é observado.

REAGENTES

[0525] Os reagentes apropriados e suas concentrações foram

os seguintes. Tampão da amostra de Lipase: 50 mM de acetato de sódio, pH 5,0, BSA 0,1% (p/v), NaCl 1,2% (p/v). Substrato de triglicérides: 2% de trioctanoato de glicerila (v/v), NaCl 0,3% (p/v), 13% de Triton X-100 (p/v), 120 mM de acetato de sódio pH 5,0. Tampão de ensaio de fitase: sódio-acetato 0,25 mM, pH 5,5. Solução de Fitato: 9,1 mM de ácido fítico na forma de hidrato de sal de sódio (Sigma P0109) em tampão de ensaio. Solução CaCl_2 : 0,3 M de CaCl_2 em tampão de ensaio. Etanol: etanol 96%.

ENZIMAS

[0526] A Lipase 3 e *Phyzyme* conforme descritos na presente invenção. A amostra de Lipase 3 foi diluída em tampão de amostra Lipase para uma atividade enzimática de 10 LIPU/ml. A amostra de fitase foi diluída em 0,25 M de acetato de sódio, 1 mM de CaCl_2 , 0,01% de Tween 20, pH 5,5 para uma atividade enzimática de 0,3 FTU/ml.

MISTURA DE REAÇÃO DA LIPASE

[0527] 5 ml de substrato de triglicerídeos foi misturado com 1,0 ml solução lipase em um tubo de ensaio de 12 ml. Para a mistura branco, 1,0 ml de tampão de amostra de Lipase foi adicionado ao invés da solução Lipase. As misturas foram incubadas em banho-maria a 30 °C durante 120 min sob agitação contínua. As misturas foram usadas diretamente como a mistura de reação Lipase ou mistura de reação branco, respectivamente, no ensaio de fitase seguinte.

Hidrólise ácido fítico pela fitase, com concentração crescente de CaCl_2 , incluindo a mistura de reação “branco”:

[0528] O volume apropriado da solução de CaCl_2 , foi misturado a um tubo de ensaio de 12 ml com 1,3 ml da mistura de reação “branco”, 1 mL de solução de fitato e tampão de ensaio para um volume final de ensaio de 3 ml. A mistura foi equilibrada em banho-maria a 37 °C por 5 min antes que a reação fosse iniciada pela adição de 0,1 ml de solução de fitase. Para a medição do branco,

0,1 ml de tampão de ensaio foi adicionado ao invés da solução de fitase. Após 1 hora de incubação a 37 °C a reação foi interrompida pela adição de 0,75 ml de HCl 2,5 M.

Hidrólise de ácido fítico pela fitase na presença de 30 mM de CaCl_2 e mistura de reação da Lipase:

1,3 ml mistura de reação em branco ou mistura de reação da Lipase foram misturados a um tubo de ensaio de 12 ml com 0,3 ml de solução de cálcio, 1 ml de solução fitato e tampão de ensaio para um volume final de ensaio de 3 ml. A mistura foi equilibrada em banho-maria a 37 °C por 5 min antes que a reação fosse iniciada pela adição de 0,1 ml de solução de fitase. Após 1 hora de incubação a 37 °C a reação foi interrompida pela adição de 0,75 ml de HCl 2,5 M.

MEDICÃO DA ATIVIDADE DA FITASE

[0529] A concentração de fosfato inorgânico nas amostras de hidrólise foram mensuradas utilizando o reagente fósforo (*Thermo Scientific*) no analisador Konelab. 180 μL de reagente fósforo foi misturado com amostra de 5 μL e incubado por 4 minutos a 37 °C antes da medição a uma $\text{OD}_{340 \text{ nm}}$. O teor de fosfato foi calculado usando o calibrador *sCal Konelab* e o controle *Nortrol Konelab Control* (*Thermo Scientific*). A atividade da fitase foi calculada como fosfato inorgânico liberado pela subtração da medição do branco a partir do resultado. Todas as atividades foram calculadas em relação à amostra sem a presença de CaCl_2 .

RESULTADOS

[0530] A Figura 31 exhibe a produção de um complexo de ácido fítico e cálcio resistente a fitase e a reversão pela adição da mistura de reação Lipase contendo lipase. A Figura 31A exhibe o efeito de concentrações crescentes de CaCl_2 sobre a atividade da fitase e a Figura 31B exhibe o efeito da adição da mistura de reação Lipase na mistura de reação fitase contendo 30 mM de CaCl_2 sobre a atividade da fitase.

[0531] Os resultados da hidrólise do ácido fítico com o

concentrações crescentes de CaCl_2 na presença de uma mistura de reação da lipase em branco (sem lipase presente) são apresentados na Figura 31A. A diminuição da atividade da fitase com o aumento da concentração de CaCl_2 é observada com uma redução significativa na atividade da fitase em 30 mM de CaCl_2 e nenhuma atividade remanescente é observada em uma concentração de 40 mM de CaCl_2 . Este perfil de inibição do cálcio é diferente da curva correspondente mostrada no Exemplo 11. A razão é a quantidade de Triton X-100 aplicada para emulsionar o substrato de triglicerídeos na mistura de reação da lipase, o que resulta no dobro de Triton X-100 presente na mistura de reação da fitase em relação ao experimento descrito no Exemplo 11. A mudança de concentração do Triton X-100 altera as propriedades para a formação dos complexos entre o ácido fítico e o cálcio.

[0532] Os resultados da adição da mistura de reação da lipase para a mistura de reação da fitase contendo 30 mM de CaCl_2 são apresentados na Figura 31 B. A adição da mistura de reação da lipase contendo lipase resulta em um aumento significativo da atividade da fitase em comparação com as amostras sem a adição de lipase.

[0533] Isto demonstra claramente que os ácidos graxos livres produzidos pela atividade da lipase sobre o substrato triglicerídeo podem se ligar competitivamente ao cálcio e, desse modo, tem a capacidade de prevenir a formação de um complexo ácido fítico-cálcio resistente a fitase. Quando o complexo ácido fítico-cálcio não é formado, uma maior quantidade de ácido fítico é mais facilmente acessível para a degradação pela fitase, levando ao aumento da atividade da fitase.

[0534] No animal, esse aumento na atividade da fitase como resultado da atividade lipase, levará a um aumento de P e retenção de Ca, bem como o aumento da digestibilidade aparente de aminoácidos (Ravindran, V. *et al*, *Br. Poult. Sci.*, 41, 193-200 (2000) e Selle, PH *et al*, *Livestock Science*, 124, 126-141 (2009)). Isto levará a um aumento de P e retenção Ca, bem como um aumento da

metabolizabilidade da energia e digestibilidade aparente de aminoácidos quando comparado com animais não suplementados com lipase em cima da fitase.

Exemplo 12

Perfil De pH De Lipases Na Alimentação Animal

[0535] Resultados de um estudo do perfil de pH da Lipase 3 e lipase pancreática na alimentação animal.

[0536] Amostras de ração são incubadas a 40 °C com Lipase 3 e lipase pancreática utilizando tampões de diferentes pHs para demonstrar o perfil de pH da Lipase 3 e lipase pancreática.

ENZIMAS

[0537] Lipase 3 conforme descritos na presente invenção. A lipase pancreática foi usada na forma de pancreatina de pâncreas suíno (Sigma P7545). A amostra de Lipase 3 foi diluída em H₂O para uma atividade enzimática de 300 LIPU/ml. A amostra de pancreatina foi diluída em H₂O a uma concentração de 2 mg/ml.

REAGENTES

[0538] Os tampões apropriados e suas concentrações foram os seguintes. 0,25 M de HCl; 0,5 M de glicina-HCl; pH 2,5; 0,5 M de glicina-HCl; pH 3,5; 0,5 M de fosfato de sódio; pH 6,5; 0,5 M de fosfato de sódio; pH 7,5; 0,5 M de Tris; pH 8,5; 1 M de NaHCO₃; pH 10. Outros reagentes foram os seguintes. Solução TDC: taurodeoxicolato de sódio (Sigma T0875) foi diluído em H₂O a 80 mM. A amostra de ração utilizada foi uma dieta de milho - soja básica contendo 60,01% de milho, 31,52% de farelo de soja 48,4% de óleo de soja, 0,4% de sal, 0,2% de DL Metionina, 1,16% de calcário, 1,46% de fosfato bicálcico, e 1,25% de mistura de vitamina.

INCUBAÇÃO IN VITRO COM TAMPÕES DE DIFERENTES PHs

[0539] Para cada incubação, um g de amostra de ração milho-soja foi pesado em um tubo de 50 ml com tampa de rosca. 0,1 ml de

solução enzimática seguido de 0,1 ml de solução TDC e 1,8 ml do respectivo tampão foram adicionados aos respectivos tubos. Cinco bolinhas de vidro foram adicionadas antes das amostras serem incubadas a 40 °C em banho-maria sob agitação por 120 min. Após a incubação os tubos foram centrifugados por 10 min a 3500 rpm e o pH do sobrenadante foi mensurado. Posteriormente as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e colocadas no liofilizador durante a noite. Todas as incubações foram realizadas em duplicata.

Medição de ácidos graxos livres

[0540] A quantidade de ácidos graxos livres produzidos durante a incubação foi mensurada usando um kit NEFA-HR (2) (WAKO Chemicals GmbH). As amostras foram colocadas em temperatura ambiente e foram adicionados 20 ml de etanol 96%. As amostras foram ressuspensas manualmente antes da mistura em uma roda giratória por 1 hora em temperatura ambiente. Após a incubação os tubos foram centrifugados por 10 min a 3500 rpm. O sobrenadante foi diluído 5 vezes em etanol 96% antes dos ácidos graxos livres na amostra serem mensurados. 110 µL de reagente R1 do kit NEFA foi equilibrado por 5 minutos a 37 °C antes da adição de 15 µL de amostra diluída, e a mistura de reação foi incubada a 37 °C por 10 minutos. 55 µL do reagente R2 do kit NEFA foi adicionado e a incubação continuou por mais 10 minutos a 37 °C antes da OD₅₂₀ nm ser mensurada. O teor de ácidos graxos livres é calculado a partir de uma curva padrão preparada a partir do kit NEFA Standard (WAKO Chemicals GmbH).

Resultados

[0541] A Figura 32 exibe o perfil de pH da Lipase 3 e lipase pancreática mensuradas em uma dieta de milho-soja. A concentração de lipase 3 foi de 30 LIPU/g de ração e da concentração de lipase pancreática foi de 0,2 mg/ml de ração. A atividade é exibida como em relação à maior quantidade

medida de ácidos graxos livres produzidos.

[0542] O pH nos diferentes tampões foram os seguintes para a Lipase 3 e lipase pancreática, respectivamente: 0,25 M de HCl fornece pH 3,41 e pH 3,02, 0,5 M de Glicina-HCl, pH 2,5 fornece pH 3,99 e pH 3,76, 0,5 M de Glicina-HCl, pH 3,5 fornece pH 4,93 e pH 5,18, 0,5 M de sódio-fosfato, pH 6,5 fornece pH 6,45 e pH 6,45, 0,5 M de sódio-fosfato, pH 7,5 fornece pH 7,26 e pH 7,22, 0,5 M de Tris, pH 8,5 fornece pH 8,33 e pH 8,18; 1 M de NaHCO_3 , pH 10 fornece pH 9,95 e pH 10,07. Para a Lipase 3 o pH ótimo na reação é encontrado em pH 4,0 com diminuição da atividade tanto em pH inferior quanto em pH superior. O pH 3,4 é o mais baixo pH avaliado e a atividade provavelmente vai continuar a diminuir ainda mais com a diminuição do pH. Para a lipase pancreática o pH ótimo na reação é encontrado no pH 8,2 com diminuição da atividade tanto em pH inferior quanto em pH superior. A conclusão é que a Lipase 3 tem um perfil de pH muito diferente do perfil de pH da lipase pancreática. Além disso, o perfil de pH da Lipase 3 indica que Lipase 3 poderia ser muito eficaz na hidrólise de gordura no ambiente ácido no estômago de um porco ou moela de uma galinha.

EXEMPLO 13

DIGESTIBILIDADE ILEAL E RETENÇÃO DE FÓSFORO E CÁLCIO NO TRATO TOTAL DE DIETAS SUPLEMENTADAS COM LIPASE, FITASE E A COMBINAÇÃO DE FITASE + LIPASE VERSUS UMA DIETA CONTROLE EM FRANGOS DE CORTE

Materiais e Métodos

[0543] Os experimentos foram conduzidos para avaliar a digestibilidade ileal, e a retenção P e Ca no trato total em frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com lipase ou fitase sozinhas, e lipase e fitase em combinação, em a comparação com uma dieta controle negativo. As dietas (Tabela 4) foram baseadas em milho e farelo de soja, e continham DDGS de milho, farelo de glúten de milho e óleo de soja.

TABELA 4**Composição e Análise Calculada (g/kg conforme alimentado) das dietas**

Ingrediente	Pré-inicial (0-14 d; g/kg)	Controle negativo (14-21 d; g/kg)
Milho	498,3	496,8
DDGS de milho	50,0	50,0
Glúten de milho, 60%	50,0	50,0
Farelo de soja, 48%	311,9	312,2
Milho/amido de trigo	2,0	2,0
Óleo de soja	40,0	40,0
HCl Lisina	3,8	3,8
DL-metionina	2,7	2,7
L-treonina	1,0	1,0
Marcador inerte	3,0	3,0
Sal	3,6	3,6

Ingrediente	Pré-inicial (0-14 d; g/kg)	Controle negativo (14-21 d; g/kg)
Calcário	13,8	3,0
Fosfato bicálcico	16,4	13,5
Traço mineral – pré mistura vitamínico	3,5	3,5
Espaço (Enzima)	0,0	14,9
Análise calculada		
Energia metabolizável, kcal/kg	3,140	3,100
Proteína bruta, g/kg	240	240
Lisina digestível, g/kg	12,6	12,6
Metionina, g/kg	6,4	6,4
Cisteína + metionina, g/kg	9,0	9,0
Treonina digestível, g/kg	7,9	7,9

Ingrediente	Pré-inicial (0-14 d; g/kg)	Controle negativo (14-21 d; g/kg)
Cálcio, g/kg	10,5	5,7
Fósforo disponível, g/kg	4,3	3,8

[0544] O delineamento experimental foi de 6 tratamentos dietéticos, cada um alocado aleatoriamente em 6 gaiolas replicadas (8 aves por gaiola) como segue:

1. Controle negativo (NC)
2. NC + lipase (1000 LIPU/kg)
3. NC + lipase (3.000 LIPU/kg)
4. NC + Fitase (500 FTU/kg).
5. NC + Fitase (500 FTU/kg) + lipase (1000 LIPU/kg).
6. NC + Fitase (500 FTU/kg) + lipase (3.000 LIPU/kg).

[0545] Pintos do dia de frangos de corte foram aleatoriamente designados para chocadeiras aquecidas eletricamente em uma sala de ambiente controlado. Os filhotes receberam iluminação fluorescente constante e tiveram livre acesso às dietas e água. As aves receberam uma dieta pré-inicial até o dia 14. Nesta idade, as aves foram atribuídas aos tratamentos dietéticos, com base no peso corporal, e transferidas para gaiolas produtoras. As aves foram alimentadas com as dietas experimentais a partir do dia 14 até o dia 21. A temperatura foi mantida em 31 °C para a primeira semana e então gradualmente reduzida para 22 °C até a terceira semana.

[0546] O consumo de ração e produção total de excreções de cada gaiola foram mensurados desde o dia 17 até o dia 20 pós-eclosão. As excreções de cada gaiola foram agrupadas, misturadas em um misturador e subamostradas. Cada subamostra foi liofilizada, triturada para passar por uma peneira de 0,5

mm e armazenada em recipientes hermeticamente fechados de plástico na - 4 °C, até o momento da análise. As dietas e amostras de excreções foram analisadas quanto a matéria seca (MS), cálcio (Ca) e fósforo (P).

[0547] No dia 21, duas aves de cada gaiola replicada foram selecionadas e submetidas à eutanásia por injeção intramiocárdica de pentabarbital de sódio. O intestino delgado foi imediatamente exposto e o conteúdo da metade inferior do íleo foi coletado por meio de uma lavagem cuidadosa com água destilada em recipientes de plástico. O íleo foi definido como a parte do intestino delgado que se estende do divertículo vitelino até 40 milímetros proximal da junção íleo-cecal. As digestas foram agrupadas dentro de uma jaula e foram liofilizadas, trituradas para passar por uma peneira de 0,5 mm, e armazenadas a -4 °C em recipientes hermeticamente fechados até a análise laboratorial para quantificar a MS, titânio, Ca e P.

[0548] Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA usando o PROC MIXED do SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). O modelo incluiu os efeitos fixos do tratamento dietético e o efeito aleatório do bloco. As médias foram separadas usando testes-t pareados. Cada gaiola foi considerada a unidade experimental para todos os cálculos. Um nível alfa de 0,05 foi utilizado para a determinação da significância estatística.

RESULTADOS

[0549] A Figura 33 exibe que a fitase não aumentou significativamente a digestibilidade ileal do fósforo em relação ao controle negativo, mas produziu um incremento numérico de 6,0% como era esperado. A Lipase, tanto a 1.000 quanto a 3.000 LIPU/kg, não produziu nenhum efeito sobre a digestibilidade ileal do fósforo em relação ao controle negativo. Em contrapartida, a combinação de lipase + fitase foi capaz de aumentar significativamente a digestibilidade ileal do fósforo em relação ao controle negativo em 14,3% a 1000 LIPU/kg e 10,6% a 3.000 U/kg de inclusão de lipase.

A combinação de lipase + fitase aumenta significativamente a digestibilidade ileal do fósforo em relação ao tratamento com fitase, apenas quando lipase foi incluída a 1000 u/kg por uma diferença de 7,8%.

[0550] A Figura 34 exhibe que não há efeitos significativos sobre a digestibilidade ileal de cálcio de qualquer um dos tratamentos com enzimas em comparação com a dieta controle negativo. No entanto, valores de digestibilidade do Ca numericamente maiores foram obtidos com as combinações de fitase + lipase, que apresentaram valores que foram 118,3% e 115,6% dos valores obtidos com a dieta controle negativo, quando lipase foi incluída a 1000 u/kg e 3.000 u/kg, respectivamente.

[0551] A Figura 35 demonstra que nem a inclusão da lipase nem a inclusão da fitase resultaram em diferenças significativas na retenção de fósforo no trato total em relação ao controle negativo. No entanto, a fitase produziu um incremento numérico de retenção de fósforo de 9,7% em relação ao controle negativo. A combinação de lipase + fitase aumentou significativamente a retenção de fósforo em relação ao controle negativo de 13,4% e 16,0% quando lipase foi suplementada em 1000 e 3.000 LIPU/kg, respectivamente.

[0552] A Figura 36 demonstra que nem a inclusão da lipase nem a inclusão da fitase resultaram em diferenças significativas na retenção de cálcio no trato total em relação ao controle negativo. No entanto, a combinação de fitase a 3.000 LIPU/kg aumentou significativamente a retenção de Ca para 17,7% em relação ao controle negativo.

[0553] Em resumo, nem lipase nem fitase produziram efeitos significativos sobre a digestibilidade do P e Ca no presente estudo. No entanto, a combinação de fitase e 1.000 LIPU/kg de lipase aumentou a retenção de fósforo ileal e no trato total em comparação ao controle negativo, e a digestibilidade ileal do fósforo em comparação com inclusão de fitase. A

combinação de fitase e 3.000 LIPU/kg de lipase aumentou a retenção de fósforo ileal e do trato total, e retenção de Ca do trato total em comparação ao controle negativo. Estes efeitos suplementares da lipase em cima de fitase na absorção e utilização do cálcio e fósforo parecem estar relacionados principalmente com a produção de ácidos graxos livres pela lipase no trato gastro intestinal, que promove a concorrência para o cálcio e melhora a atividade da fitase, conforme confirmado em exemplos *in-vitro* descritos na presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. SUPLEMENTO ALIMENTAR, compreendendo uma fitase e uma enzima lipolítica para aumentar a absorção de nutrientes em um alimento ao qual o suplemento alimentar é adicionado, caracterizado por:

(a) dita enzima lipolítica ser produzida em uma célula de *Trichoderma reesei* e compreender um ou mais de um polipeptídeo possuindo a sequência de SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 8; e

(b) dita fitase compreender uma ou mais de uma fitase de *E. coli* possuindo uma sequência de SEQ ID NO: 13 e uma fitase de *Buttiauxella* possuindo uma sequência a partir da qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 6.

2. SUPLEMENTO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por dita fitase possuir atividade fitase em um pH em uma faixa de pH 2,5 a pH 5,5, preferivelmente em um pH em uma faixa de pH 5,0 a pH 5,5.

3. SUPLEMENTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo nível de atividade específica da:

(a) dita fitase ser de pelo menos 100 FTU/mg, e

(b) dita enzima lipolítica ser de pelo menos 100 LIPU/mg.

4. SUPLEMENTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pela proporção entre enzima lipolítica e fitase estar na faixa de 1:3 a 12:1.

5. SUPLEMENTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado por compreender adicionalmente pelo menos um veículo fisiologicamente aceitável selecionado a partir de maltodextrina, calcário (carbonato de cálcio), ciclodextrina, trigo ou um componente do trigo, sacarose, amido, agente anti-espumante, Na₂SO₄, Talco, PVA e misturas destes.

6. SUPLEMENTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo suplemento alimentar compreender pelo

menos uma enzima adicional selecionada a partir do grupo que consiste em enzimas envolvidas no metabolismo do amido, degradação da fibra, metabolismo de lipídeos, proteínas ou enzimas envolvidas no metabolismo do glicogênio, acetil esterases, aminopeptidases, amilases, arabinases, arabinofuranosidases, carboxipeptidases, catalases, celulasas, quitinases, quimosina, cutinase, deoxirribonucleases, epimerases, esterases, galactosidases, glucanases, glucan lisases, endoglucanases, glucoamilases, glicose-oxidases, glicosidases, incluindo β -glicosidase, glucuronidases, hemicelulasas, hexose oxidases, hidrolases, invertases, isomerases, lacases, liases, manosidases, oxidases, oxidoredutases, pectato liases, pectina-acetil-esterases, pectina despolimerases, pectina-metil-esterases, enzimas pectinolíticas, peroxidases, fenoloxidases, poligalacturonases, proteases, ramno-galacturonases, ribonucleases, taumatina, transferases, proteínas de transporte, transglutaminases, xilanases, hexose oxidase (D-hexose: O₂-oxidoreductase, EC 1.1.3.5) β -glucanase, α -amilase, pectinase, celobiohidrolase, fosfatase ácida e/ou outros, ou combinações destes, mais preferivelmente pelo menos uma xilanase e/ou pelo menos uma amilase.

7. SUPLEMENTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado por adicionalmente compreender pelo menos um nutriente selecionado a partir de um ou mais dentre fósforo, cálcio, aminoácidos, gorduras e amido.

8. ALIMENTO PARA ANIMAIS, caracterizado por compreender o suplemento alimentar, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, adicionalmente compreendendo pelo menos um material alimentar de baixa fibra, em que pelo menos um material alimentar de baixa fibra é um dentre milho, trigo, farinhas de subproduto de origem animal ou de soja.

9. MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM ALIMENTO PARA ANIMAIS, conforme definido na reivindicação 8, caracterizado por compreender

adicionar, a um material alimentar, um suplemento alimentar conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

10. MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM SUPLEMENTO ALIMENTAR, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado por compreender misturar uma enzima lipolítica e uma fitase.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por adicionalmente compreender a adição de pelo menos um veículo fisiologicamente aceitável selecionado a partir de maltodextrina, calcário (carbonato de cálcio), ciclodextrina, trigo ou um componente do trigo, sacarose, amido, antiespumante, Na_2SO_4 , Talco, PVA e misturas destes.

12. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 11, caracterizado por compreender a etapa adicional de:

- (a) homogeneização do suplemento alimentar, e/ou
- (b) peletização do suplemento alimentar.

13. USO DE UM SUPLEMENTO ALIMENTAR, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado por ser usado na fabricação de um alimento para animais para aumentar a disponibilidade de nutrientes e/ou aumentar a energia metabólica disponível de um material alimentar.

Fig.1**Sequência de aminoácidos da fitase P1-29 de *Buttiauxella* sp. tipo selvagem (SEQ ID NO: 1)**

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLG YITPRGEHLISLMGGFY
 RQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWADV DQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFH
 PVKAGTCSMDKTQVQQAVEKEAQTPIDNLNQHYIPFLALMNTTLNFS TSAWCQKHSADKSCDLG
 LSMPSKLSIKDNGNKVALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNIHSEQEWASLLKLHNVQ
 FDLMARTPYIARHNGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMR
 WTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQ PAGSVQLKIPGC
 NDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

Fig.2**Sequência de aminoácidos da fitase P1-29 de *Buttiauxella* sp. variante (SEQ ID NO: 2)**

NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPYT WPEWPVKLG YITPRGEHLISLMGGFY
 RQKFQQQGILPQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFH
 PVKAGICSMDKTQVQQAVEKEAQTPIDNLNQRYIPELALMNTVLNFSKSPWCQKHSADKPCDLA
 LSMPSRLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNIHSEQEWALLLKLHNVY
 FDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTN IANIAGMLNMR
 WTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPPGSVQLKIPGC
 NDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

Fig.3

(SEQ ID:4) BP-110	(1)	NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPYTWPEWPVKLGYYT	+	~
(SEQ ID:2) BP-112	(1)	NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPYTWPEWPVKLGYYT		
(SEQ ID:5) BP-111	(1)	NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPYTWPEWPVKLGYYT		
(SEQ ID:3) BP-17	(1)	NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYYT		
(SEQ ID:1)	(1)	NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYYT		
<i>Buttiauxella</i> -WT				
		51		100
BP-110	(51)	PRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILSQSSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGE		
BP-112	(51)	PRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILPQGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGE		
BP-111	(51)	PRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILPRGSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGE		
BP-17	(51)	PRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILSQSSCPTPNSIYVWTDVAQRTLKTGE		
<i>Buttiauxella</i> -WT	(51)	PRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILSQSSCPTPNSIYVWADVDQRTLKTGE		
		101		150
BP-110	(101)	AFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEA		
BP-112	(101)	AFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEA		
BP-111	(101)	AFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEA		
BP-17	(101)	AFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGICSMDKTQVQQAVEKEA		
<i>Buttiauxella</i> -WT	(101)	AFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVEKEA		
		151		200
BP-110	(151)	QTPIDNLNQRYIPELALMNTVLNFSKSPWCQKHSADKPCDLALSMPSRLS		
BP-112	(151)	QTPIDNLNQRYIPELALMNTVLNFSKSPWCQKHSADKPCDLALSMPSRLS		
BP-111	(151)	QTPIDNLNQRYIPELALMNTILNFSKSPWCQKHSADKPCDLALSMPSKLS		
BP-17	(151)	QTPIDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLS		
<i>Buttiauxella</i> -WT	(151)	QTPIDNLNQHYIPELALMNTTLNFSSTAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLS		
		201		250
BP-110	(201)	IKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLL		
BP-112	(201)	IKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLL		
BP-111	(201)	IKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQVWGNHSEQEWALLL		
BP-17	(201)	IKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLL		
<i>Buttiauxella</i> -WT	(201)	IKDNGNKVALDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLL		
		251		300
BP-110	(251)	KLHNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKI		
BP-112	(251)	KLHNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKI		
BP-111	(251)	KLHNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKI		
BP-17	(251)	KLHNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKI		
<i>Buttiauxella</i> -WT	(251)	KLHNVQFDLMARTPYIARHNGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKI		
		301		350
BP-110	(301)	LFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYV		
BP-112	(301)	LFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYV		
BP-111	(301)	LFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYV		
BP-17	(301)	LFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYV		
<i>Buttiauxella</i> -WT	(301)	LFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYV		
		351		400
BP-110	(351)	SVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPPGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTR		
BP-112	(351)	SVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPPGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTR		
BP-111	(351)	SVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPPGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTR		
BP-17	(351)	SVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPPGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTR		
<i>Buttiauxella</i> -WT	(351)	SVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPPGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTR		
		401		413
BP-110	(401)	VVSQSVEPGCQLQ		
BP-112	(401)	VVSQSVEPGCQLQ		
BP-111	(401)	VVSQSVEPGCQLQ		
BP-17	(401)	VVSQSVEPGCQLQ		
<i>Buttiauxella</i> -WT	(401)	VVSQSVEPGCQLQ		

Fig.4**BP-11 (SEQ ID NO:6)**

HHHHHHNDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPKLGYITPRGEHLIS
 LMGGFYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSIYVWTDVDQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQQNLEK
 ADPLFHPVKAGICSMCKTQVQQAVEKEAQTPIDNLNQHYIPSLALMNTTLNFSKSPWCQKHSAD
 KSCDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWALLL
 KLHNVYFDLMERTPYIARHKGTPLLQAISNALNPNTATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIA
 GMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQ
 LKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

Fig.5

SEQ ID NO: 7

1 **MFSGRFGVLL TALAALGAAA PAPLAVR**SVS TSTLDELQLF AQWSAAAYCS
 51 NNIDSKDSNL TCTANACPSV EEASTTMLLE FDLTNDFFGT AGFLAADNTN
 101 KRLVVAFRGS STIENWIANL DFILEDNDDL CTGCKVHTGF WKAWESA
 151 LTSKIKSAMS TYSGYTLYFT GHSLGGALAT LGATVLRNDG YSVELYTYGC
 201 PRIGNYALAE HITSQSGGAN FRVTHLNDIV PRVPPMDFGF SQPSPEYWIT
 251 SGNGASVTAS DIEVIEGINS TAGNAGEATV SVVAHLWYFF AISECLL

Sequência de aminoácidos da Lipase 3 (sequência sinal em negrito, pró-peptídeo em negrito e sublinhado)

Fig.6

SEQ ID NO: 8

1 SVSTSTLDEL QLFAQWSAAA YCSNNIDSKD SNLTCTANAC PSVEEASTTM
 51 LLEFDLTNDF GGTAFLAAD NTKRLVVAF RGSSTIENWI ANLDFILEDN
 101 DDLCTGCKVH TGFWKAWESA ADELTSKIKS AMSTYSGYTL YFTGHSLGGA
 151 LATLGATVLR NDGYSVELYT YGCPRIGNYA LAEHITSQGS GANFRVTHLN
 201 DIVPRVPPMD FGFSQPSPEY WITSGNGASV TASDIEVIEG INSTAGNAGE
 251 ATVSVAHLW YFFAISECLL

Sequência de aminoácidos da Lipase 3 (sem sequência sinal ou pró-peptídeo)

Fig.7

SEQ ID NO:9

Com a sequência de sinal

ATGTTCTCTGGACGGTTTGGAGTGTCTTTTGACAGCGCTTGCTGCGCTGGGTGC
TGCCGCGCCGGCACCGCTTGCTGTGCGGAGtagtggtgcccgatgagatggttgatagcact
gatgaagggtgaatagTGTCCTCGACTTCCACGTTGGATGAGTTGCAATTGTTTCGCGCA
ATGGTCTGCCGCGAGCTTATTGCTCGAATAATATCGACTCGAAAGACTCCAACCTTG
ACATGCACGGCCAACGCCCTGTCCATCAGTCGAGGAGGCCAGTACCCAGATGCT
GCTGGAGTTCGACCTgtatgtcactcagatcgagacatagcacagctaattgaacagGACGAAC
GACTTTGGAGGCACAGCCGGTTTCTGGCCGCGGACACACCAACAAAGCGGCT
CGTGTGCGCTTCCGGGAAGCAGCACGACCTCTGCACCGCTGCAAGGTCCTACTGCG
CTTCATCCTGGAAGATAACGACGACCTCTGCACCGCTGCAAGGTCCTACTGCG
TTTCTGGAAGGCATGGGAGTCCGCTGCCGACGAACTGACGAGCAAGATCAAGT
CTGCGATGAGCACGTAATTCGGGCTATACCTATACCTTACCCGGGCACAGTTTGG
GCGGCGCATTGGCTACGCTGGGAGCGACAGTTCTGCGAAATGACGGATATAGC
GTTGAGCTGgtgagtccttcacaaaggtagtgagcgacaatcgggttctgacagtaatagTACACCTAT
GGATGTCCTCGAATCGGAAACTATGCGCTGGCTGAGCATATCACCCAGTCAGGGA
TCTGGGGCCAACTTCCGTGTTACACACCTTGAACGACATCGTCCCCCGGTGCCA
CCCATGGACTTTGGATTTCAGTCAGCCAAAGTCCGGAATACTGGATCACCCAGTGGC
AATGGAGCCAGTGTACGGCGTCGGATATCGAAGTCATCGAGGGAATCAATTCA
ACGGCGGGAAATGCAGGCGAAGCAACGGTGAGCGTTGTGGCTCACTTGTGGTA
CTTTTTTGGCATTTCCGAGTGCCTGCTATAA

Sequência Sinal (negrito)
Introns (letras minúsculas)

Fig.8

SEQ ID NO:10

Sem a sequência de sinal

AgtaggtgtccccgatgtgagatgggttgatagcactgatgaagggtgaatagGTGTCTCGACT
 TCCACGTTGGATGAGTTGCAATTGTTCCGCGCAATGGTCTGCCGCGAGCT
 TATTGCTCGAATAATATCGACTCGAAAGACTCCAACCTTGACATGCACGG
 CCAACGCCCTGTCCATCAGTCGAGGAGGCCAGTACCACGATGCTGCTG
 GAGTTCGACCTgtatgtcactcagatcgagacatagcacagtaattgaaacagGACGA
 ACGACTTTGGAGGACACAGCCGGTTTCCCTGGCCGCGGACACCAAC
 AAGCGGCTCGTGGTCGCCCTCCGGGGAAGCAGCACGATTGAGAACTG
 GATTGCTAATCTTGACTTTCATCCTGGAAGATAACGACGACCTCTGCAC
 CGGCTGCAAGGTCCATACTGGTTTCTGGAAGGCATGGGAGTCCGCTG
 CCGACGAACTGACGAGCAAGATCAAGTCTGCGATGAGCACGTATTCTG
 GGCTATACCCCTATACCTCACCGGCACAGTTTGGCGGCGCATTTGGCT
 ACGCTGGGAGCGACAGTTCTGCGAAATGACGGATATAGCGTTGAGCT
 GgtagtccttcacaaaggtgatggagcgacaatcgggttgacagtcaatagTACACCTATG
 GATGTCCTCGAATCGGAACATATGCGCTGGCTGAGCATATCACCCAGTC
 AGGGATCTGGGGCCAACTTCCGTGTTACACACTTGAAACGACATCGTCC
 CCCGGTGCCACCCATGGACTTTGGATTTCAGTCAGCCAAGTCCGGAA
 TACTGGATCACCAAGTGGCAATGGAGCCAGTGTACGGCGTCGGATAT
 CGAAGTCATCGAGGGAATCAATTCAACGGCGGGAATGCAGGCGAAG
 CAACGGTGAGCGTTGTGGCTCACCTTGTGGTACTTTTTTTCGATTTCCG
 AGTGCCTGCTATAA

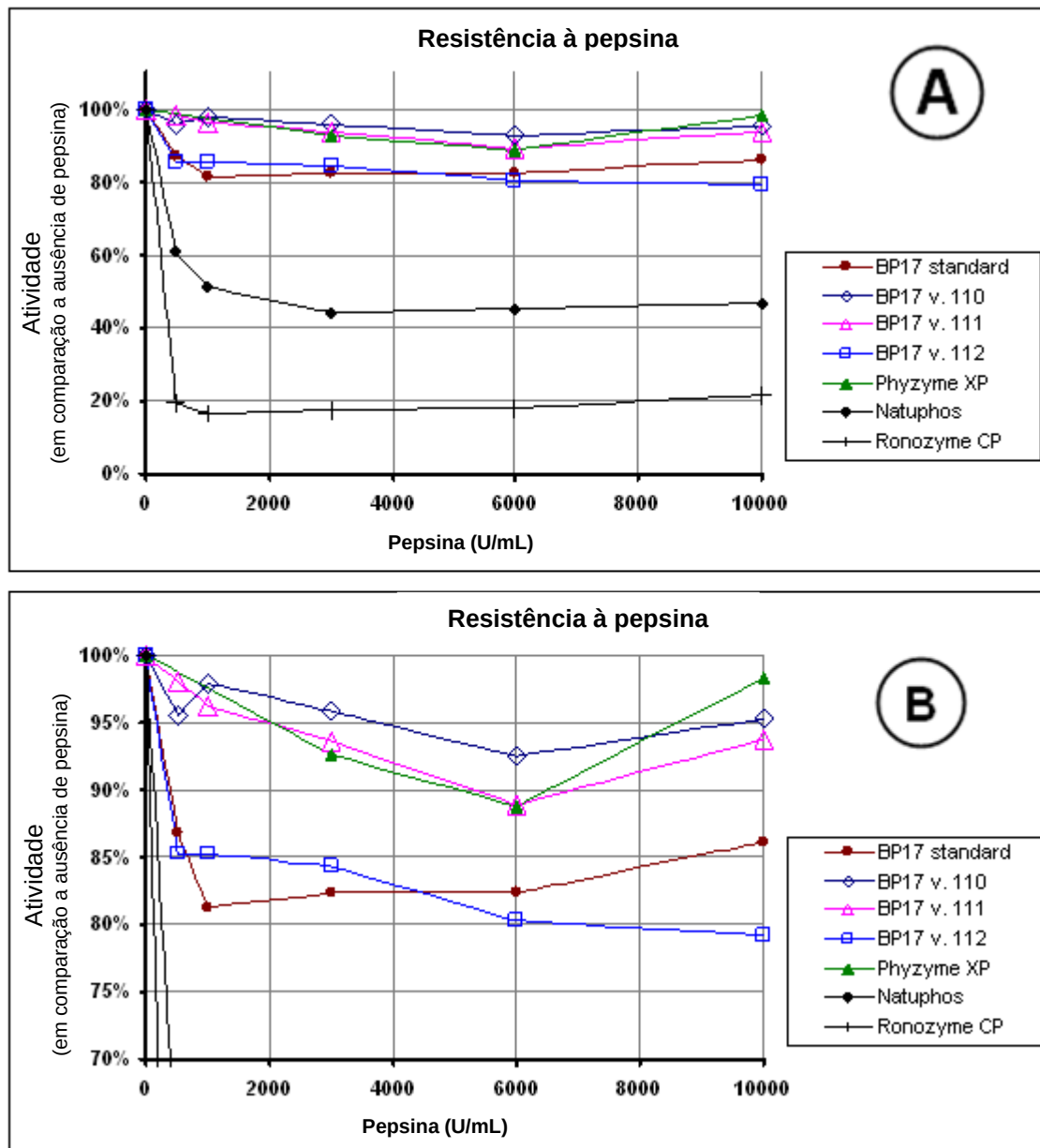
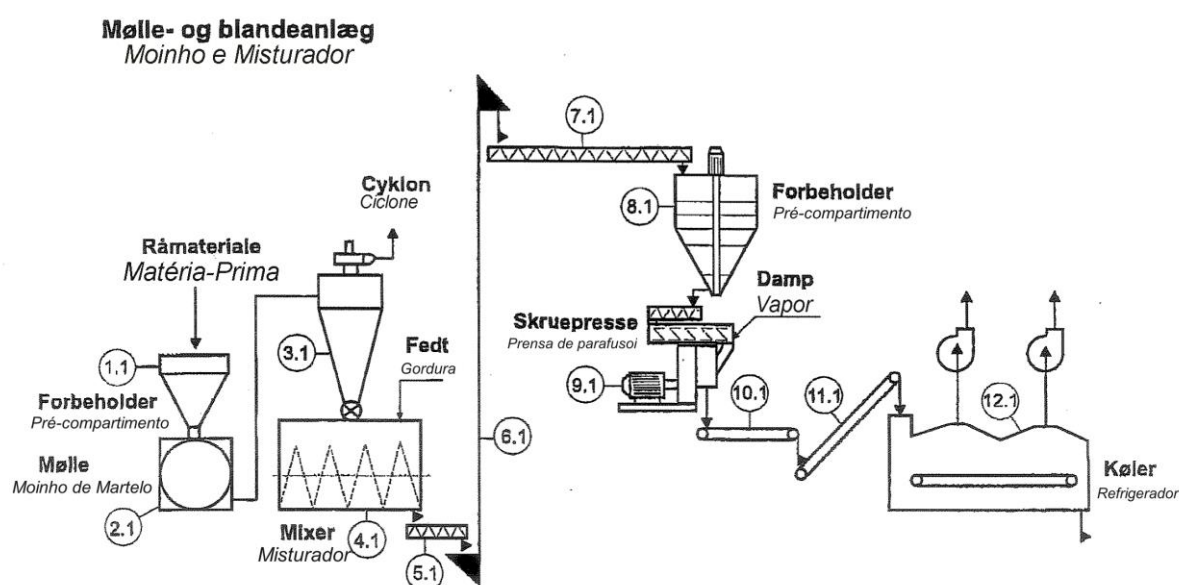
Fig.9

Fig.10

Foderstofanlæg

Usina de Moagem de Ração



- 1.1 Forbeholder, Pré-compartimento
- 2.1 Mølle, Moinho de Martelo
- 3.1 Cyklon, Ciclone
- 4.1 Horizontal mixer, misturador horizontal
- 5.1 Snegl, parafuso
- 6.1 Kopelevator, elevador de baldes
- 7.1 Snegl, parafuso
- 8.1 Forbeholder med mixer, pré-compartimento com misturador
- 9.1 Presse, prensa de parafuso
- 10.1 Transportbånd, correia transportadora
- 11.1 Transportbånd, correia transportadora
- 12.1 Køler, refrigerador

BI-forsøgsanlæg, tlf. +45 7557 1010
BI-Unidade piloto

Biotechnologisk
Institutt
Biotechnological
Institute

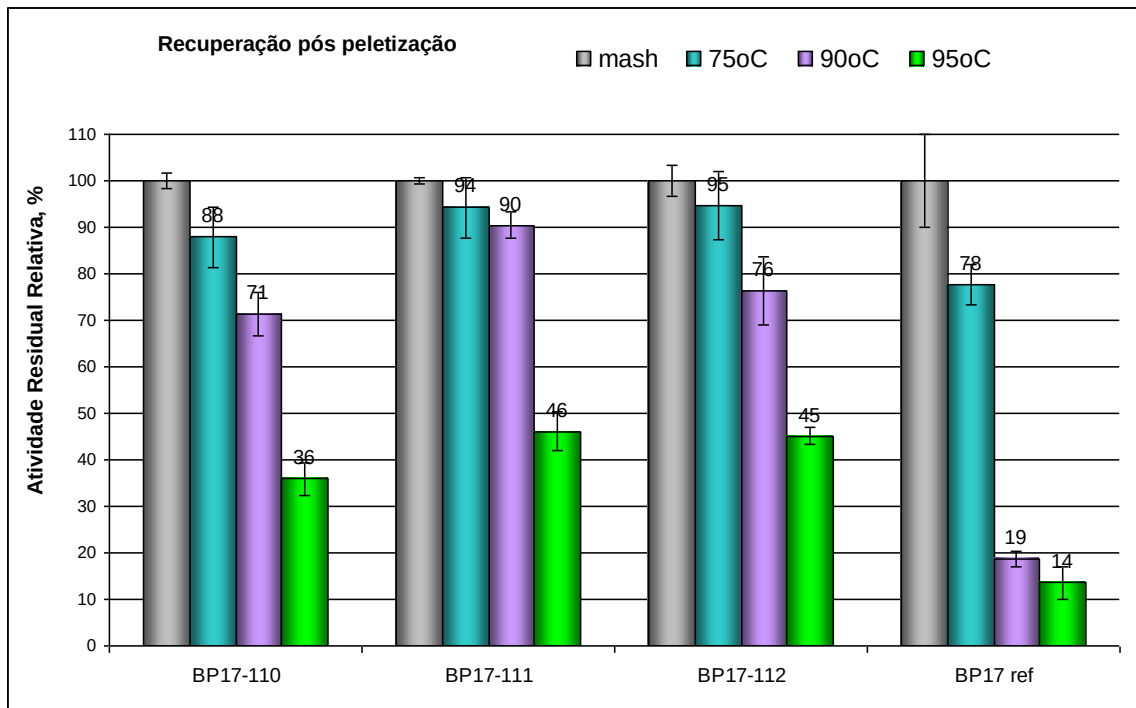
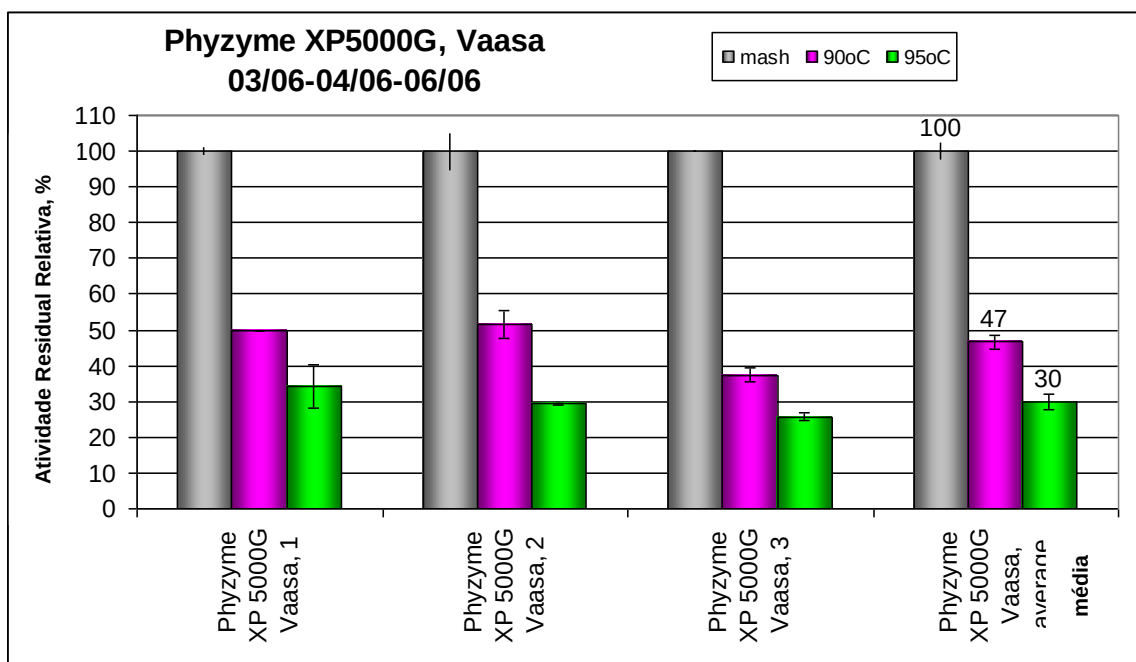
Fig.11**Fig.12**

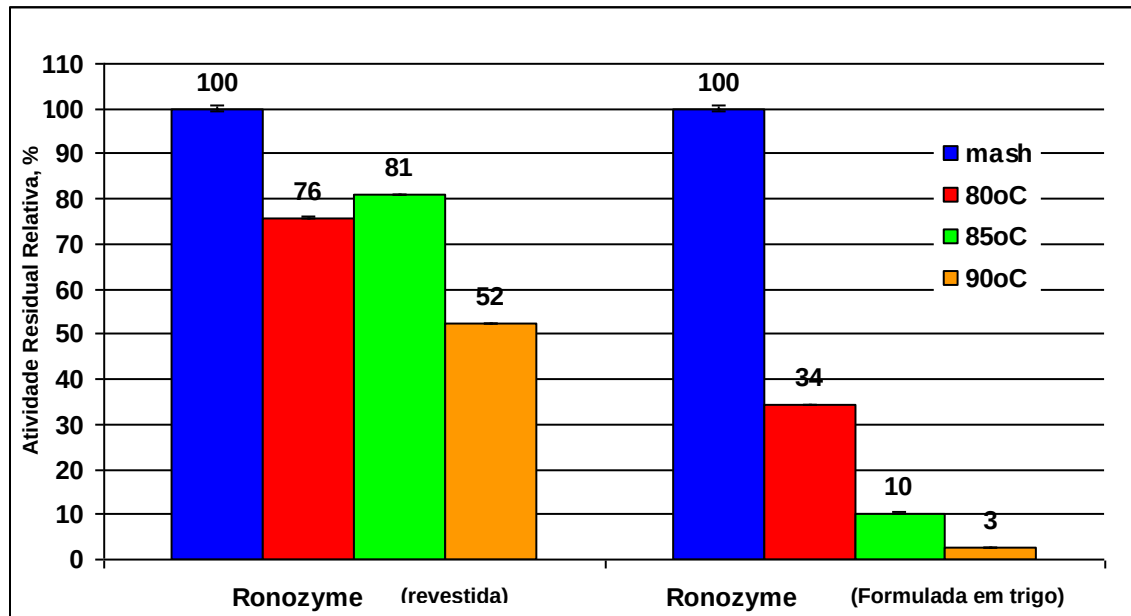
Fig.13

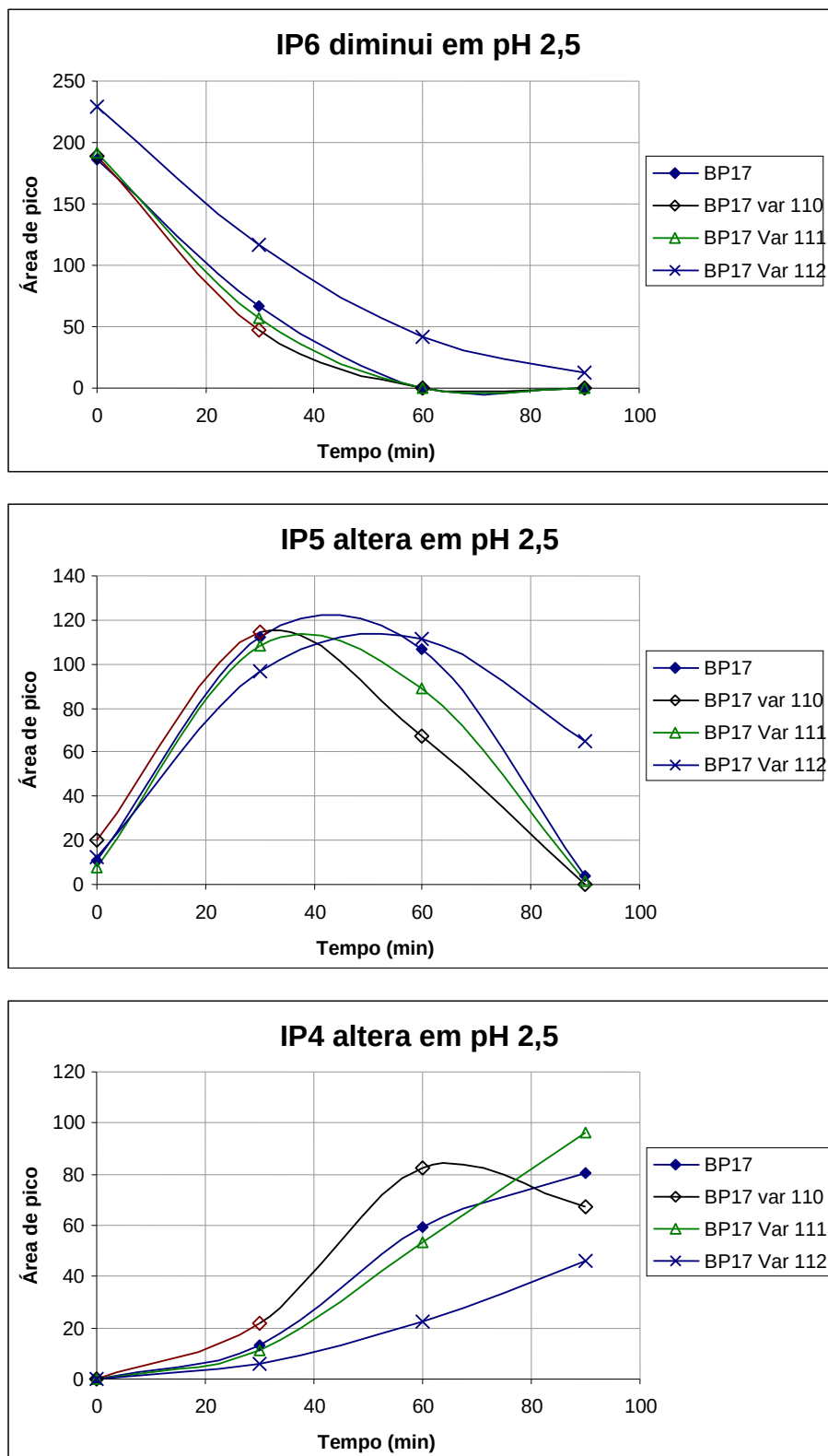
Fig.14

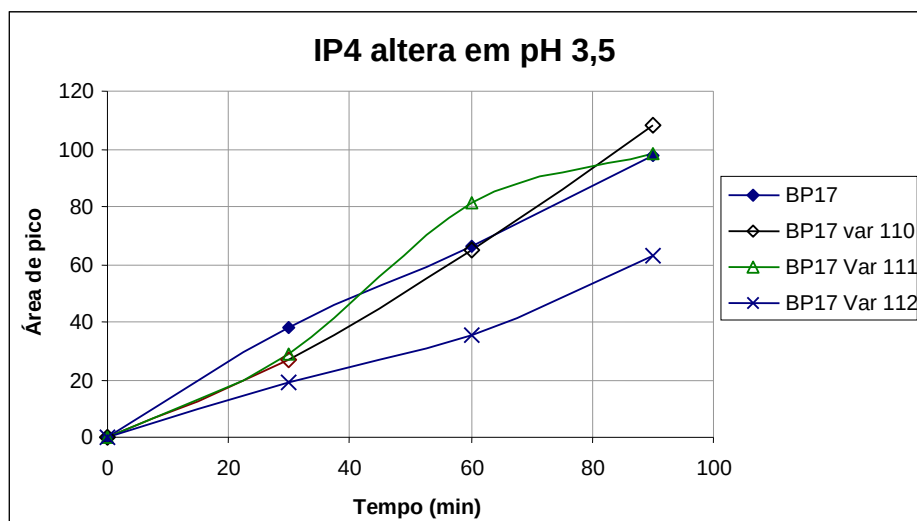
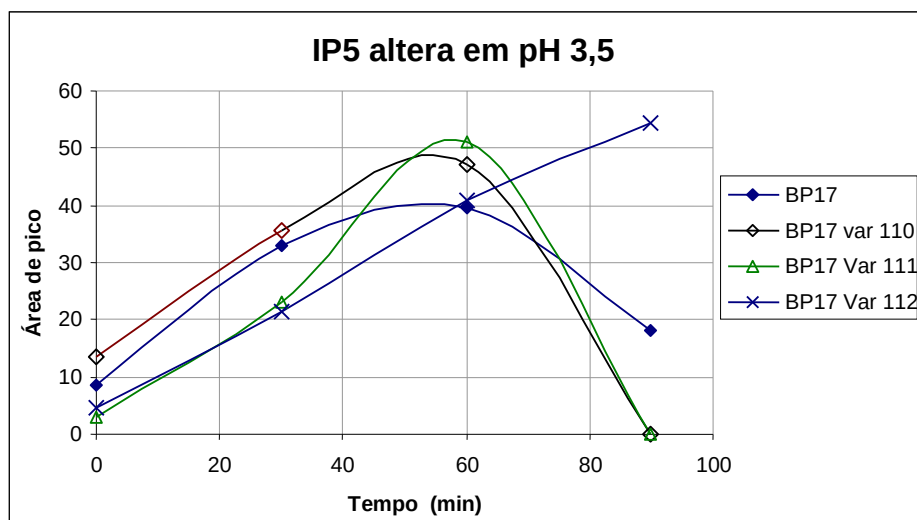
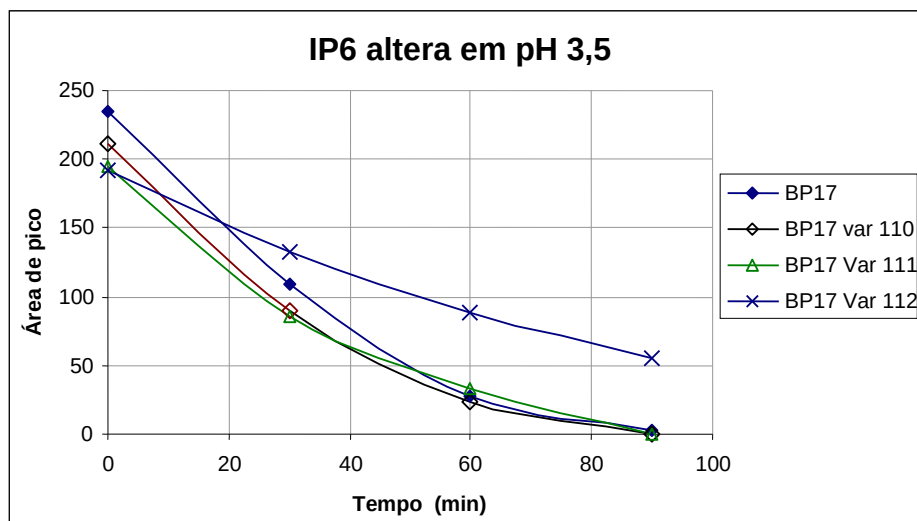
Fig.15

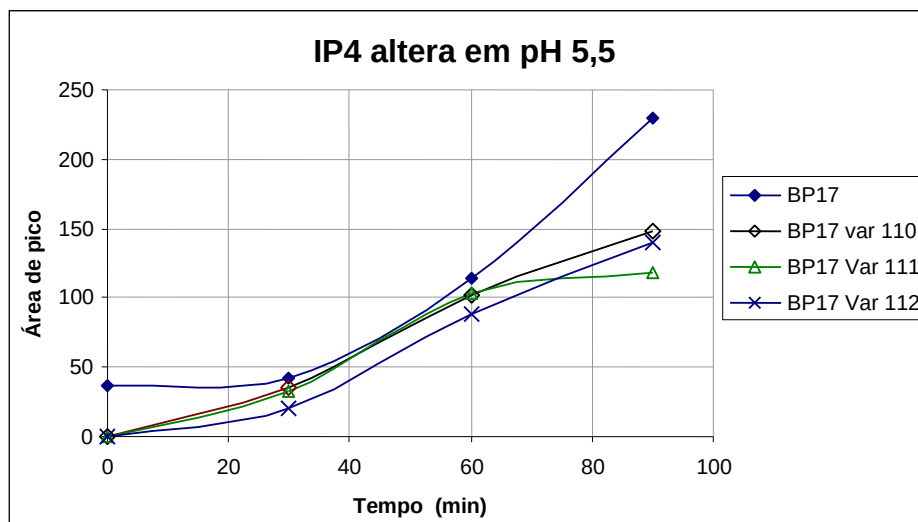
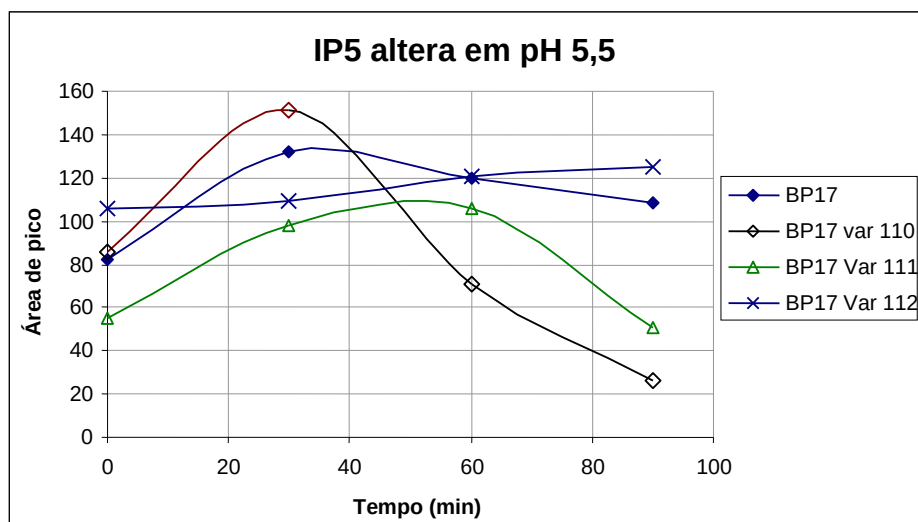
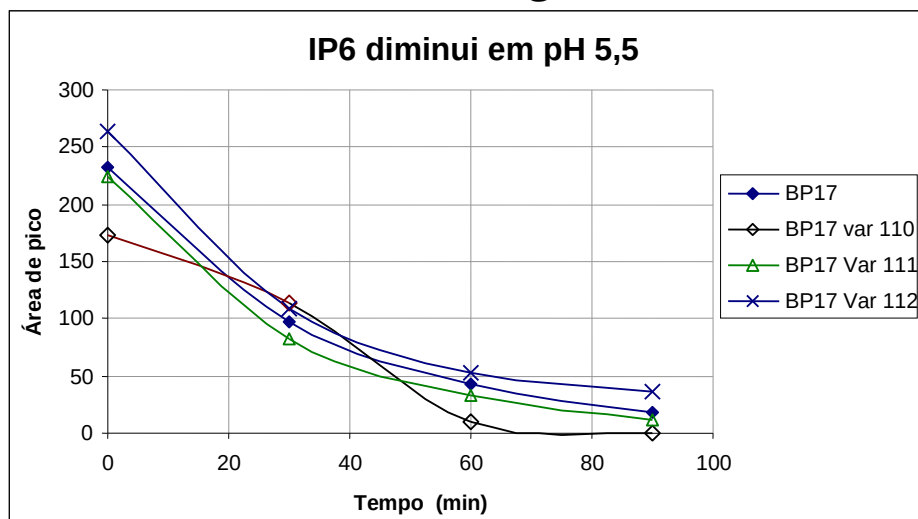
Fig.16

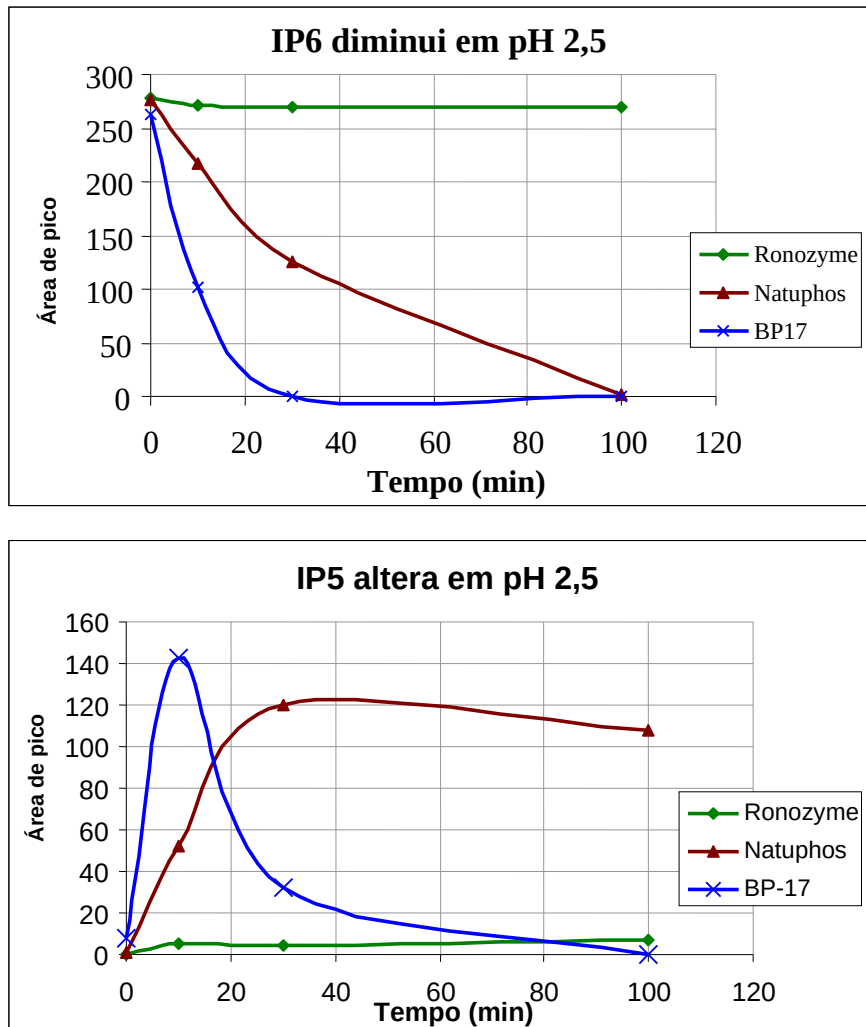
Fig.17

Figura 18

Fig.18

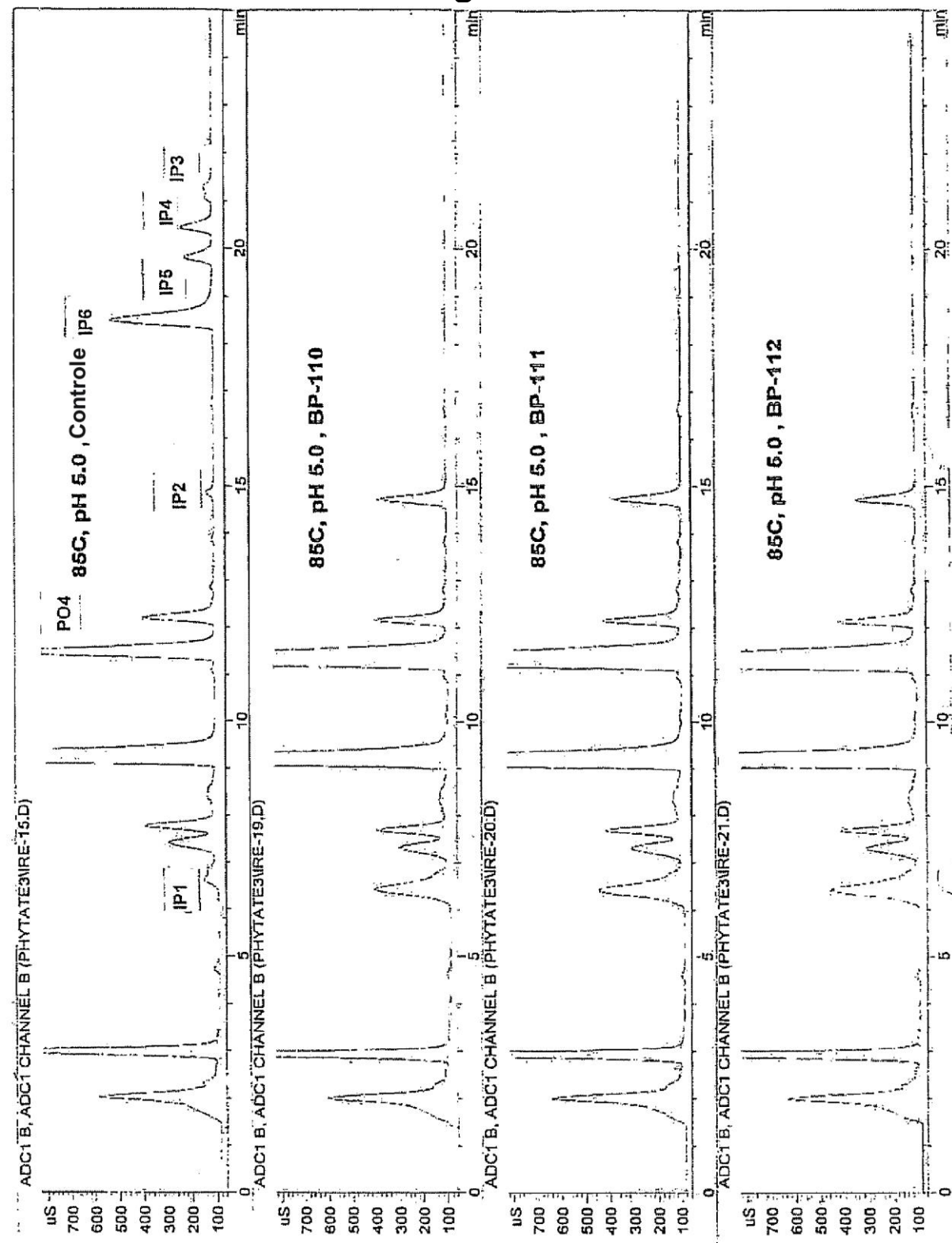


Fig.19

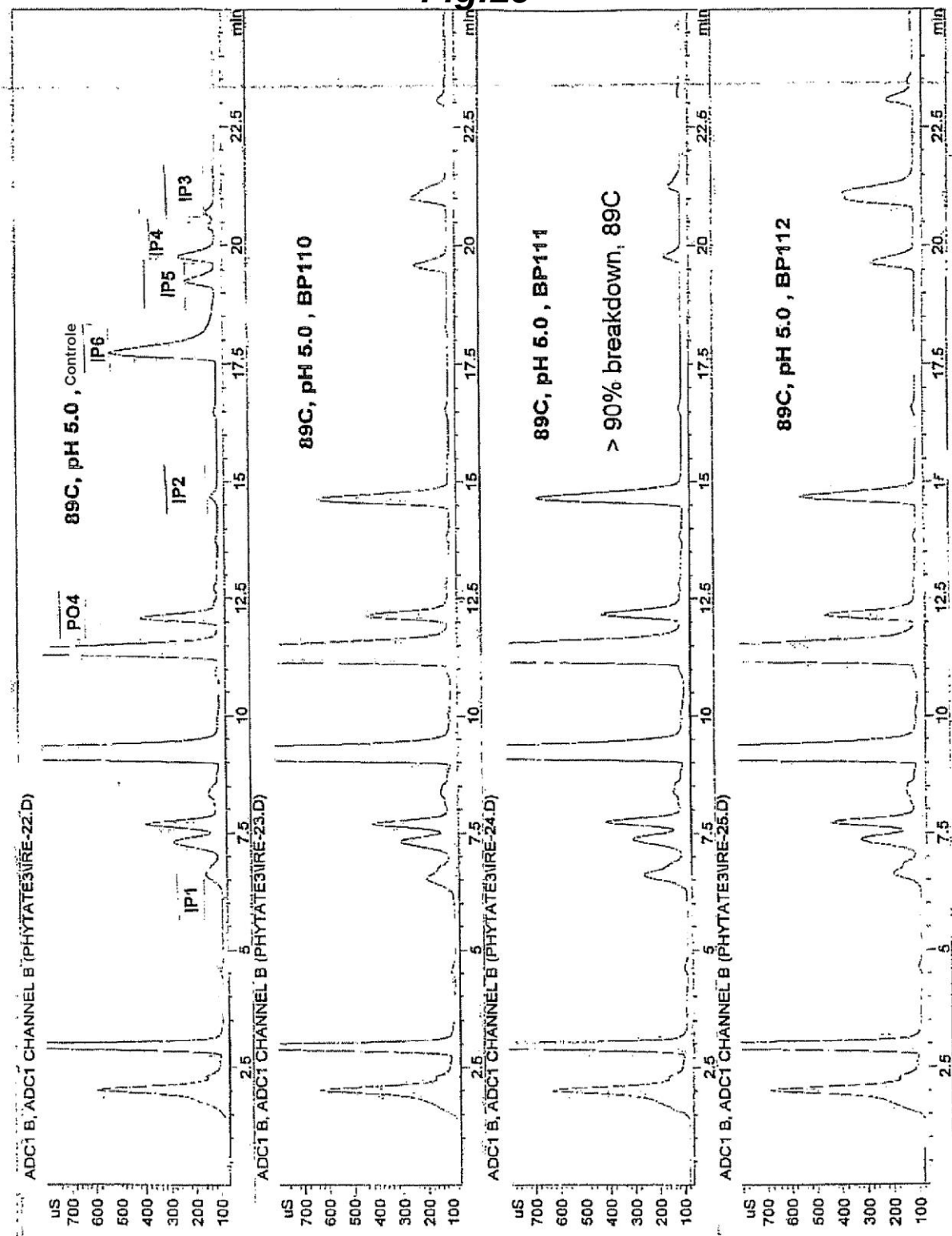


Fig.20

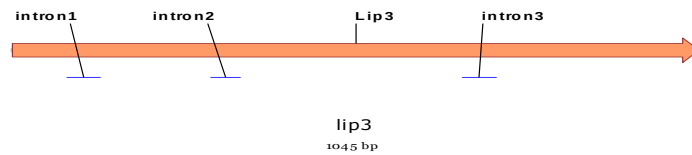


Fig.21

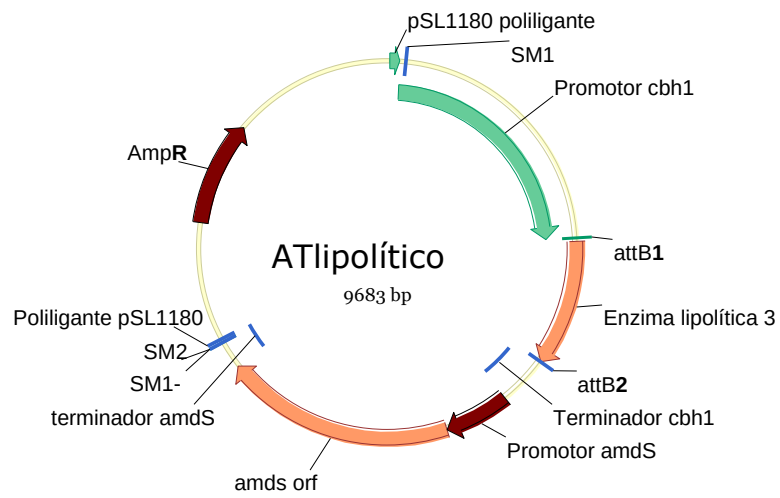


Fig.22

Uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de uma P1-29 de *Buttiauxella* sp. tipo selvagem (SEQ ID NO: 11)

AACGACACTCCCGCTTCAGGCTACCAGGTTGAGAAAGTGGTAATACTCAGCCGCCACGGGGTGC
GAGCACCAACCAAAATGACACAGACCATGCGCGACGTAACACCTAATACCTGGCCCGAATGGCC
AGTAAAATTGGGTTATATCACGCCACGCGGTGAGCATCTGATTAGCCTGATGGGCGGGTTTTAT
CGCCAGAAGTTTCAACAACAGGGCATTTTTATCGCAGGGCAGTTGCCCCACACCAAACCTCAATTT
ATGTCTGGGCAGACGTTGATCAGCGCACGCTTAAACTGGCGAAGCTTTCCTGGCAGGGCTTGC
TCCGGAATGTCATTTAACTATTCACCACCAGCAGGACATCAAAAAGCCGATCCGCTGTTCCAT
CCGGTGAAAGCGGGCACCTGTTCAATGGATAAACTCAGGTCCAACAGGCCGTTGAAAAAGAAG
CTCAAACCCCCATTGATAATCTGAATCAGCACTATATTCCCTTTCTGGCCTTGATGAATACGAC
CCTCAACTTTTCGACGTCGGCCTGGTGTCAGAAACACAGCGCGGATAAAAGCTGTGATTTAGGG
CTATCCATGCCGAGCAAGCTGTGATAAAAGATAATGGCAACAAAGTCGCTCTCGACGGGGCCA
TTGGCCTTTTCGTCTACGCTTGCTGAAATTTTCCTGCTGGAATATGCGCAAGGGATGCCGCAAGC
GGCGTGGGGGAATATTCATTCAGAGCAAGAGTGGGCGTCGCTACTGAAACTGCATAACGTCCAG
TTTGATTTGATGGCAGCACGCACGCTTATATCGCCAGACATAACGGCACGCCTTTATTGCAGGCCA
TCAGCAACGCGCTGAACCCGAATGCCACCGAAAGCAAACCTGCCTGATATCTCACCTGACAATAA
GATCCTGTTTATTGCCGGACACGATACCAATATTGCCAATATCGCAGGCATGCTCAACATGCGC
TGGACGCTACCTGGGCAACCCGATAACACCCCTCCGGGCGGCGCTTTAGTCTTTGAGCGTTTGG
CCGATAAGTCAGGGAACAATATGTTAGCGTGAGCATGGTGTATCAGACTCTCGAGCAGTTGCG
CTCCCAAACACCACTTAGCCTTAATCAACCTGCGGGAAGCGTACAGCTAAAAATTCTGGCTGT
AACGATCAGACGGCTGAAGGATANTGCCCGCTGTGACGTTCACTCGCGNGGTTAGCCAAAGCG
TGGAACCAGGCTGCCAGCTACAGTAA

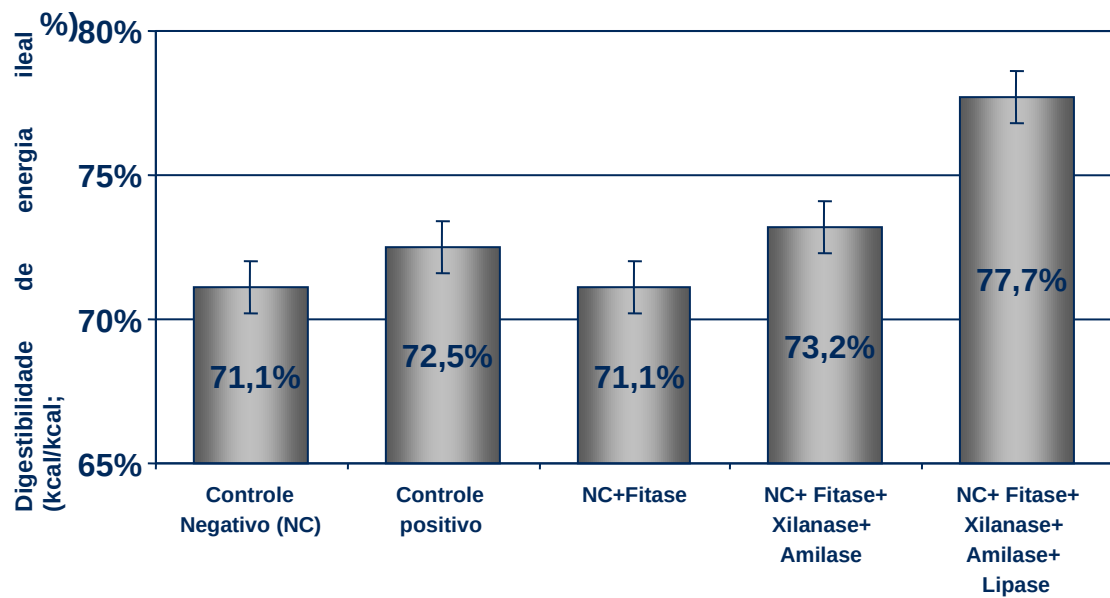
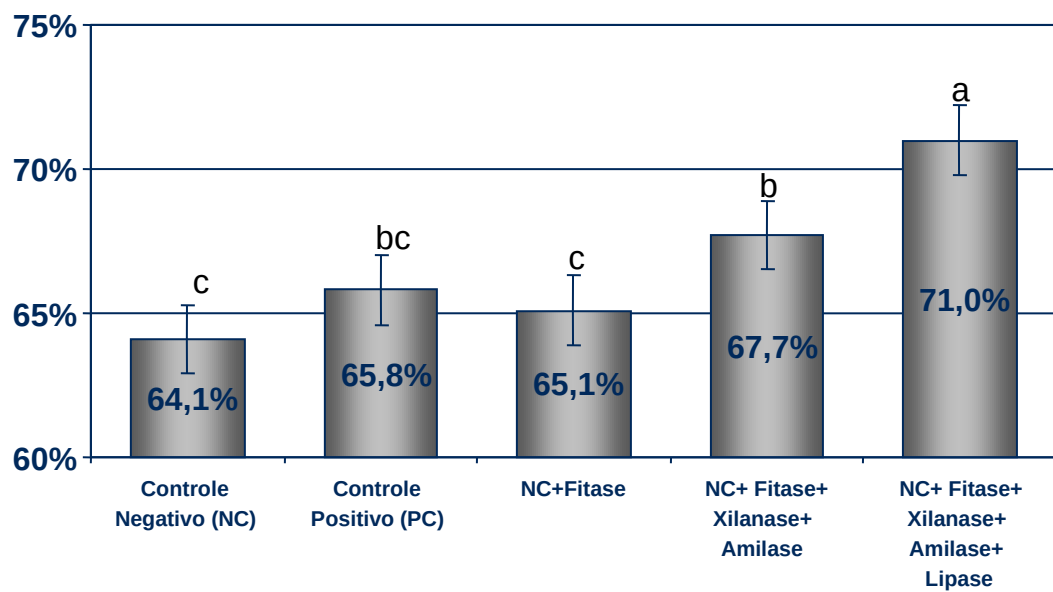
Fig.23**A****B**

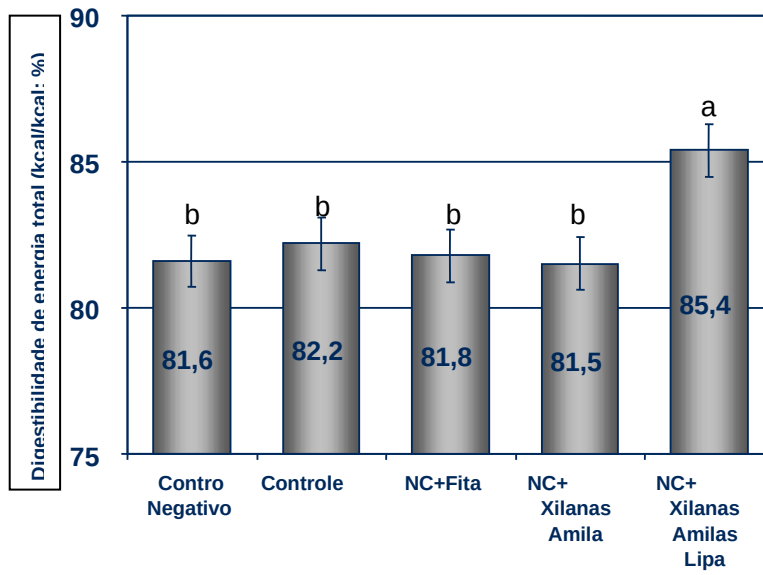
Fig.24

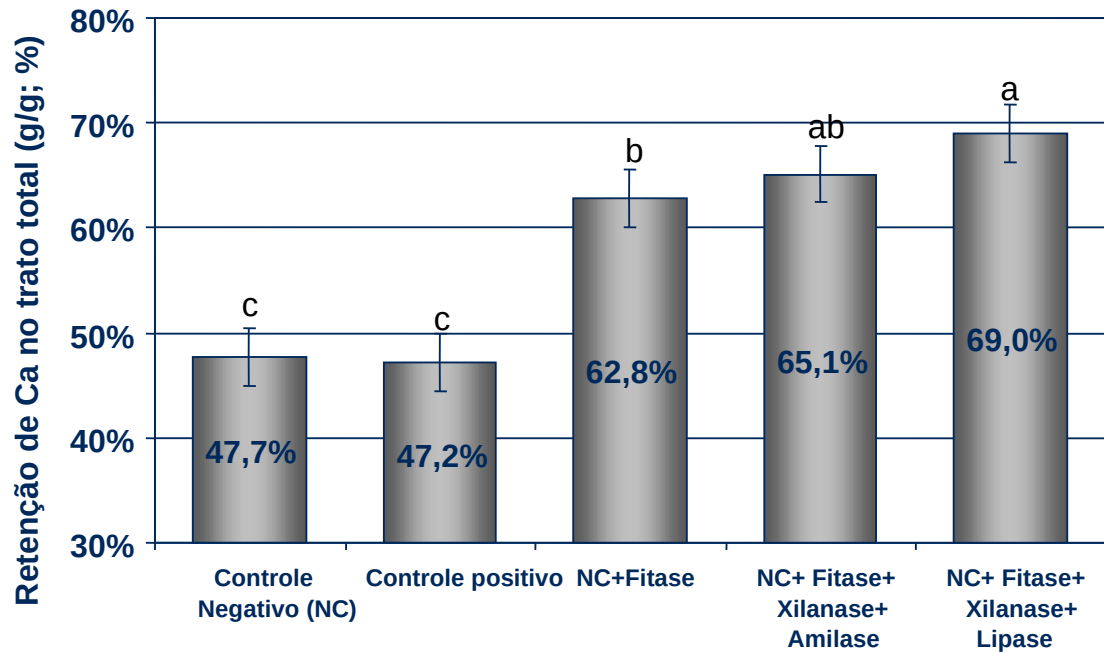
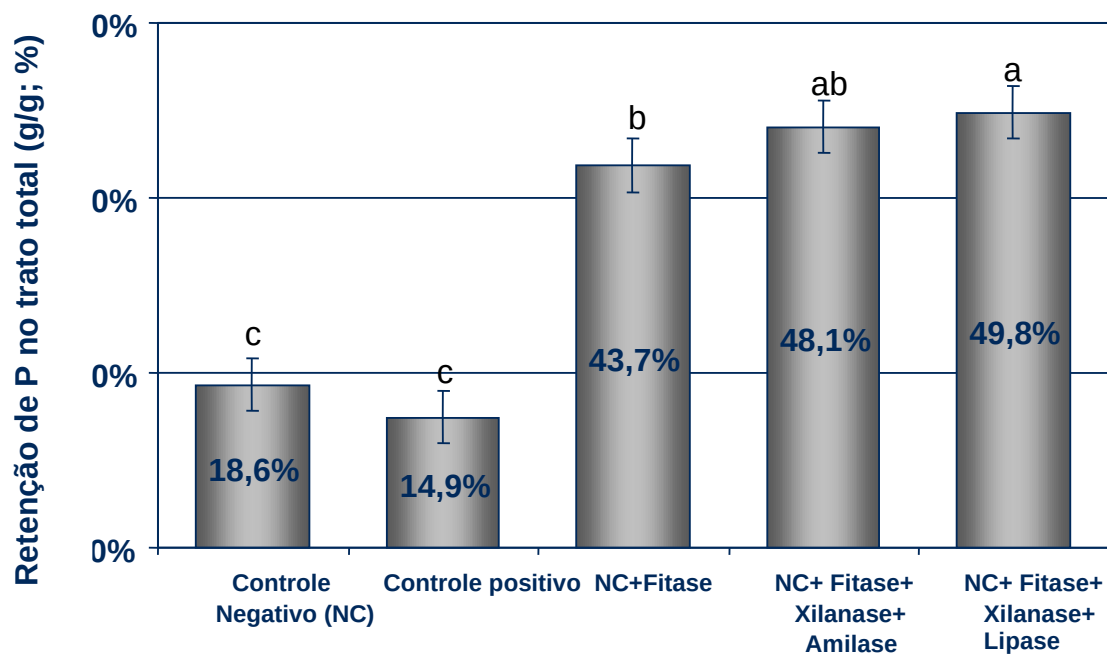
Fig.25**A****B**

Fig.26

SEQ ID No. 12

1 MKAILIPFLS LLIPLTPQSA FAQSEPELKL ESVVIVSRHG VRAPTKATQL
 51 MQDVTPDAWP TWPVKLGWLT PRGGELIAYL GHYQRQRLVA DGLLAKKGCP
 101 QSGQVAIIAD VDERTRKTGE AFAAGLAPDC AITVHTQADT SSPDPLFNPL
 151 KTGVCQLDNA NVTDAILSRA GGSIAFTGH RQTAFRELER VLNFPQSNLC
 201 LKREKQDESC SLTQALPSEL KVSADNVSLT GAVSLASMLT EIFLLQQAQG
 251 MPEPGWGRIT DSHQWNTLLS LHNAQFYLLQ RTPEVARSRRA TPLLDLIKTA
 301 LTPHPPQKQA YGVTLPSTVL FIAGHDTNLA NLGGALELNW TLPGPDPNTP
 351 PGGELVFERW RRLSDNSQWI QVSLVFQTLQ QMRDKTPLSL NTPPGEVKLT
 401 LAGCEERNAQGMCSLAGFTQIVNEARIPACSL

Fitase de *E.coli* tipo selvagem (Sequência de sinal em negrito)**Fig.27**

SEQ ID No. 13

1 QSEPELKLES VVIVSRHGVR APTKATQLMQ DVTPDAWPWT PVKLGWLTPR
 51 GGELIAYLGH YQRQRLVADG LLAKKGCPQS GQVAIIADVD ERTRKTGEAF
 101 AAGLAPDCAI TVHTQADTSS PDPLFNPLKT GVCQLDNANV TDAILSRAGG
 151 SIADFTGHRQ TAFRELERVL NFPQSNLCLK REKQDESCSL TQALPSELKV
 201 SADNVSLTGA VSLASMLTEI FLLQQAQGMP EPGWGRITDS HQWNTLLSLH
 251 NAQFYLLQRT PEVARSRATP LLDLIKTAALT PHPPQKQAYG VTLPTSVLFI
 301 AGHDTNLANL GGALELNWTL PGQPDNTPPG GELVFERWRR LSDNSQWIVQV
 351 SLVFQTLQOM RDKTPLSLNT PPGEVKLTLA GCEERNAQGM CSLAGFTQIV
 401 NEARIPACSL

Fitase de *E.coli* tipo madura

Fig.28

SEQ ID No.14

```

1 *           M W Y L L W F V G I L L M C S L S T L V L V W L D P R L K S *           ---
1 TAAggagcagaaacaATGTGGTATTACTTTGGTTCGTGGCATTGTTGATGTGTCGCTCTCCACCCTGTGTGGTATGGCTGGACCCGCTCTGAAAAGTTAAcgaacgtaggcc 120

1 ----- -35 ----- -10 SD M K A I L I P F L S L L I P L T P Q 18
121 tgatgcggcgcatcattagcatcgcatcaggcaatcaataatgtcagatatgaaagcggaacatatcgATGAAAGCGATCTTAATCCCATTGTTATCTTCTGATTCCGTTAAACCCGCA 240

19 S A F A Q S E P E L K L E S V V I V S R H G V R A P T K A T Q L M Q D V T P D A 58
241 ATCTGCATTCCCTCAGAGTGAGCCGAGCTGAAGCTGGAAAGTGTGGTGATTGTCAGTCGTCATGGTGTGCGTGCTCCAACCAAGGCCACGCAACTGATCAGGATGTACCCAGAGCG 360

59 W P T W P V K L G W L T P R G G E L I A Y L G H Y Q R Q R L V A D G L L A K K G 98
361 ATGGCCAACTGGCGGTAAACTGGGTTGGCTGACACCGCG GGTGGTGAGCTAATCGCCTATCTCGGACATTACCAACGCCAGCGCTGTGTAGCCGAGGGATTGCTGGCGAAAAGGG 480

99 C P Q S G Q V A I I A D V D E R T R K T G E A F A A G L A P D C A I T V H T Q A 138
481 CTGCCCCAGTCTGGTCAGGTCCGATTATTGCTGATGTGAGCAGCGTACCGTAAACAGGCGAAGCCTTCGCCGCCGGCTGGCACCTGACTGTGCAATAACCGTACATACCCAGGC 600

139 D T S S P D P L F N P L K T G V C Q L D N A N V T D A I L S R A G G S I A D F T 178
601 AGATACGTCAGTCCGATCCGTTATTAAATCCTCTAAAACTGGCGTTTGCCAACTGGATAACGCGAAGCTGACTGACGGATCCTCAGCAGGCGAGGAGGTCATTGCTGACTTTAC 720

179 G H R Q T A F R E L E R V L N F P Q S N L C L K R E K Q D E S C S L T Q A L P S 218
721 CGGGCATCGGCAACGGCGTTTCGCGAAGTGAACGGGTGCTTAATTTCCGCAATCAACTGTGCGCTAAACGTTGAGAAACAGGACGAAAGCTGTTCAATACGAGGCATTACCATC 840

219 E L K V S A D N V S L T G A V S L A S M L T E I F L L Q Q A Q G M P E P G W G R 258
841 GGAAGTCAAGGTGAGCGCGCAATGTCTCATTAAACGGTGGGTAAAGCTCGCATCAATGCTGAGCGAGATATTTCTCTGCAACAGCACAGGGAATCCGGAGCCGGGTGGGAG 960

259 I T D S H Q W N T L L S L H N A Q F Y L L Q R T P E V A R S R A T P L L D L I K 298
961 GATCACCAGTTCACACAGTGGAAACCTTGCTAAGTTTGCATAACGCGCAATTTTATTGCTACACGACGCCAGAGGTGCCCGCAGCCGCCACCCCGTTATTAGATTGATCAA 1080

299 T A L T P H P P Q K Q A Y G V T L P T S V L F I A G H D T N L A N L G G A L E L 338
1081 GACAGCGTTGACGCCCCATCCACGCAAAACAGGCGTATGGTGACATTACCCACTTCAGTGTGTTTATCGCCGACACGATACTAATCTGGCAAATCTCGCGCGCACTGGAGCT 1200

339 N W T L P G Q P D N T P P G G E L V F E R W R R L S D N S Q W I Q V S L V F Q T 378
1201 CAACTGGAGCGTCCCGGTGACGCGGATAACAGCGCGAGGTGAACTGGTGTGTAACGCTGGCGTGGCTAAGCGATAACAGCCAGTGATTGAGGTTTCGCTGGTCTTCAGAC 1320

379 L Q Q M R D K T P L S L N T P P G E V K L T L A G C E E R N A Q G M C S L A G F 418
1321 TTTCACAGATGCGTGATAAAACGCGCTGTCAATTAATACGCGCCCGAGAGGTGAACTGACCCTGGCAGGATGTGAAGAGCGAAATGCGCAGGCGATGTGTTGCTGGCAGGTTT 1440

419 T Q I V N E A R I P A C S L * ----- 433
1441 TACGCAATCGTGAATGAAGCACGCATACCGCGTGCAGTTTGTAAtgcataaaaaagagcattcagttacctgaatgctctgaggetgatgacaaacgaagaactgtctaagcgtaga 1560

1561 cgggaaaaggcggttcacgcgcgcacgcgccactttcagttttctctttctcggagtaactataacggtaaatagttatagcggtaactgtaagcggtgctggcggttaacacacccat 1680

1681 tgaggatagcgcctttaattattgacgctgctgttcagacgctgcatgacaaactcacctctttggcggtgttcaagccaaacgcgcaaccagcagggtggtgccaacagaacgcc 1800
Pvu I
1801 ccacgacccggcgcacactcaccgcccagcatcgccggcgatcgacaatcaccagatcgtaagtggtcggttcgccattccagtaattgacgcacccgatcg

```

Sequência de nucleotídeo de codificação da fitase de *E.coli*.

(Sequência de codificação exibida em maiúsculas como nucleotídeos 188-1483. Sequência maduro começa no nt 253)

Fig.29

Incubação In vitro em ração de milho-soja em condições ácidas

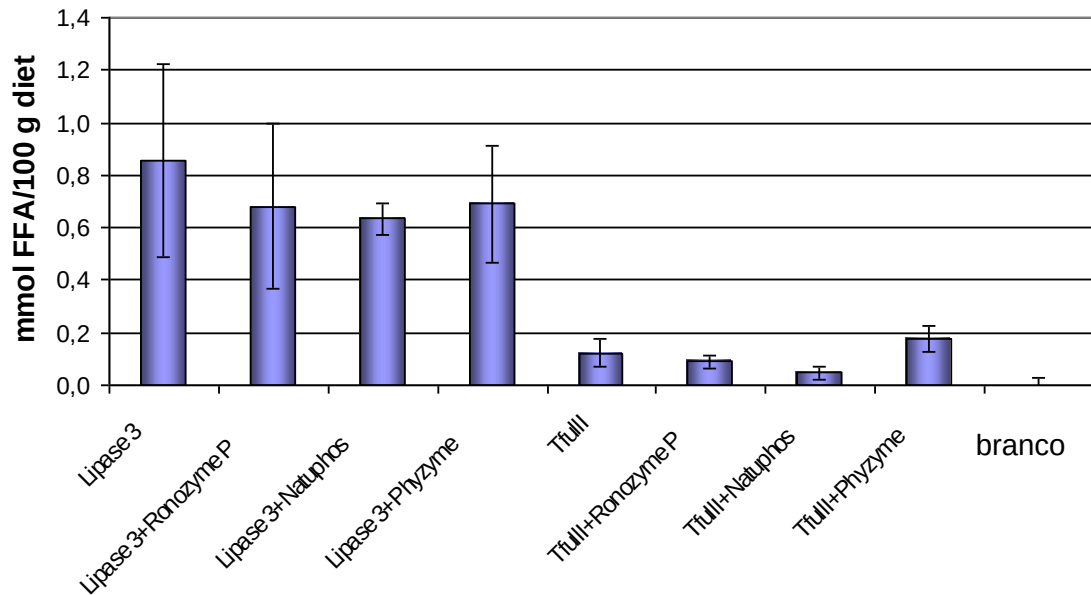
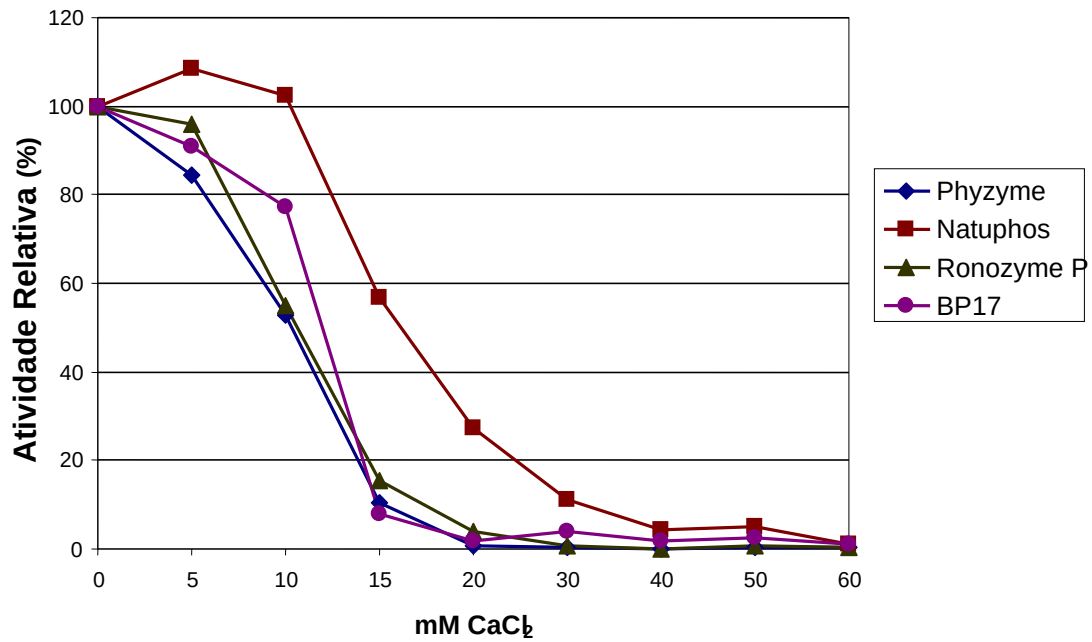


Fig.30

A



B

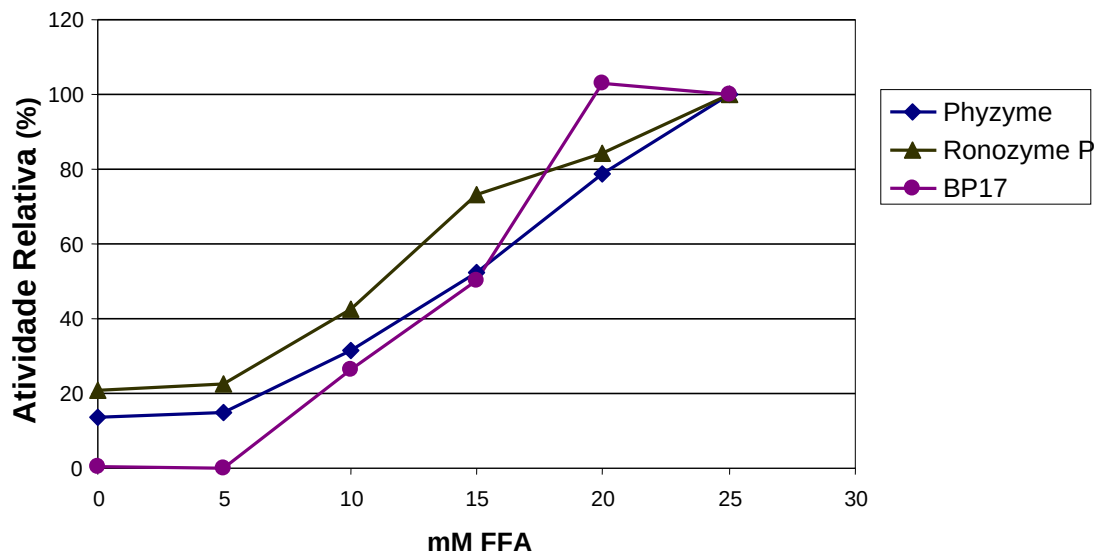


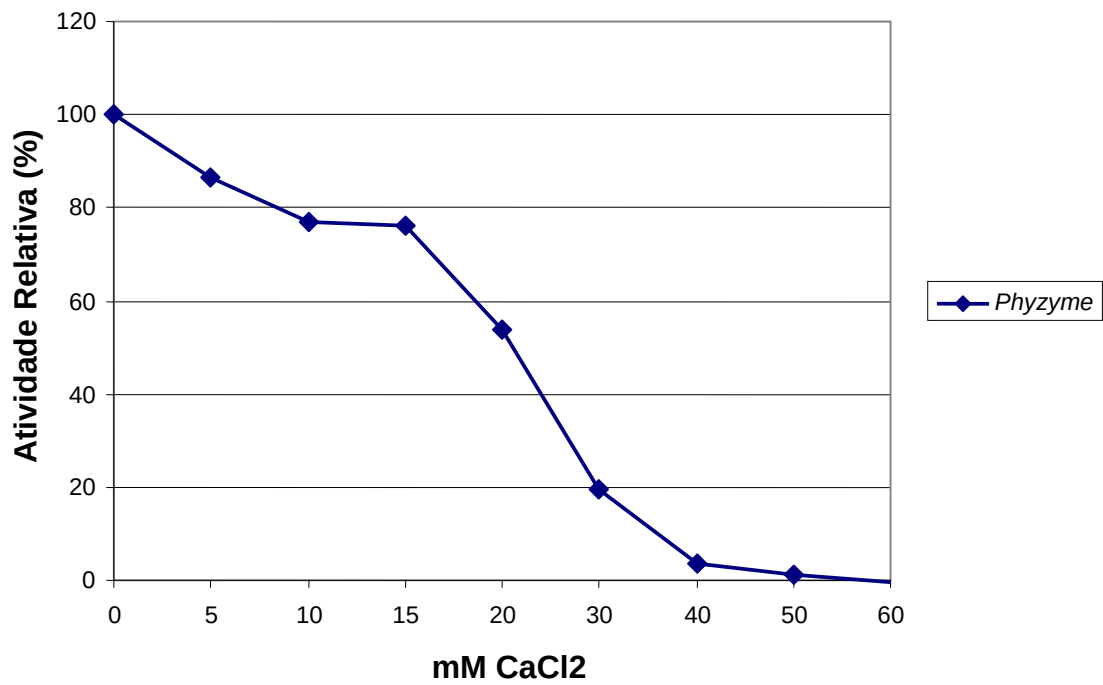
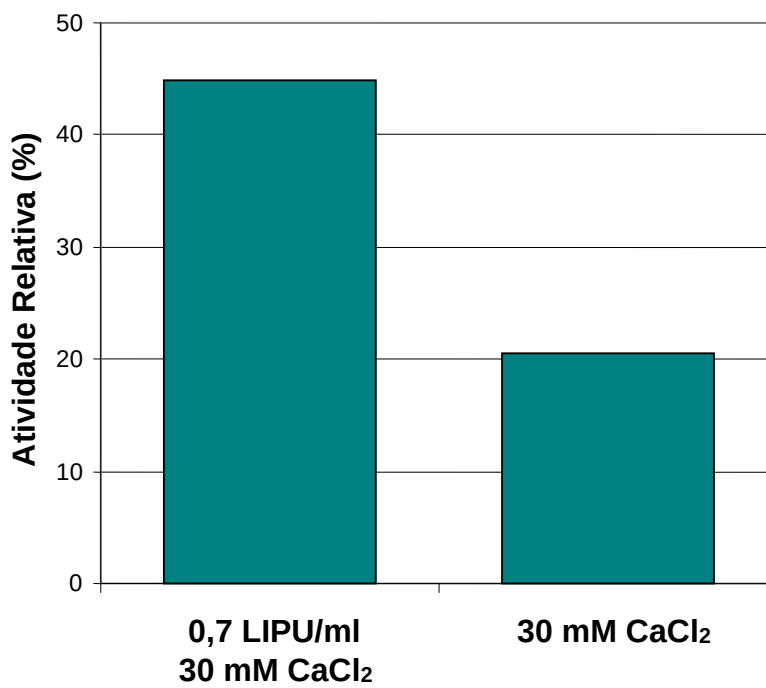
Fig.31**A****B**

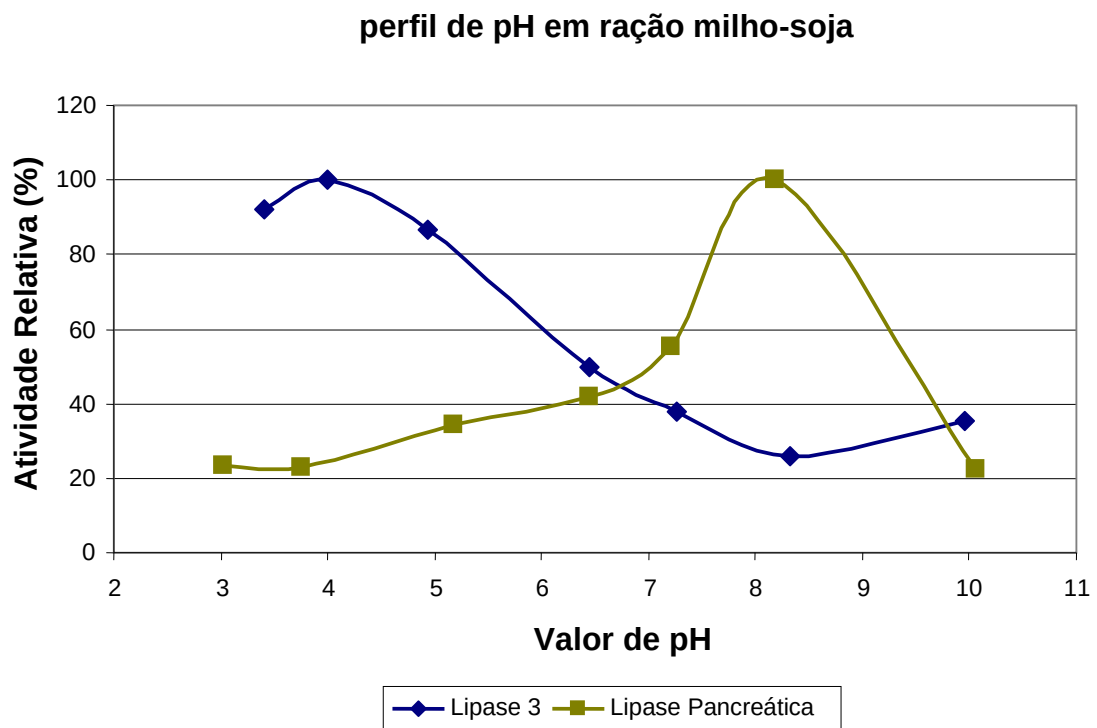
Fig.32

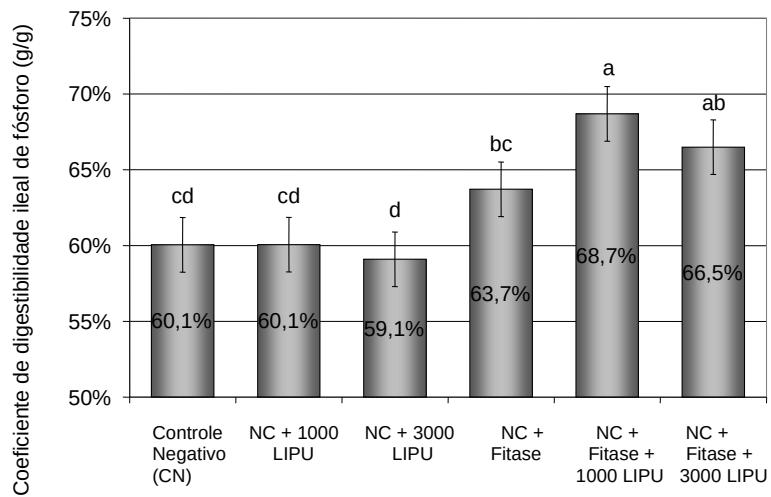
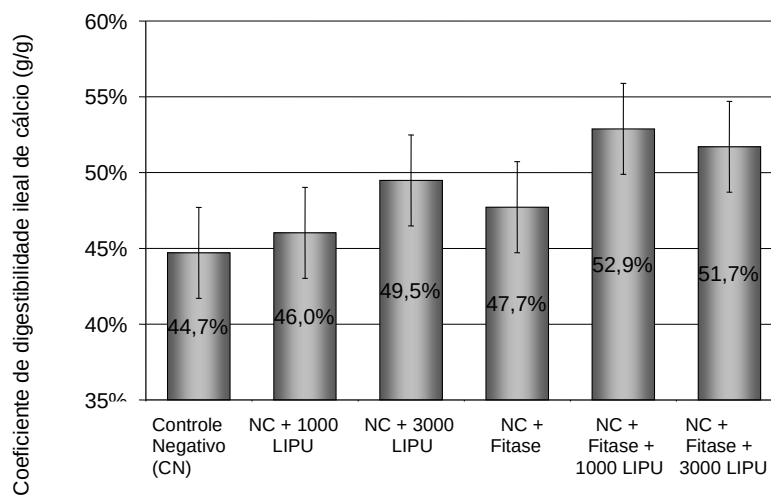
Fig.33**Fig.34**

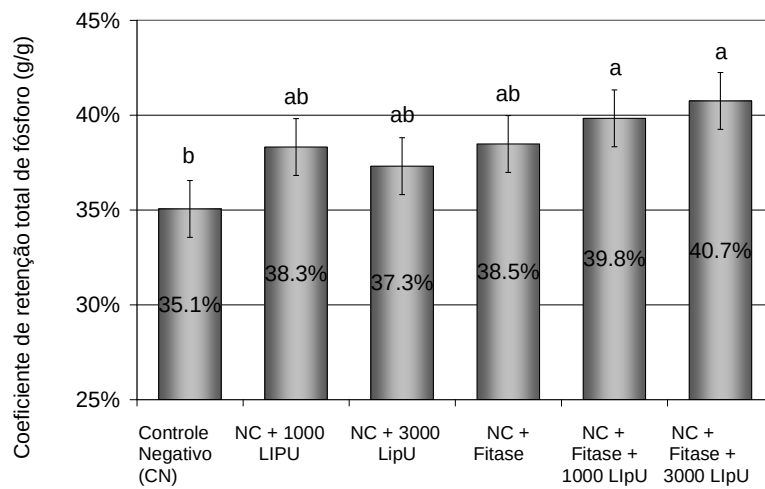
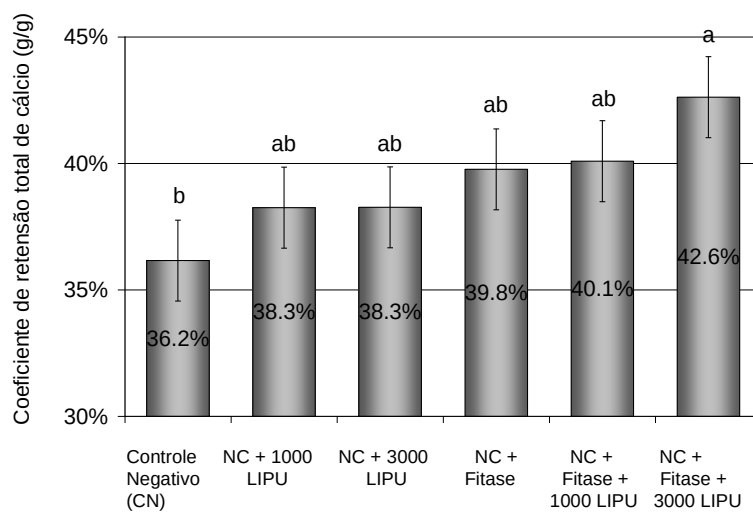
Fig.35**Fig.36**

Fig.37